



**CENTRO DE INVESTIGACIONES  
BIOLÓGICAS DEL NOROESTE**

---

---

Programa de Estudios de Posgrado

**“EFECTO DE SOLVENTES ORGÁNICOS Y TEMPERATURA EN LA  
ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LAS LIPASAS DIGESTIVA E  
INTRACELULAR DE *Penaeus vannamei*”**

TESIS

Que para obtener el grado de  
Maestro en Ciencias  
Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales  
(Orientación en Biotecnología)

Presenta

Claudia Ivette Maytorena Verdugo

La Paz, B.C.S. Diciembre, 2011

## **COMITÉ TUTORIAL**

Dr. Fernando Luis García Carreño  
Director de tesis  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

Dr. Julio Humberto Córdova Murueta  
Co-Tutor  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

Dra. Martha Patricia Hernández Cortés  
Co-Tutor  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

## **COMITÉ REVISOR**

Dr. Fernando Luis García Carreño  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

Dr. Julio Humberto Córdova Murueta  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

Dra. Martha Patricia Hernández Cortés  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

## **JURADO DE EXAMEN DE GRADO**

Dr. Fernando Luis García Carreño  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

Dr. Julio Humberto Córdova Murueta  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

Dra. Martha Patricia Hernández Cortés  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

Dra. Thelma Rosa Castellanos Cervantes  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste  
Suplente



# ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 13:30 horas del día 29 del Mes de noviembre del 2011, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

**"Efecto de solventes orgánicos y temperatura en la actividad enzimática de las lipasas digestiva e intracelular de *Penaeus vannamei*"**

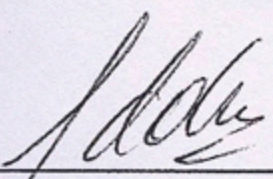
Presentada por el alumno:


**Claudia Ivette Maytorena Verdugo**

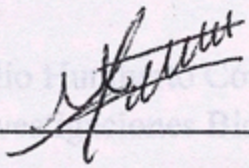
Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN **BIOTECNOLOGÍA**

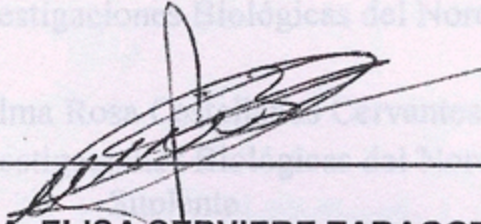
Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

JURADO DE EXAMEN DE GRADO  
LA COMISION REVISORA

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Fernando Luis García Carreño  
DIRECTOR DE TESIS

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Julio Humberto Córdova Murueta  
CO-TUTOR

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Martha Patricia Hernández Cortés  
CO-TUTOR

  
\_\_\_\_\_  
DRA. ELISA SERVIERE ZARAGOZA,  
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO



## Resumen

El estudio de las reacciones enzimáticas, en general, es en medio acuoso. Algunas enzimas pueden mantener actividad catalítica en medios no acuosos, como por ejemplo en solventes orgánicos. Las reacciones enzimáticas en este tipo de medios mejora la solubilidad de sustratos no polares, la recuperación de productos en la fase orgánica, disminuye la desnaturalización por temperatura y da la posibilidad de llevar a cabo reacciones termodinámicamente imposibles en soluciones acuosas.

Las lipasas (EC 3.1.1.3, triacilglicerol hidrolasas) son enzimas que hidrolizan el enlace éster de triacilglicéridos para liberar ácidos grasos y glicerol. Para que las lipasas puedan hidrolizar el sustrato necesita darse una emulsión entre los lípidos y el agua para que un dominio hidrofóbico que cubre el sitio activo se desplace y los residuos de aminoácidos que conforman el sitio activo queden expuestos para ligar el sustrato e hidrolizar el enlace éster por un fenómeno llamado activación interfacial. Las lipasas digestiva e intracelular de camarón blanco *Penaeus vannamei* pueden hidrolizar triacilglicéridos de cadena corta y larga, teniendo preferencia por sustratos con insaturaciones. En este trabajo se estudio el efecto de solventes orgánicos en la actividad enzimática de estas lipasas y el efecto que tienen los solventes en la estabilidad térmica de estas enzimas para poder proponerlas como biocatalizadores para aplicaciones biotecnológicas. Se encontró un aumento de hasta 125 y 225% en la actividad relativa de la lipasa digestiva incubada en 10 y 20% de metanol y hexano respectivamente. En acetona, etanol, propanol y dimetil sulfóxido, la actividad relativa disminuyó al aumentar la concentración de estos solventes y se abolió totalmente en butanol. Al incubar la lipasa intracelular en propanol, la actividad relativa disminuyó conforme aumentó la concentración de solvente en la mezcla. Con metanol, etanol, acetona, butanol, dimetil sulfóxido y hexano mantuvo hasta 38% de su actividad enzimática. La lipasa intracelular mostró mayor estabilidad en solventes orgánicos, a excepción de propanol. Al incubar las lipasas de camarón en 10 a 40% metanol y temperaturas mayores a la óptima, la lipasa digestiva aumentó 40% su actividad relativa y la lipasa intracelular hasta 5 veces en 20% de metanol. Se concluye que el área superficial accesible a solventes determina la interacción de solventes orgánicos polares dadas las diferencias estructurales entre las lipasas de otros organismos y la probabilidad de que el agua interactúe con la estructura de la proteína.

Palabras clave: Lipasas, solventes orgánicos, estabilidad térmica.

---

**Vo.Bo. Dr. Fernando Luis García Carreño**

## Abstract

Most of the studies of enzymatic reactions are in aqueous media, but some enzymes can work in non-aqueous media, like in organic solvents. Some advantages of carrying out reactions in non-aqueous media are: a) Better solubility of non-polar substrates, b) Product recovery in the organic phase, c) Improvement of thermostability.

