



MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE ACTIVIDAD DE LIPASAS ÁCIDAS BASADO EN INDICADORES DE PH CON TRIGLICÉRIDOS.

María de los Angeles Camacho Ruiz¹, Juan Carlos Mateos Díaz¹, Frédéric Carrière, Jorge Alberto Rodríguez¹; ¹Unidad de Biotecnología Industrial, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C., Guadalajara, Jalisco, México, CP: 44270; ²EIPL, UMR 7282, Marsella, Francia.
email: mariangelcr00@hotmail.com

Palabras clave: lipasas ácidas, triglicéridos, indicadores de pH.

Introducción. Las lipasas (EC 3.1.1.3) son enzimas solubles que actúan naturalmente en triglicéridos insolubles (1). Están presentes en bacterias, hongos, plantas y animales. Han sido ampliamente utilizadas en la industria de alimentos, cosméticos, detergentes y farmacéutica (2). En particular las lipasas ácidas (como las gástricas) son enzimas extremófilas que tienen un rol importante en la digestión de lípidos. Se pueden obtener nuevas lipasas aislándolas de fuentes naturales o usando métodos clásicos de ingeniería genética o evolución dirigida. Estos estudios requieren métodos de determinación de actividad lipasa que sean convenientes, sensitivos y específicos; que puedan realizarse mediante ensayos continuos con sustratos estables; y que puedan emplearse para la búsqueda y selección de alto rendimiento (HTS). Los métodos de HTS para lipasas se realizan comúnmente con sustratos sintéticos cromogénicos no apropiados (3); además, para lipasas ácidas existen muy pocos.

En este trabajo se propone un método espectrofotométrico compatible con HTS para lipasas ácidas que emplea triglicéridos como sustrato.

Metodología. La actividad de la lipasa gástrica de conejo (RGL) y la lipasa gástrica recombinante de perro (rDGL), fue determinada con un método espectrofotométrico implementado en nuestro laboratorio, basado en el trabajo previo de (4). El método consiste en la medición indirecta de ácidos grasos liberados, a partir de la hidrólisis de triglicéridos (TG(4:0) o TG(8:0)), empleando indicadores de pH. La emulsión fue preparada como sigue: Un volumen de 50 mM de sustrato (disuelto en tert-butanol) conteniendo 5 mM verde de bromocresol (para pH 5.0) o 10 mM 3,4-dinitrofenol (para pH 5.5), se mezclaron vigorosamente en vórtex con 9 volúmenes de solución de reacción. La solución de reacción incluía 2.5 mM de tampón (malatos pH 5.0 o succinatos pH 5.5), 150 mM NaCl, 3 mg/mL β -CD, 2 mM NaTDC, 1.5 μ M BSA. Se depositaron 20 μ l de enzima, diluida apropiadamente, en una microplaca de 96 pozos y se añadió 100 μ l de emulsión. La reacción se siguió mediante el decremento de absorbancia (610 nM para pH 5.0 y 410 nM para pH 5.5) en un lector de microplacas a 37°C. Se realizaron blancos sin enzima, ensayos por triplicado y curvas estándar de ácido butírico (BtA) u octanóico (OcA). Una unidad corresponde a 1 μ mol de ácidos grasos liberados por minuto.

Resultados. La pendiente de las cinéticas de actividad enzimática aumentó proporcionalmente conforme aumentó la concentración de enzima (Fig. 1). La RGL tuvo una actividad enzimática a pH 5.0 de 330 ± 15 U/mg y 103 ± 8 U/mg en TG(4:0) y TG(8:0), respectivamente. La rDGL tuvo una actividad enzimática a pH 5.5 de 237 ± 15 U/mg y 256 ± 36 U/mg en TG(4:0) y TG(8:0), respectivamente.

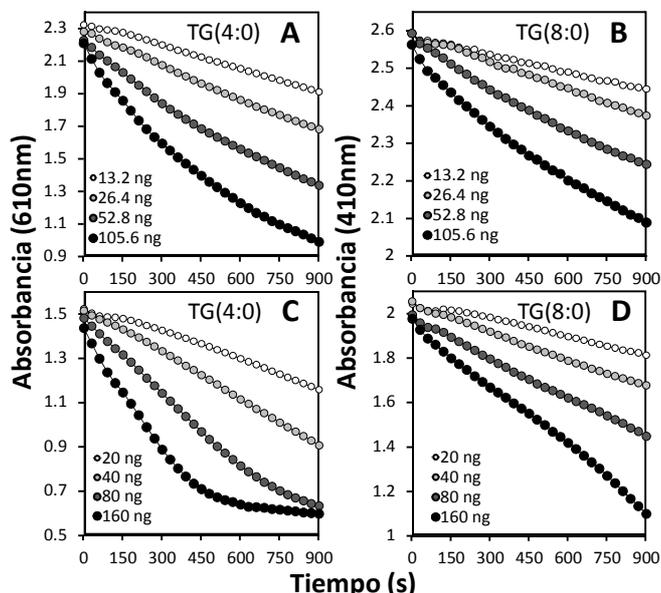


Fig. 1. Cinéticas de actividad en función de la concentración de enzima. RGL a pH 5.0 (A y B), o de rDGL a pH 5.5 (C y D).

Conclusiones. El método propuesto es útil en la cuantificación de la lipólisis de triglicéridos de cadena corta y mediana (TG(4:0) o TG(8:0)) a pH 5.0 y 5.5. Este método puede ser ampliamente utilizado para el cribado de actividad de lipasas ácidas, como las lipasas gástricas.

Agradecimiento. María de los Angeles Camacho-Ruiz agradece al CONACYT por su beca doctoral.

Bibliografía

1. Verger R. (1997). *Tibs Tech*. Vol. (15):32-38.
2. Sharma D, Sharma B., and Shukla A. (2011). *Biotech*. Vol. (10):23-40.
3. MacRae A. and Hammond R. (1995) *Biotechnol Genet Eng Rev*. Vol.(3):193-217.
4. Mateos-Díaz E, Rodríguez JA, Camacho-Ruiz MA, Mateos-Díaz, JC. (2012) High-Throughput screening method for lipases/esterases. En *Lipases and phospholipases: methods and applications*. Sandoval G. Humana Press, Springer Protocols. 89-100.