

PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE LA LIPASA PRODUCIDA POR LA BACTERIA TERMÓFILA *Bacillus thermoleovorans* CCR11

Lelie D. Castro, Citlali Rodriguez, Gerardo Valerio, Rosa María Oliart
UNIDA, Instituto Tecnológico de Veracruz, M. Angel de Quevedo 2779. Col. Formando Hogar CP 91897,
Veracruz, Ver México. Fax (229) 9 34 57 01, e-mail: roliaart@itver.edu.mx

Palabras clave: lipasa, bacterias termófilas, purificación

Introducción. Las lipasas (triacilglicerol hidrolasas EC 3.1.1.3) se encuentran ampliamente distribuidas en animales, plantas y microorganismos (1). Estas enzimas exhiben un gran potencial en aplicaciones comerciales: catalizan una variedad de reacciones biotecnológicamente relevantes, e.g., producción de ácidos grasos, interestificación de grasas y péptidos. Con respecto a la aplicación industrial, las lipasas de microorganismos termófilos han despertado un gran interés, ya que suelen ser más termoestables y resistentes a la desnaturalización química que las producidas por sus contrapartes mesofílicas (2).

El objetivo del presente trabajo fue purificar y caracterizar parcialmente una lipasa extracelular producida por una bacteria termófila aislada en el ITV.

Metodología. Se analizó la producción de lipasas de 11 *Bacillus* termófilos aislados de aguas termales de “El Carrizal” Veracruz, en placas con tributirina y con aceite de oliva y rodamina B. Se seleccionó la cepa que presentó mayor productividad de lipasa. La actividad lipolítica se determinó mediante el método colorimétrico utilizando *p*-Nitrofenil-laurato como sustrato (3). La producción de la enzima se indujo utilizando 2.5% de aceite de oliva e incubando a 55°C y 150 rpm. La lipasa extracelular fue purificada por diafiltración (500 kDa), isoelectroenfoque preparativo (Rotofor?) y electroelución. Las fracciones con mayor actividad y pureza obtenidas del isoelectroenfoque fueron concentradas por ultrafiltración (10 kDa) y se emplearon para la caracterización (peso molecular, punto isoelectroenfoque, especificidad de sustrato, efecto del pH, temperatura, iones metálicos, inhibidores, y solventes orgánicos sobre la actividad y estabilidad de la lipasa).

Resultados y discusión. Se encontraron 4 cepas con actividad lipolítica. Se eligió a *Bacillus thermoleovorans* CCR11 por presentar la mayor producción de enzima (6068 U/ml). Después de la diafiltración (500 kDa) se obtuvo un 100% de rendimiento y un factor de purificación de 6, y después del isoelectroenfoque el factor de rendimiento obtenido fue de 27%.

La lipasa CCR11 tiene un punto isoelectroenfoque de 6; el peso molecular determinado por SDS-PAGE es de 11kDa (Fig 1a), pero en condiciones nativas forma agregados de 190 kDa (Fig. 1b). Tiene un pH óptimo de 9 y una temperatura óptima de 60°C. Es estable en un intervalo de pH de 5 a 11, y conserva el 76% de su actividad después de 1 hora de

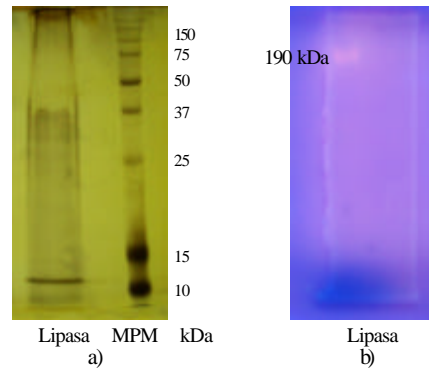


Fig. 1. a) SDS-PAGE de la lipasa CCR11 después de diafiltración-isoelectroenfoque-electroelución. b) Zimograma en condiciones nativas

incubación a 60°C. La enzima es activada por iones Ca^{+2} e inhibida por iones Hg^{+2} , PMSF, SDS, Tween 80 y Tween 20. Conserva su actividad en presencia de Tritón X-100, β -mercaptoetanol y 2-propanol. La enzima mostró una marcada preferencia por ésteres de *p*-nitrofenilo con grupos acilo C:10.

Conclusiones. *Bacillus thermoleovorans* CCR11 produce una lipasa termoalcalófila al crecer en presencia de aceite de oliva. El isoelectroenfoque preparativo fue un método efectivo para la purificación de la lipasa. El peso molecular de 11 kDa de la lipasa CCR11 la convierte en la lipasa de menor peso molecular reportado en la literatura. Por las características mostradas la lipasa de *Bacillus thermoleovorans* CCR11 es atractiva para su posible aplicación en biocatálisis.

Bibliografía.

- Desnuelle, P. (1972) En: *the Enzymes*. Boyer, P.D. Academic Press, New York. 575-616.
- Schmidt-Dannert, C., Sztajer, H., Stöcklein, W., Menge, U., Schmid, R.D. 1994. Screening, purification and properties of a thermophilic lipase from *Bacillus thermocatenulatus*. *Biochim. Biophys. Acta*. 1214: 43-53.
- Nawani, N., Dosanjh, S. N., Kaur, J. 1998. A novel thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus* sp.: characterization and esterification studies. *Biotechnology Letters*. 20 (10): 997-1000.