Lipases (EC 3.1.1.3, Triacylglycerol hydrolases) are the enzymes responsible of the hydrolysis of triacylglycerides, releasing fatty acids and glycerol. The reaction takes place only when an emulsion is formed between lipids and water; a hydrophobic domain covering the active site will be displaced, and the enzyme is able to hydrolyze ester bonds by a phenomenon called interfacial activation. It has been proved that shrimp lipases can hydrolyze short and long acyl chains triacylglycerids, with preference for long polyunsaturated acyl chains. The aim of this study was to search for new characteristics of these lipases for potential biotechnological applications, studying the effect of organic solvents in the enzyme activity and the ability of solvents to improve the thermal stability of these enzymes. The relative activity of digestive lipase exhibited an increase of 125 and 225% in the presence of methanol and hexane. Relative activity decreased in the presence of acetone, ethanol, propanol and dimethyl sulfoxide, as solvents concentrations increased and in butanol, enzyme activity was abolished. Intracellular lipase activity decreases its relative activity in propanol. In methanol, ethanol, acetone, butanol, dimethyl sulfoxide and hexane, intracellular lipase activity was stable. When shrimp lipases were incubated in solvents and high temperatures (40 and 50 °C), digestive lipase activity increased 40% in methanol and intracellular lipase five fold. It was concluded that the accessible surface area determines the interaction between lipases and polar organic solvents given the structural differences between lipases of other species and the probability of water molecules interact with the protein.

Key words: lipase, organic solvents, thermostability.

**Dedicatoria**

**A las personas que me han apoyado en mis estudios**

**Alma, Enriqueta y Josafat**

## **Agradecimientos**

A CONACYT por el apoyo económico (Beca 236062) y al proyecto 80935 – Enzimas digestivas en decápodos crustáceos: proteinasas ácidas y lipasas verdaderas. Desde el gen hasta la función.

A CIBNOR y al Departamento de Posgrado.

Al Dr. Fernando García Carreño por su paciencia y por mostrarme que las metas se pueden alcanzar si estás dispuesto a pagar el precio.

Al Dr. Julio Córdova por sus consejos y los buenos momentos en el laboratorio.

A la Dra. Patricia Hernández por sus consejos y por mostrarme lo bonitas que son las proteínas.

A la Técnico María de los Ángeles por todo su cariño, entrenamiento y amistad.

Al Técnico Arturo Sierra por sus comentarios y sugerencias para mejorar este trabajo.

A la Dra. Crisalejandra Rivera por ser un gran ejemplo a seguir en lo académico y en lo personal.

A la Dra. Liliana Rojo por sus consejos, bromas y buenos ratos.

A mis compañeros de laboratorio, Margarita González por su ternura y amistad, Betsaida Bibó por sus consejos, apoyo y momentos divertidos, Balam Martínez por tu amistad en las buenas y en las malas desde 2009 y Diana Martínez por su amistad y mostrarme el trabajo es la llave del éxito.

A mis compañeros de generación 2009-2011 y asociados por ser un gran apoyo en estos dos años de maestría.

Gracias a todos.

## Contenido

Resumen.....	i
Abstract.....	ii
Dedicatoria.....	iii
Agradecimientos.....	iv
Contenido.....	v
Lista de figuras .....	vii
Lista de tablas .....	viii
1. Introducción.....	1
2. Marco teórico.....	2
2.1 Lipasas.....	2
2.1.1 Familia de lipasas.....	2
2.1.2 Diferencias entre lipasas y esterasas.....	5
2.1.3 Estructura de lipasas .....	5
2.1.4 Sitio activo y sitio de enlace de lipasas.....	6
2.1.5 Mecanismo de catálisis de lipasas.....	8
2.2 Catálisis en medios no acuosos.....	9
2.2.1 Lipasas como catalizadores industriales .....	9
2.2.2 Propiedad de los solventes.....	10
2.2.2.1 Alcoholes.....	10
2.2.2.2 Cetonas.....	12
2.2.2.3 Alcanos.....	13
2.2.3 Ventajas y desventajas de usar enzimas en presencia de solventes orgánicos.....	13
2.2.4 Clasificación de sistemas que usan solventes orgánicos.....	14
2.2.5 Efecto de solventes orgánicos en enzimas.....	14
2.2.5.1 Propiedades dieléctricas de las proteínas.....	15
2.2.5.2 Participación del agua como reactivo.....	17
2.2.5.3 Participación del sustrato entre el sitio activo y el solvente.....	17
2.2.5.4 Efecto de los solventes en el estado de transición de la enzima.....	18
2.2.6 Modificación del medio de reacción en solventes orgánicos.....	19
2.2.7 Estabilización termodinámica de los sistemas de transición en solventes orgánicos.....	19
2.2.8 Inactivación de enzimas en solventes orgánicos.....	20
2.2.9 Uso de solventes en síntesis.....	20
2.2.10 Efecto de solventes orgánicos en lipasas de origen marino.....	21
3. Hipótesis.....	23
4. Objetivo.....	23
4.1 Objetivos específicos.....	23
5. Materiales y métodos.....	24
5.1 Obtención de muestras.....	24
5.2 Cuantificación de actividad de lipasa.....	24



