

“Lipasa termoestable de *Bacillus pumilus* GMA1: Producción fermentativa y algunas propiedades”

Patricia Wong y Amelia Farrés

Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, UNAM

Circuito de la Investigación s/n. Conj. “E” lab. 312 Cd. Universitaria

Coyoacán 04510, México, D.F. Fax. 56-22-53-09, farres@servidor.unam.mx

Palabras clave: lipasa, termorresistencia, Bacillus pumilus.

Introducción. Las lipasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de triacilglicérolas en una interfase aceite/agua, cuya actividad depende de la naturaleza de la propia enzima así como de las condiciones de ensayo (1). El microorganismo de estudio, *Bacillus pumilus* GMA1, fue aislado en las aguas termales de Los Azufres, Michoacán. Su lipasa presenta actividad a pH 10.5 y 50°C, además de tener preferencia por ácidos grasos de cadena corta. Las lipasas termoactivas y, en general, aquéllas que presentan actividad en ambientes extremos, han cobrado importancia industrial dado que sus características las hacen más adecuadas para procesos que requieren de condiciones que resultan desnaturalizantes para la mayoría de las enzimas (2). En este trabajo se analiza la lipasa de *B. pumilus* GMA1 con técnicas bioquímicas con el fin de determinar sus posibles aplicaciones.

Metodología. *B. pumilus* se inoculó en medio líquido de BHI adicionado con tributirina al 1%, y se incubó durante 24 h a 37°C. La actividad lipolítica se determinó tanto mediante la titulación de los ácidos grasos liberados como a través de un método espectrofotométrico utilizando o-nitrofenil-laurato como sustrato. El extracto crudo se saturó con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (80%), y el precipitado obtenido se disolvió en buffer de fosfatos (pH 8.0). Posteriormente se cargó en una columna de Superosa 12, pre-equilibrada con buffer de fosfatos 0.2 M, pH 8.0. Las fracciones que presentaron actividad lipolítica se concentraron en Centricon y se corrió un gel SDS-PAGE al 12% para observar su perfil electroforético. El extracto enzimático semipurificado se caracterizó en cuanto a la afinidad por sustrato, perfil de actividad contra pH y temperatura, especificidad posicional y actividad en solventes orgánicos.

Resultados y Discusión. El curso de la fermentación fue monitoreado mediante la evaluación del crecimiento celular, la actividad lipolítica y el pH (Fig. 1). El microorganismo alcanzó su máximo desarrollo a las 24 h de incubación a 37°C, y su actividad lipolítica se manifiesta desde la etapa lag de crecimiento. Para la determinación de la actividad lipolítica mediante los métodos señalados fue necesaria la selección de las condiciones adecuadas para el ensayo (pH 10.5 a 50°C) con el fin de asegurar la estabilidad de la enzima. El buffer seleccionado fue CHES 50 mM y, en el caso del método titulométrico, se utilizó una emulsión de tributirina al 5% como sustrato. El extracto crudo concentrado con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ tiene un factor de enriquecimiento de 7. La subsecuente cromatografía en una columna de filtración en gel resulta en la elución de un pico a los 10 min, el cual presenta la máxima actividad (9.7

UI/mL). El perfil electroforético de esta fracción en un gel SDS-PAGE al 12% con tinción de plata muestra una banda en la región de pesos moleculares de 30 a 20 kDa. Los resultados del proceso de cromatografía de intercambio iónico permiten detectar dos picos con actividad lipolítica. Este resultado debe ser corroborado mediante microsecuenciación para determinar a cuál de las enzimas presentes en el microorganismo corresponden las secuencias genéticas y enzimáticas previamente caracterizadas (2).

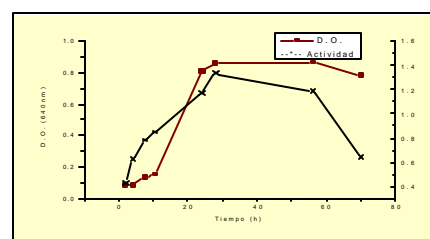


Fig.1 Cinética de crecimiento y producción de la lipasa de *B. Pumilus* GMA1 a 37°C en presencia de tributirina al 1%

Conclusiones.

Se determinó que una fermentación de 24 h a pH 7.2 a 37°C, son las condiciones que favorecen una mejor producción de la lipasa. La actividad lipolítica máxima del extracto purificado es de 9.7 UI/mL bajo las condiciones de ensayo. Se observó que el método titulométrico es el más adecuado para la determinación de la actividad lipolítica, en relación al método con ONFL, dado que este último manifiesta actividad de esterases. El microorganismo parece presentar dos proteínas con actividad lipolítica.

Agradecimientos.

A Augusto González, Unidad de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, Hospital General.

Bibliografía.

1. Sugihara, A., Tadaki, T. y Tominaga, Y. (1991). Purification and Characterization of a novel thermostable lipase from *Bacillus* sp. J. Biochem. 109:211-216.
2. Bustos, I. (1998). Análisis del gen que codifica para la lipasa de *B. pumilus* GMA1. Tesis. Facultad de Química, UNAM.
3. N. Nawani y J. Kaur (1999). Purification, characterization and thermostability of lipase from a thermophilic *Bacillus* sp. J33. Mol. Cell. Biochem. 206: 91-96