



## “INMOVILIZACIÓN COVALENTE DE LA LIPASA LIP2 DE *YARROWIA LIPOLYTICA*”

J Hernández<sup>a</sup>, Jorge Aburto<sup>b</sup>, Eduardo Torres<sup>b</sup>, Alberto del Monte<sup>c</sup>, Sergio Galaz<sup>c</sup>, Georgina Sandoval<sup>a</sup>.

<sup>a</sup>CIATEJ, av Normalistas No. 800, 44270, Guadalajara, Jal. México. e-mail: georgina@confluencia.net. <sup>b</sup>Instituto Mexicano del Petróleo, México, D.F., México. <sup>c</sup>Lab. Inmovilización y Biocatálisis, Centro de Estudio de Proteínas, Fac. Biología, Universidad de la Habana, Cuba.

*Palabras clave:* lipasa LIP2, *Yarrowia lipolytica*, inmovilización covalente

**Introducción.** La enzima LIP2 es una lipasa extracelular de la levadura *Yarrowia lipolytica* que ha sido caracterizada recientemente<sup>[1]</sup>. A partir del desarrollo de una nueva cepa de *Y. lipolytica*, se ha logrado una mayor producción de LIP2<sup>[2]</sup> donde el gen de la lipasa se encuentra aproximadamente 15 copias/genoma bajo el control de un promotor inducible con aceites. Por la estabilidad que ofrece la unión covalente de una enzima a un soporte, ésta se ha consolidado como uno de los métodos de inmovilización más utilizados en la industria. La estabilidad de la inmovilización covalente se origina por sus siguientes características: manipulación sencilla de los derivados inmovilizados, carga de enzima constante después de la inmovilización, los derivados pueden utilizarse en diversos reactores y tienen mayor resistencia a la desactivación.


El objetivo del presente trabajo es realizar inmovilizaciones covalentes uni- y multipuntuales de la lipasa LIP2 de *Yarrowia lipolytica* y evaluar el grado de inmovilización.

**Metodología.** Se produjo la lipasa LIP2 por medio de fermentaciones de *Y. lipolytica* en un reactor por lote, controlando la temperatura, pH, oxígeno disuelto y agitación. La lipasa LIP2 se concentró por precipitación con sulfato de amonio o acetona al 70% y ultrafiltración con membrana poliétersulfona de 10 kD. Se utilizaron dos soportes para la inmovilización covalente (Glioxyl-Sepharose 4B Cl y monoaminoethyl-N-amioethyl-Sepharosa 4B Cl) y uno para la inmovilización por adsorción (Octal-Sepharose 4B Cl). En los dos primeros se efectuaron inmovilizaciones uni y multipuntuales de puentes amina<sup>[3]</sup> y uni-puntuales de puente amida; en el último soporte se realizaron inmovilizaciones interfaciales<sup>[4]</sup>. Los métodos de inmovilización se evaluaron calculando la eficiencia de LIP2 inmovilizada.

**Resultados y discusión.** Los resultados de los porcentajes de eficiencia de LIP2 inmovilizada se muestran en el cuadro 1. Los tres primeros métodos de inmovilización son del tipo enlaces covalentes y el cuarto es de adsorción; éste último se utilizó como cotejo con métodos no covalentes. Se observa notablemente que los procesos unipuntuales, tanto de amina como de amida, lograron una eficiencia mayor de inmovilización, en comparación con el multipuntual de amina y con la adsorción interfacial. La lipasa inmovilizada con puentes multipuntuales de amina obtuvo la menor eficiencia, esto se explica porque este tipo de inmovilización

cada molécula de lipasa utiliza más enlaces en el complejo enzima-soporte que en el unipuntual.

Cuadro 1. Eficiencia de los métodos de inmovilización en LIP2

Enzima	Métodos de inmovilización	Parámetros de inmovilización		
		Carga (U/mL soporte)	GI <sup>a</sup> (U/mL soporte)	% I <sup>b</sup>
 LIP2 de <i>Yarrowia lipolytica</i>	1. Puente unipuntual de amina	33 333.33	31 481.36	94
	2. Puente multipuntual de amina	33 333.33	24 444.91	73
	3. Puente unipuntual de amida	33 333.33	30 444.30	91
	4. Adsorción interfacial	33 333.33	25 464.05	76

<sup>a</sup>Grado de inmovilización, determinado por el método diferencial

<sup>b</sup>Porcentaje de inmovilización

**Conclusiones.** En todos los métodos se lograron buenos porcentajes de inmovilización con actividades elevadas equiparables a las de las lipasas comerciales que hay en el mercado. Aunque el método multipuntual de amina fue el que tuvo menor eficiencia de inmovilización, se pronostica que el derivado de este proceso obtenga una mayor estabilidad por su naturaleza de enlaces múltiples. La corroboración experimental de esta hipótesis es la siguiente etapa del presente proyecto de investigación.

### Bibliografía.

- [1] Pignede G, Wang H, Fudalej F, Seman M, Gaillardin C, Nicaud JM. (2000). Characterization of an Extracellular Lipase Encoded by LIP2 in *Yarrowia lipolytica*. *J Biotechnol.* 182 (10): 2802-2810.
- [2] Pignede G, Wang H, Fudalej F, Seman M, Gaillardin C, Nicaud JM. (2000). Autocloning and Amplification of LIP2 in *Yarrowia lipolytica*. *Appl Environ Microbiol.* 66 (8):3283-3289.
- [3] Guisan JM. (1988) Immobilization and Stabilization of a-chymotrypsin by Covalent Attachment to Aldehyde-agarose Gels. *Enzyme Microbial Tech.* 10:375-382.
- [4] Fernandez-Lafuente R, Armisen P, Sabuquillo P, Fernandez-Lorente G, Guisan JM. (1998). Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. *Chem Phys Lip.* 93:185-197.