5.3 Purificación de la lipasa digestiva.....	24
5.3.1 Cromatografía de exclusión molecular.....	24
5.3.2 Cromatografía de intercambio aniónico.....	25
5.4 Purificación de la lipasa intracelular.....	25
5.4.1 Cromatografía de interacción hidrofóbica.....	25
5.5 Electroforesis y zimogramas para lipasas.....	25
5.6 Evaluación de la actividad enzimática de la lipasa digestiva e intracelular en presencia de solventes orgánicos.....	26
5.7 Evaluación de la actividad enzimática de la lipasa digestiva e intracelular en presencia de solventes orgánicos y a temperaturas mayores a la óptima....	26
6. Resultados.....	27
6.1 Purificación de la lipasa digestiva.....	27
6.2 Purificación de la lipasa intracelular.....	28
6.3 Efecto de los solventes orgánicos en la actividad de la lipasa digestiva....	28
6.4 Efecto de la temperatura en la actividad enzimática de la lipasa digestiva incubada en metanol y etanol.....	29
6.5 Efecto del metanol en la especificidad de la lipasa digestiva.....	31
6.6 Efecto de los solventes orgánicos en la actividad enzimática de la lipasa intracelular.....	31
6.7 Efecto de la temperatura en la actividad enzimática de la lipasa intracelular en metanol, etanol y DMSO.....	32
6.8 Efecto del metanol en la especificidad de la lipasa intracelular.....	34
7. Discusión.....	35
8. Conclusiones.....	42
9. Bibliografía.....	43

## Lista de figuras

Figura 1. Estructura de $\alpha/\beta$ hidrolasas.....	6
Figura 2. Sitios de enlace de cadenas de acilo en lipasas.....	7
Figura 3. Mecanismo de catálisis en lipasas.....	8
Figura 4. Representación de la interacción de agua y octano en el sitio activo de la subtilisina Carlsberg.....	15
Figura 5. Residuos de aminoácidos afectados por la permitividad del medio de la lisozima de huevo incubada en cloroformo.....	16
Figura 6. Modificación de medios no acuosos.....	19
Figura 7. Cromatografía de exclusión molecular.....	27
Figura 8. Cromatografía de intercambio iónico.....	28
Figura 9. Cromatografía de interacción hidrofóbica.....	28
Figura 10. Efecto de solventes orgánicos en la actividad de la lipasa digestiva.....	29
Figura 11. Efecto de temperatura y metanol en la actividad enzimática de la lipasa digestiva.....	30
Figura 12. Efecto de temperatura y etanol en la actividad enzimática de la lipasa digestiva.....	30
Figura 13. Efecto de solventes orgánicos en la actividad enzimática de la lipasa intracelular.....	32
Figura 14. Efecto del etanol y la temperatura en la actividad enzimática de la lipasa intracelular.....	33
Figura 15. Efecto del metanol y la temperatura en la actividad enzimática de la lipasa intracelular.....	33
Figura 16. Efecto del DMSO y la temperatura en la actividad enzimática de la lipasa intracelular.....	33
Figura 17. Modelo <i>in silico</i> de la lipasa digestiva de <i>Penaeus vannamei</i> .....	37
Figura 18. Comparación del área accesible a solventes presentes en la lipasa digestiva de camarón y en la lipasa lisosomal de pez zebra.....	38
Figura 19. Modelos <i>in silico</i> de las lipasas de <i>S. epidermis</i> , <i>D. rerio</i> y <i>P. vannamei</i> .....	39
Figura 20. Estructura primaria de una lipasa de <i>S. epidermidis</i> .....	39

**Lista de tablas**

Tabla 1. Clasificación de lipasas.....	3
Tabla 2. Diferencia entre lipasas y esterases.....	5
Tabla 3. Solventes usados en la industria y sus parámetros de solubilidad.....	11
Tabla 4. Ventajas y desventajas de usar solventes en reacciones enzimáticas..	13
Tabla 5. Efecto del metanol en las constantes cinéticas de la lipasa digestiva.	31
Tabla 6. Efecto del metanol en las constantes cinéticas de la lipasa intracelular.....	37
Tabla 7. Efecto de solventes orgánicos en lipasas de diferente origen.....	40

## **1. Introducción**

Las lipasas (EC 3.1.1.3; triacilglicerol acilhidrolasas) son un grupo versátil de biocatalizadores de la hidrólisis de triacilglicéridos (TAGs), cuando se da una interface entre la superficie de la enzima, el sustrato y el medio acuoso, fenómeno llamado activación interfacial (Kourist et al. 2010). La aplicación de lipasas en la industria ha sido destinada a la producción de detergentes, alimentos, saborizantes, fármacos, ésteres, agroquímicos, cosméticos y perfumería (Hasan et al. 2006). La creciente necesidad de enzimas resistentes a las condiciones de trabajo de algunos procesos industriales hace indispensable la búsqueda de enzimas termoresistentes en solventes orgánicos (Ahmed et al. 2009, Mansfeld & Ulbrich-Hofmann 2007, Royter et al. 2009, Sekhon et al. 2005). Algunas de las ventajas de usar solventes en reacciones enzimáticas son: (a) Solubilidad de sustratos hidrofóbicos en solventes orgánicos, (b) reversión de la reacción de hidrólisis a una de síntesis, (c) disminución de reacciones no deseadas o de inhibición por productos disminuye, (d) recuperación de productos y del biocatalizador es rápida y fácil en un sistema con una fase orgánica. Los procesos biocatalíticos difieren de los procesos químicos convencionales debido a las características del catalizador, parámetros cinéticos, estabilidad de la proteína bajo las condiciones del proceso, si la enzima está aislada o forma parte del metabolismo de una célula, crecimiento celular, inducción de la actividad enzimática y/o uso de rutas metabólicas para reacciones múltiples (Schmid et al. 2001). Una alternativa para mejorar los procesos biocatalíticos es buscar enzimas que sean estables en solventes orgánicos y altas temperaturas. Las lipasas de camarón blanco pueden hidrolizar triacilglicéridos de cadena corta y de cadena larga con insaturaciones (Rivera et al. 2011), características deseadas en procesos de síntesis de ésteres en medios no acuosos, por lo que se planteó como objetivo evaluar la capacidad catalítica en solventes orgánicos y a temperaturas mayores a la óptima en medios no acuosos.

