

INMOVILIZACION DE LA LIPASA TERMOALCALÓFILA PRODUCIDA POR *Bacillus thermoleovorans* CCR11

María Guadalupe Sánchez Otero, Gerardo Valerio Alfaro, Hugo Sergio García Galindo, Rosa Maria Oliart Ros (roliaart@itver.edu.mx), Unidad de investigación y Desarrollo en Alimentos, Instituto Tecnológico de Veracruz, M. A. de Quevedo 2779, Veracruz, Ver. 91897. México

Palabra clave: *Bacillus thermoleovorans*, lipasa, inmovilización

Introducción. Los ambientes extremos son el hábitat natural de ciertos microorganismos llamados extremófilos; las enzimas que producen se les llama extremoenzimas cuya aplicación como biocatalizadores es atractiva por su alta estabilidad y actividad en condiciones que anteriormente se consideraban incompatibles con materiales biológicos (1). Entre las extremoenzimas que se han aislado, se encuentran las lipasas (E.C.3.1.1.3), las cuales se definen como triacilglicerol hidrolasas que catalizan reacciones de hidrólisis y síntesis de una gran variedad de ésteres y la resolución de mezclas racémicas con una alta enantio- y regioselectividad, por lo que tienen una amplia aplicación industrial. Las lipasas solubles presentan ciertos problemas para su utilización: tienen baja estabilidad, su separación es difícil y su reutilización es muy limitada. La inmovilización de enzimas permite mejorar su desempeño al aumentar su termoestabilidad, facilitar su separación y permitir su reutilización (2). El objetivo del presente trabajo es establecer las condiciones para la inmovilización por adsorción de la lipasa parcialmente purificada de *Bacillus thermoleovorans* CCR11 y analizar su efecto sobre la termoestabilidad, así como la actividad y la resistencia al pH.

Metodología. La enzima fue producida cultivando a *Bacillus thermoleovorans* CCR11 en medio con 2.5% de aceite de cártamo alto oleico como fuente de carbono. Después de centrifugar y filtrar, se extrajeron los residuos liposolubles con hexano 1:1 y se ultrafiltró-diafiltró utilizando una membrana de co. 500 Kda. La actividad lipolítica se determinó usando p-nitro-fenil-laurato como sustrato (30 min., pH6.5, 60°C) (3). Se establecieron las condiciones de inmovilización utilizando una relación de lipasa/polipropileno de 6-60 mg de proteína/g de soporte, a 25, 30, 40 50 y 60°C, y pHs de 5,6,6.5,7 y 8, agitando a 250 rpm durante el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio en la adsorción de proteína. Se realizó la inmovilización de la lipasa con y sin Tritón X-100 (0.1%) en las mejores condiciones obtenidas, y se evaluó el efecto de ésta sobre la termoestabilidad y la actividad y resistencia al pH.

Resultados y discusión. Las mejores condiciones para la inmovilización fueron: 25°C, con 36 mg proteína/g soporte a pH 6.0, durante 3 h, y 250 rpm de agitación. En la Tabla 1 se muestra que hubo un incremento en la termoestabilidad de la enzima inmovilizada con respecto a la soluble con y sin Tritón X-100, ya que se observa que a 90°C hay pérdida total de la actividad lipolítica de la enzima soluble y existe actividad residual en los inmovilizados; estos resultados están de acuerdo con el aumento de la termoestabilidad reportado en la literatura para otras lipasas inmovilizadas por adsorción (4). La actividad lipolítica en diferentes pHs no presentó diferencia del pH óptimo de actividad entre la enzima soluble y la inmovilizada con y sin tritón X-100.

Con respecto a los estudios del efecto de la inmovilización sobre la resistencia al pH, la Figura 1 muestra un aumento en el intervalo de pH en el que la lipasa inmovilizada con Tritón X-100 conserva un mayor porcentaje relativo de actividad lipolítica

Tabla 1. Efecto de la inmovilización sobre la termoestabilidad de lipasa de *B. thermoleovorans* CCR11. (Incubación por 1 hora). * % de Actividad residual.

Temp. °C	Lipasa soluble sin Tritón X-100 *	Inmovilizado con Tritón X-100 *	Lipasa soluble con Tritón X-100*	Inmovilizado con Tritón X-100*
50	100	100	100	100
60	91.54	100	89.59	100
70	48.31	93.17	34.53	100
80	13.05	72.15	8.79	54.23
90	0	56.47	0	15.41
100	0	15.23	0	4.23

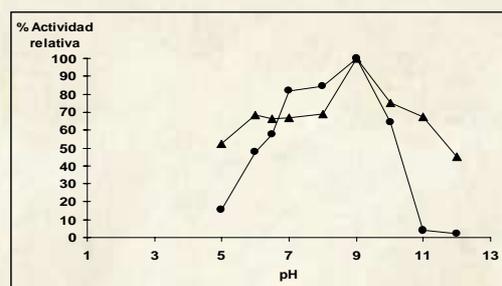


Fig.1 Efecto de la inmovilización sobre la resistencia al pH de la lipasa inmovilizada de *B. thermoleovorans* CCR11 (incubada por una hora). ● Inmovilizado sin Tritón X-100, ▲ Inmovilizado con Tritón X-100.

Conclusiones. La inmovilización por adsorción en polipropileno de la lipasa de *Bacillus thermoleovorans* CCR11 da como resultado:

1. Un aumento en la termoestabilidad en los inmovilizados con y sin Tritón X-100.
2. Un aumento en la resistencia al pH de la lipasa inmovilizada con Tritón X-100.

No se observó diferencia en el pH óptimo de actividad lipolítica en los inmovilizados con y sin Tritón X-100 con respecto a la enzima soluble

Agradecimiento: Agradecemos a CONACyT el apoyo brindado para la realización de este proyecto.

Bibliografía.

1. Gomes, J y Steiner W. (2004). The Biocatalytic Potential of Extremophiles and Extremozymes. *Food Technol. Biotechnol.* 42 (4):223-235.
2. Bornscheuer, U.T.; Bessler, C.; Srinivas, R.; Krishna, S.H. (2002). New strategies to increase enzyme activity. *Trends in Biotechnol.* 20: No. 10, 433-437.
3. Nawani, N. and Kaur, J. (2000). Purification, characterization and thermostability of lipase from thermophilic *Bacillus sp.* J33 *Mol. Cel. Biochem.* 206: 91-96.
4. Dosanjh, N.S. and Kaur, J. (2002). Immobilization, stability and esterification studies of a lipase from *Bacillus sp.* *Biotechnol. Appl. Biochem.* 36: 7-12.