



OBTENCION DE LIPASAS A PARTIR DE AMBIENTES TERMALES DE VERACRUZ.

Dora L. Pinzón M.*, David Miñana G.†, Hugo S. García G.*, Gerardo Valerio A.*, Rosamaría Oliart R.*. †Facultat de Farmacia, Universitat de Barcelona. *Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos, Instituto Tecnológico de Veracruz, M. A. de Quevedo 2779, Veracruz, Ver., 91897. (229) 9 34 57 01 ext. 112.

roliart@itver.edu.mx

Palabras clave: Lipasas, termófilos, *Anoxybacillus*.

Introducción. Las lipasas (E. C. 3. 1. 1. 3.) son enzimas que catalizan la hidrólisis de los triacilgliceroles para liberar ácidos grasos y glicerol y que poseen un gran interés biotecnológico. Entre las aplicaciones de las lipasas se encuentra la formulación de detergentes, de biosurfactantes, en la industria oleoquímica, de cosméticos, de alimentos, agroquímica y farmacéutica⁽¹⁾. Las lipasas producidas por termófilos se han convertido en candidatos idóneos sobre las procedentes de mesófilos para tales aplicaciones debido a su natural termoestabilidad y actividad en solventes orgánicos. Dicha termoestabilidad es requerida dentro de los procesos biotecnológicos, como en la síntesis enantioselectiva de compuestos, por lo que actualmente existe interés en la obtención de lipasas con características novedosas, activas en altas temperaturas y pHs⁽¹⁾.

El objetivo del presente trabajo fue la identificación de genes de lipasas termófilas a partir de ambientes termales de Veracruz.

Metodología. La identificación de genes de lipasas se realizó mediante PCR utilizando cebadores diseñados a partir de regiones altamente conservadas (sitio activo) y de secuencias consenso de lipasas termófilas, y DNA obtenido de fuentes termales de Veracruz⁽²⁾. La síntesis de los cebadores y la secuenciación de los productos se llevó a cabo en la Unidad de Síntesis y Secuenciación, IBT. De la fuente termal "Los Baños" se aislaron bacterias termófilas lipolíticas, que fueron identificadas por pruebas bioquímicas y secuenciación del gen 16S rRNA. Se purificó parcialmente una lipasa por ultrafiltración-diafiltración⁽³⁾, y se caracterizó de acuerdo a temperatura y pH óptimo, especificidad de sustrato y efecto de iones y detergentes.

Resultados y discusión. Se obtuvieron productos de PCR a partir de las muestras ambientales utilizando los cebadores para el sitio activo, con el tamaño esperado (180-320pb)⁽²⁾, cuya secuenciación está en proceso, pero no con los cebadores diseñados a partir de los extremos de genes de lipasas termófilas. Se aislaron cuatro cepas de bacterias termófilas positivas a la hidrólisis de tributirina, dos de las cuales mostraron fluorescencia en agar con rodamina B, que de acuerdo a la secuencia del 16S rDNA, pertenecen al género *Anoxybacillus*. Se obtuvo un extracto crudo con actividad lipolítica a partir de la cepa *Anoxybacillus* sp. DR03, que fue parcialmente purificado y concentrado mediante ultrafiltración con una membrana de polietersulfona (co. 500 kDa), debido a que se sugiere que la lipasa forma agregados, como ha sido observado en otras

lipasas⁽³⁾. La T_{opt} y pH_{opt} (Fig. 1) de la enzima fue de 70°C y 6.5, manteniendo el 77% de su actividad después de 30 min. de incubación a 70°C. El extracto mostró preferencia por el *p*-nitrofenil-butirato (C:4). El ion Hg^{+} tuvo un efecto negativo sobre la actividad de la enzima, no tan intenso como el reportado por las lipasas de *B. thermoleovorans* ID-1 y *Bacillus* sp⁽³⁾. La actividad no fue inhibida en presencia de SDS, lo que sugiere su posible utilización en la formulación de detergentes.

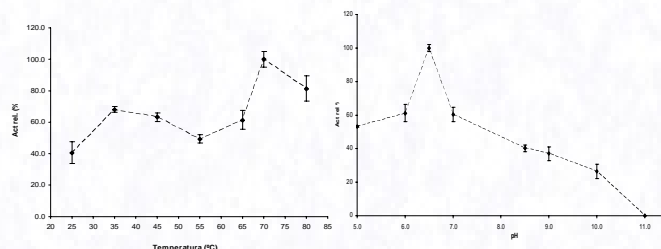


Fig. 1. Efecto del pH y de la temperatura sobre la actividad de la enzima.

Conclusiones. Mediante PCR fue posible obtener fragmentos de genes de lipasas directamente del DNA de muestras ambientales. La obtención de genes completos de lipasas de la fuente geotermal donde predomina el género *Anoxybacillus* se dificulta mediante la PCR, debido a la inexistencia de reportes de las secuencias de las lipasas de estos microorganismos, por lo que para la obtención de dichas lipasas se propone el uso de bibliotecas genómicas. La cepa *Anoxybacillus* sp. DR03 produce una lipasa termófila (70°C y pH 6.5), con preferencia por sustratos de cadena corta, cuya actividad no se ve afectada en presencia de detergentes como el SDS, lo que la hace una lipasa interesante para aplicaciones biotecnológicas. Finalmente, no existen reportes de la caracterización de lipasas producidas por *Anoxybacillus*.

Agradecimiento. A CONACYT por el apoyo financiero otorgado al presente trabajo.

Bibliografía.

- Sharma, R. (2001). Production, purification, characterization and applications of lipases. *Biotechnology Advances*. 19: 627-662.
- Bell, P, J, Anwar, S, Moreland, D, Curach N, C. (2002). Prospecting for novel lipase genes using PCR. *Microbiology*. 148: 2283-2291.
- Schmidt-Dannert, C, Sztajer, H, Stöcklein, W. (1994). Screening, purification and properties of a thermophilic lipase from *Bacillus thermocatenuatus*. *Biochim. Biophys.* 1214: 43-45.