## **2. Marco teórico**

### **2.1 Lipasas**

Las lipasas constituyen un grupo de enzimas que catalizan la hidrólisis del enlace éster de triacilglicéridos de cadena larga. A diferencia de las carboxilesterasas (EC 3.1.1.1), que también hidrolizan enlaces éster, la catálisis ocurre cuando se da una interface. La mayoría de las lipasas presentan un fenómeno llamado activación interfacial, lo que significa que solo se observará actividad catalítica en presencia de una fase hidrofóbica (TAGs dispersos en agua). Este fenómeno depende de la presencia de un dominio hidrofóbico llamado “lid” o “flat” cubriendo la entrada al sitio activo. En un ambiente hidrofóbico, la “lid” se desplaza y el sustrato puede entrar al sitio de enlace. Existen lipasas que no necesitan de activación interfacial como las de las bacterias *Pseudomonas glumae*, *Pseudomonas aeruginosa* y del hongo *Candida antarctica* B, pero todas estas tienen una pequeña “lid” (Kourist et al. 2010).

#### **2.1.1 Familia de lipasas**

Las lipasas microbianas se han clasificado en 6 familias, las cuales presentan grandes diferencias entre ellas; entre las que destacan sus temperaturas y pH óptimos, sus estructuras, el mecanismo de secreción y sus secuencias de aminoácidos. En la Tabla 1, se muestra la clasificación de lipasas bacterianas y algunas propiedades. La familia 1, se clasifica en 6 sub-familias, las cuales presentan diferencias en cuanto al mecanismo de secreción: sub-familias 1 y 2, son codificadas por un mismo operón y el plegamiento esta dado por chaperoninas llamadas “Lif” (Lipase-specific foldases).

Las lipasas de mamíferos pueden ser pancreáticas, hepáticas, intracelulares, endoteliales y gástricas. Gran parte de las lipasas de mamíferos trabajan a pH neutro, sin embargo, las lipasas gástricas se distinguen por trabajar a pH ácido (Jaeger et al. 1999, Du et al. 1998).

Tabla 1. Clasificación de lipasas.

Origen	Familia	Subfamilia	Origen/Función	Características
Bacteria	I	1	Lipasas verdaderas del género <i>Pseudomonas</i> .	30-32 KDa. Dependen de chaperoninas “Lif” para su plegamiento. Dos residuos de ácido aspártico participan en el anclaje de iones de calcio. Un puente disulfuro cercano al sitio activo, estabiliza la estructura tridimensional (Jaeger 1999).
		2	Lipasas verdaderas del género <i>Burkholderia</i> .	33 KDa. Se caracterizan por tener una placa $\beta$ antiparalela. Dependen chaperoninas “Lif” para su plegamiento. Dos residuos de ácido aspártico participan en el anclaje de iones de calcio. Un puente disulfuro cercano al sitio activo, estabiliza la estructura tridimensional (Jaeger 1999).
		3	Lipasas verdaderas de <i>Ps. fluorescens</i> y <i>Serratia marcescens</i> .	50-65 KDa. Carecen de residuos de cisteína y de péptido señal en el N-terminal. La secreción y el plegamiento se dan por un sistema de transportación en donde interviene ATP (Jaeger 1999).
		4	Lipasas verdaderas del género <i>Bacillus</i> .	~20 KDa. Secuencia consenso: Ala-Xaa-Ser-Xaa-Gly (Jaeger 1999).
		5	Lipasas de <i>Bacillus</i> : ~45 KDa	Lipasas de <i>Staphylococcus</i> : ~75 KDa. Se secretan como precursores y en el medio extracelular son hidrolizadas por proteasas para liberar a la proteína madura. Se cree que el propéptido actúa como chaperonina intracelular, facilitando la translocación de la lipasa a través de la membrana. pH y temperatura óptima: 9.0, 65 °C. Pueden presentar actividad de fosfolipasa cuando son lipasas verdaderas (Jaeger 1999).
			Lipasas del género <i>Bacillus</i> y <i>Staphylococcus</i>	Presentan una secuencia consenso Gly-Asp-Ser-(Leu). La secuencia de residuos de aminoácidos ácidos, los cuales estabilizan las cargas positivas del residuo de histidina del sitio activo, es reemplazada por triptófano (Jaeger 1999).
		II	GDSL	Lipasas de <i>Sreptomycetes</i> sp. y <i>Moraxella</i> sp. (Jaeger 1999).
		III	Lipasas extracelulares	Presentan actividad óptima a temperaturas $\leq 15^{\circ}\text{C}$ . (Jaeger 1999).
		IV	Lipasa sensible a hormonas (HSL)	Presentan similitudes con hidrolasas epóxidas, dehalogenasas y haloperoxidasas (Jaeger 1999).
		V	Esterasas extracelulares	~23-26 KDa. La forma activa de estas enzimas está dada por dímeros (Jaeger 1999).
		VI	Carboxilesterasas	Hidrolizan ésteres de colesterol y triacilglicéridos que son transportados a los lisosomas por las lipoproteínas de baja densidad. Esta enzima contribuye al control homeostático
Mamífero	Lisosomales	Lipasas ácidas	Lisosomas	



Pre-duodenales	Lipasas ácidas	Saliva, faringe, estómago	en el plasma (Du et al. 1998)
Pancreáticas	Lipasas neutras	Páncreas	No tienen homología con las lipasas pancreáticas. El sitio activo está disponible al sustrato cuando la enzima se une a la interfase, las lipasas pancreáticas tienen disponible su sitio activo cuando cambian su conformación. Hidrolizan enlaces éster en la posición <i>sn</i> -1 y <i>sn</i> -3. La lipasa gástrica humana puede hidrolizar las tres posiciones con preferencia por cadenas de acilo de 10 a 12 carbonos y 18 carbonos con o sin insaturaciones, sin hidrolizar triacilglicéridos cadenas de acilo de 14-16 carbonos. Poseen dos dominios: $\alpha/\beta$ hidrolasa y $\beta$ -sándwich. En conformación cerrada, las placas $\beta$ 5 y $\beta$ 9 cubren la "lid" y favorecen la interacción hidrofóbica de la proteína con el sustrato (Miled et al. 2000).
Hepáticas	Lipasa hepática	Hígado	Es sintetizada en los hepatocitos. Al salir de la célula, tiene interacción con proteoglicanos que están unidos a la superficie de las células hepáticas. Hidroliza tri-di- y monoglicéridos y presenta actividad de fosfolipasa. Participa en el transporte de colesterol (Miled et al. 2000).
	Lipasa de lipoproteínas	Hígado	Hidroliza los triacilglicéridos de los quilomicrones y de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). En el espacio subendotelial no tiene función catalítica, sino que actúa como ligando de la lipasa hepática (Miled et al. 2000).
Endoteliales		Células endoteliales	Ha sido detectada en hígado, pulmones, glándula tiroides y órganos reproductores. Tiene función intra- y extracelular. Está relacionada con el transporte y metabolismo de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) (Kurtovic et al. 2009).
	Lipasas sensibles a hormonas	Músculo y adipocitos	Hidroliza los triacilglicéridos de reserva del músculo y de los adipocitos para generar energía para procesos reproductivos. Su estructura primaria es diferente al resto de las lipasas de mamíferos, están compuestas por dos dominios y tiene una masa de 84 KDa (Kurtovic et al. 2009).

### 2.1.2 Diferencias entre lipasas y esterasas

Lipasas y esterasas hidrolizan enlaces éster y la manera en cómo se han distinguido es por su especificidad. Las esterasas hidrolizan ésteres formados por acilo de cadena corta (3-4 carbonos) y las lipasas hidrolizan ésteres de acilos de cadena larga (8-18 carbonos). Al contrario de la lipasas, las esterasas no necesitan activación interfacial y no incrementan su actividad cuando se excede el límite de solubilidad (Chahinian et al. 2002). Las características físicas de los sustratos de estas enzimas son la clave para entender su comportamiento. Los triacilglicéridos de cadena larga son insolubles en agua y cuando forman una emulsión con el agua, las lipasas son capaces de identificar agregados de lípidos como sustrato, por lo tanto la actividad de lipasa tiene una relación directa con el área total accesible al sustrato y no con su concentración. En el 2000, Fojan y colaboradores encontraron diferencias en el tipo de residuos de aminoácidos en la superficie de esterasas y lipasas. Las lipasas contienen entre 50 y 80% de residuos no polares en un superficie, lo que facilita la interacción de lipasas con sustratos hidrofóbicos. En la Tabla 2 se muestran algunas características representativas de ambos grupos de enzimas.

Tabla 2. Diferencia entre lipasas y esterasas (Chahinian et al. 2002).

<b>LIPASAS (3.1.1.3)</b>	<b>ESTERASAS (3.1.1.1)</b>
Hidrolizan triacilglicéridos de cadena larga.	Hidrolizan triacilglicéridos de cadena corta.
La catálisis ocurre cuando se da una interfase entre el agua y los lípidos.	No presentan una región hidrofóbica que cubra el sitio activo y no necesitan de activación interfacial.
Presentan un dominio hidrofóbico que cubre el sitio activo.	Contienen solo una cavidad para cadenas de acilo.
Contienen puentes disulfuro.	Necesitan calcio.
Superficie compuesta de parches hidrofóbicos.	Puede variar el tipo de aminoácidos que se encuentran en el sitio activo.
Presentan una secuencia consenso GX SXG.	Presentan una secuencia consenso GESAG.

### 2.1.3 Estructura de lipasas

Las lipasas presentan un plegamiento en forma de  $\alpha/\beta$ -hidrolasa que consiste de 8 láminas  $\beta$  centrales dispuestas en forma paralela a excepción de la segunda lámina  $\beta$  (lámina  $\beta_2$ ) dispuesta en sentido antiparalelo. Las láminas  $\beta_3$  a  $\beta_8$  están conectadas por hélices  $\alpha$  que rodean el sistema de láminas  $\beta$ . Las láminas  $\beta$  conforman una estructura

semicilíndrica (Jaeger et al. 1999). El sitio activo está constituido por una tríada catalítica conservada: un nucleófilo (serina) ubicado después de la lámina  $\beta 5$ , un grupo ácido (aspártico o glutámico) situado después de la lámina  $\beta 7$  y una histidina ubicada después de la última lámina  $\beta$ . Asociado al sitio activo se encuentra una cavidad oxianiónica formada por un residuo situado en la región N-terminal (entre la lámina  $\beta 3$  y hélice  $\alpha A$ ) y un residuo en la región C-terminal próximo al residuo nucleofílico catalítico los cuales forman puentes de hidrógeno con el oxianión para estabilizarlo (Barbe et al. 2009). En la Figura 1 se presenta un diagrama característico de la estructura secundaria de una  $\alpha/\beta$ -hidrolasa.

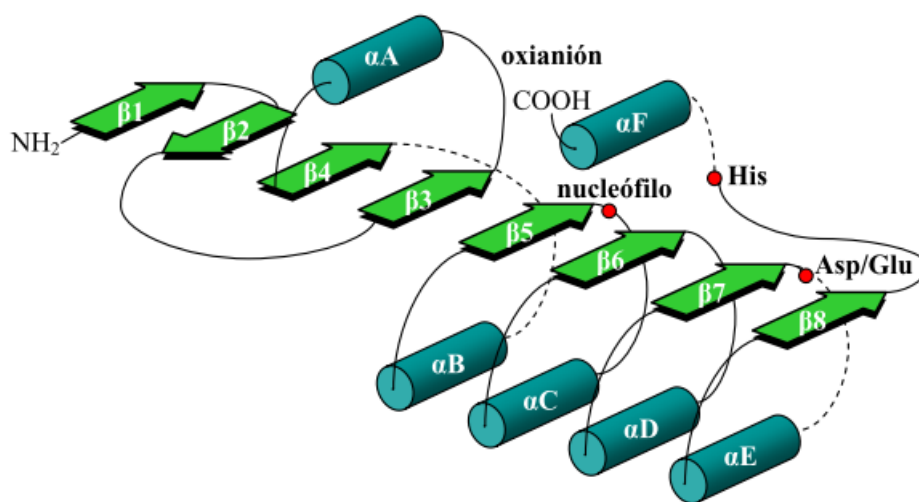


Figura 1. Estructura de  $\alpha/\beta$  hidrolasas (Modificado de Jaeger et al. 1999).

#### 2.1.4 Sitio de enlace

La activación interfacial en lipasas fue descubierta por Sarda y Desnuelle (1958), quienes observaron que la actividad de lipasa pancreática porcina aumentaba 10 veces cuando se daban interfaces hidrofóbicas usando triacetina o metil-butirato como sustrato. Estos sustratos tienen una solubilidad limitada en agua permitiendo que se dé una interface cuando se excede el límite de solubilidad de estos compuestos por lo que se concluyó que la activación interfacial genera cambios conformacionales en la estructura de la enzima (Louwrier et al. 1996).

A partir de la descripción de la estructura tridimensional de diferentes lipasas se observó la presencia de una hélice alfa cubriendo el sitio activo y se sugirió que el desplazamiento de esta hélice alfa pudiera darse en presencia de una interface permitiendo el acceso al sitio activo. Esta hipótesis fue confirmada experimentalmente y

se observó que la hélice alfa se desplazaba para que el sitio activo quedara expuesto (Louwrier et al. 1996).

Se han detectado 4 sitios de enlace al sustrato en la estructura de lipasas, una cavidad oxianiónica y otras tres cavidades para las cadenas de acilo *sn*-1, *sn*-2 y *sn*-3 del sustrato. La conformación del sitio activo se divide en dos, una parte hidrofóbica en donde la cadena de acilo en la posición *sn*-3 es la primera en tener interacción con la enzima y una parte parcialmente hidrofílica en donde se encuentra la parte polar del triacilglicérido (glicerol). La cavidad de enlace para la molécula de glicerol es una mezcla entre una parte hidrofílica y otra hidrofóbica en donde se unen las cadenas de acilo en las posiciones *sn*-2 y *sn*-1. Las interacciones de Van der Waals son las fuerzas que hacen que los grupos radil análogos al triacilglicérido, interaccionen con los residuos de aminoácidos que forman estas cavidades. Cuando las lipasas están en contacto con inhibidores, se da una interacción similar en donde un puente de hidrógeno entre el átomo de oxígeno del éster de la posición *sn*-2 y el electrón de la histidina del centro activo contribuyen a la fijación del inhibidor con la enzima (Pleiss et al. 1998). En la Figura 2, se presentan las cavidades de enlace para las cadenas de acilo del sustrato. Los aminoácidos que conforman estas cavidades tienen características hidrofóbicas.

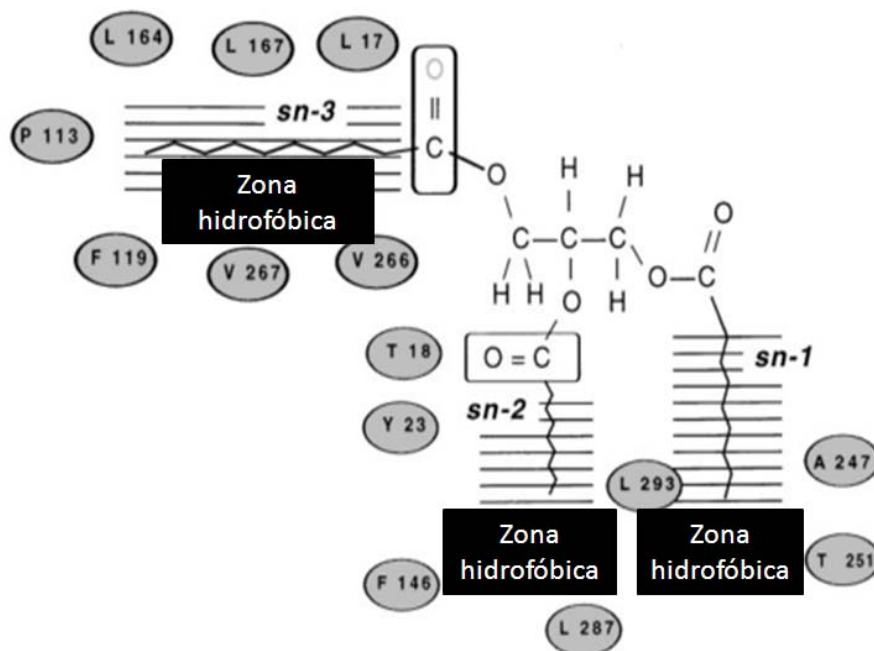


Figura 2. Sitios de enlace de cadenas de acilo en lipasas (Jaeger et al. 1999)

### 2.1.5 Mecanismo de catálisis

La hidrólisis inicia con la unión del triacilglicérido y la activación de los residuos de los aminoácidos serina e histidina, un protón del grupo hidroxilo de la serina es transferido a la histidina y su grupo imidazol neutraliza la carga del residuo ácido del sitio activo. Posteriormente se da un ataque nucleofílico al grupo carbonilo del enlace éster del triacilglicérido por parte del átomo de oxígeno del grupo hidroxilo de la serina para formar un intermediario tetraédrico, el cual contiene una carga negativa dada por el átomo de oxígeno del grupo carbonilo del enlace éster y cuatro átomos unidos al carbono del grupo carbonilo. El intermediario tetraédrico está estabilizado por la hélice  $\alpha$  C y por el enlace de hidrógeno entre la carga negativa del átomo de oxígeno del grupo carbonilo (oxianión) y los dos grupos NH de las glicinas de la secuencia consenso GX SXG (cavidad oxianiónica). El protón de la histidina es donado al átomo de oxígeno del enlace éster y el componente ácido del sustrato (cadena de acilo) es esterificado con el grupo hidroxilo de la serina para formar un intermediario covalente. En el siguiente paso se da un proceso de deacilación, en donde una molécula de agua participa en la reacción con el fin de romper el enlace entre la cadena acilada del sustrato y la enzima, teniendo como resultado que el componente acilado del sustrato se esterifique. El residuo de histidina dona un protón al átomo de oxígeno del residuo serina para romper el enlace éster entre la serina y el componente acilo del sustrato, en este paso la enzima vuelve a su conformación original (Jaeger et al. 1999). En la Figura 3 se muestra un diagrama del mecanismo de catálisis para lipasas.

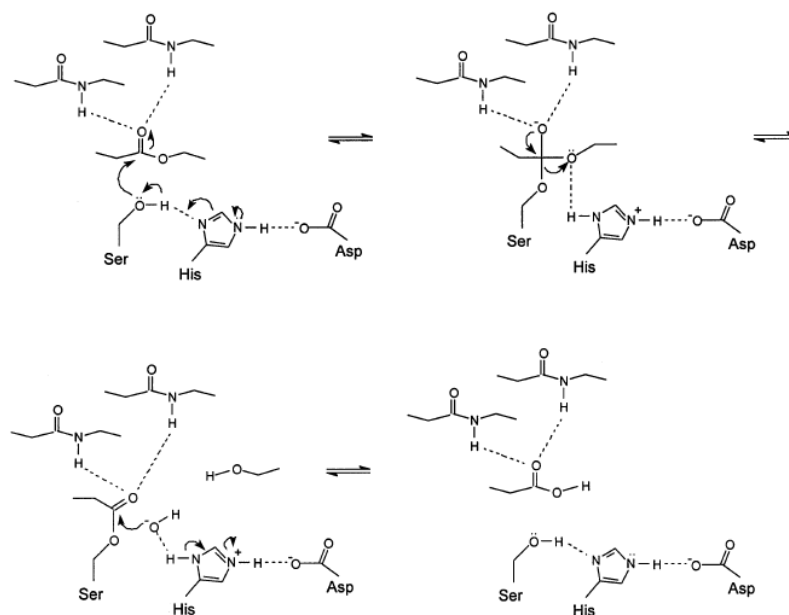


Figura 3. Mecanismo de catálisis en lipasas (Jaeger et al. 1999).

## **2.2 Catálisis en medios no acuosos**

Desde un punto de vista biotecnológico, el usar enzimas en solventes orgánicos permite la solubilidad de compuestos hidrofóbicos, implementar reacciones imposibles en agua por restricciones termodinámicas y recuperación eficiente del producto y la insolubilidad de las enzimas en medios orgánicos. Un modelo ideal para reacciones enzimáticas en solventes orgánicos debe satisfacer los siguientes criterios: (a) Disponibilidad de la enzima, (b) No requerir de cofactores ya que la mayoría son insolubles en solventes orgánicos, (c) Los sustratos deben ser solubles en solventes orgánicos (Zaks y Klivanov, 1985).

La aplicación de enzimas en solventes orgánicos es restringida ya que muchas de las enzimas son menos estables en presencia de solventes por lo que se han desarrollado métodos para mantener o aumentar la actividad y estabilidad de las enzimas para uso industrial. Estos métodos incluyen la inmovilización de enzimas en soportes, modificación química de las enzimas, modificaciones físicas con lípidos o surfactantes, encapsulamiento de enzimas en micelas e ingeniería molecular. Algunas enzimas, de manera natural, son tolerantes a medios orgánicos, las cuales son las mejores candidatas para aplicaciones biotecnológicas ya que no se requiere modificar la enzima (Okamoto & Ueji 2000).

### **2.2.1 Lipasas como catalizadores industriales**

Para proponer el uso de una lipasa para aplicaciones biotecnológicas es necesario que la enzima sea resistente a condiciones de trabajo como temperaturas altas o en solventes orgánicos. En la Tabla 3 se presentan algunos solventes usados en la industria y algunas características. El término coeficiente de partición es el cociente entre las concentraciones de una sustancia en mezcla formada por dos disolventes inmiscibles en equilibrio. Constante dieléctrica se refiere a la medida de las propiedades de un solvente para mantener cargas opuestas separadas. El parámetro de Reichardt-Dimroth es una medida de la polaridad ionizante (pérdida de la polaridad) de un disolvente basado en la longitud de onda máxima de la banda de absorción de mayor longitud de onda máxima de la banda de absorción de mayor longitud de onda de un disolvente determinado. El parámetro de solubilidad de Hildebrand se define como la suma de todas las fuerzas de atracción intermoleculares de una sustancia (Costa 2005). Laane y colaboradores (1987) han relacionado diferentes parámetros, como constantes dieléctricas, momentos



dipolares y coeficientes de partición, siendo éste el más usado para relacionar los efectos de los solventes en la actividad enzimática, sin embargo los solventes sólo se pueden relacionar si pertenecen al mismo grupo funcional, por ejemplo alcoholes y polioles.

## **2.2.2 Propiedades de los solventes**

### **2.2.2.1 Alcoholes**

Los alcoholes son compuestos de fórmula general ROH, donde R es cualquier grupo alquilo, incluso sustituido. El grupo puede ser primario, secundario o terciario; puede ser de cadena abierta o cíclica; puede contener un doble enlace, un átomo de halógeno, un anillo aromático o grupos hidroxilo adicional. Todos los alcoholes contienen el grupo hidroxilo (-OH), el cual al ser grupo funcional determina las propiedades características de esta familia (Morrison & Boyd 1998). Las propiedades físicas de un alcohol se comprenden mejor si reconocemos este hecho simple: estructuralmente, un alcohol es un compuesto formado por un alcano y agua. Los alcoholes contienen un grupo lipófilo y un grupo hidroxilo que es hidrófilo. De estas dos unidades estructurales, el grupo -OH da a los alcoholes sus propiedades físicas características y el alquilo es el que las modifica, dependiendo de su tamaño y forma (Morrison & Boyd 1998). El grupo -OH es muy polar y, lo que es más importante, es capaz de establecer puentes de hidrógeno con sus moléculas compañeras, con otras neutras y con aniones.

En los hidrocarburos, los factores que determinan puntos de ebullición suelen ser principalmente el peso molecular y la forma, lo que es de esperar de moléculas que se mantienen unidas esencialmente por fuerzas de Van der Waals. Los alcoholes también muestran un aumento del punto de ebullición al aumentar el número de átomos de carbono y una disminución del mismo con la ramificación. Sin embargo, lo más notable es el punto de ebullición tan elevado de los alcoholes, los cuales son mucho más altos que los de hidrocarburos del mismo peso molecular e incluso, más altos que los que muchos otros compuestos de polaridad considerable. Esto se debe a que los alcoholes, como el agua, son líquidos asociados: sus puntos de ebullición anormalmente elevados se deben a la mayor energía necesaria para romper los puentes de hidrógeno que mantienen unidas las moléculas. A pesar de que los éteres y aldehídos contienen oxígeno, sólo tienen hidrógeno enlazado con carbono, por lo que no son suficientemente

positivos como para enlazarse apreciablemente con el oxígeno (Morrison & Boyd 1998).

Tabla 3. Solventes usados en la industria y parámetros de solubilidad. Log P: Coeficiente de partición entre octanol y agua.  $\epsilon$ : Constante dieléctrica. ET: Parámetro de polaridad empírica de Reichardt- Dimroth. HS: Parámetro de solubilidad de Hildebrand. Sw/o: Solubilidad del agua en el solvente. So/w: Solubilidad del solvente en agua (Laane et al. 1987, McKarns et al. 1997, Reichardt 2004, Carrea & Riva 2008).

Solvente	Log P	$\epsilon$	ET	HS	Sw/o	So/w
DMSO	-1.3	47.24	0.450	-	-	-
DMF	-1.01	36.71	0.404	20.3	100	-
Metanol	-0.77	32.66	0.762	29.7	100	100
Etanol	-0.31	24.55	0.654	26.1	100	100
1,4-Dioxano	-0.27	2.21	0.164	20.7	100	100
Acetona	-0.24	20.56	0.355	20.5	100	100
Propanol	0.25	20.18	0.600	-	-	-
2-Butanona	0.29	18.51	0.327	19	10	24
Piridina	0.65	12.91	0.302	21.7	100	100
Acetato de etilo	0.73	6.02	0.228	18.6	2.94	8.08
1-Butanol	0.88	17.51	0.506	23.7	20.5	7.45
Éter dietílico	0.89	4.2	0.117	15.1	1.47	6.04
Diisopropil éter	1.52	3.88	0.102	14.4	0.57	1.2
Acetato de butilo	1.7	5.01	-	17.4	1.2	0.68
Benceno	2.13	2.27	0.111	18.7	0.0635	0.179
1,1,1-Tricloroetano	2.49	7.25	0.17	17.4	0.034	0.132
Tolueno	2.73	2.38	0.099	18.2	0.0334	0.0515
Hexano	3.98	1.88	0.009	14.9	0.0111	0.00123
Heptano	4.57	1.92	0.012	15.2	0.0091	0.000357

El comportamiento de los alcoholes como solutos también refleja la tendencia a formar puentes de hidrógeno. Al contrario de alcanos, los alcoholes de  $C_1$ - $C_4$  son miscibles en agua. Puesto que las moléculas de los alcoholes se mantienen unidas por el mismo tipo de fuerzas intermoleculares que las de agua, puede haber disolución de las dos clases de moléculas: la energía necesaria para romper un puente de hidrógeno entre dos moléculas de agua o dos de alcohol, es proporcionada por la formación de un puente de hidrógeno entre una molécula de agua y otra de alcohol. Sin embargo, esto es cierto sólo para alcoholes de  $C_1$ - $C_4$ , en los que el grupo hidrófilo  $-OH$  constituye una parte considerable de la molécula. A medida que el número de carbonos aumenta, disminuye la solubilidad del alcohol en agua. Para fines prácticos se considera que el límite entre solubilidad e

insolubilidad en agua se encuentra entre los cuatro y cinco átomos de carbono para alcoholes primarios (Morrison & Boyd 1998).

Los alcoholes por medio de sus grupos alquilo lipófilos, pueden disolver compuestos no iónicos, como sustratos orgánicos. A través de sus grupos  $-OH$  pueden disolver compuestos iónicos, como reactivos inorgánicos. Como disolventes próticos solvatan fuertemente a los aniones, especialmente por medio de puentes de hidrógeno y solvatan a los cationes a través de los pares electrónicos no compartidos del oxígeno (Morrison & Boyd 1998).

Los alcoholes, como el agua, contienen oxígeno cuyos pares de electrones no compartidos los hace básicos, aceptores de protones y su basicidad determina su comportamiento químico, como sustratos y como reactivos. Aceptan protones de ácidos para generar alcoholes protonados, ésta protonación les permite actuar como sustratos en la sustitución nucleofílica, algo que no pueden hacer en la forma no protonada. Los alcoholes también se pueden comportar como ácido con fuerza similar al del agua ya que el hidrógeno está ligado al oxígeno el cuál es muy electronegativo. La polaridad del enlace O-H facilita la separación de un protón; desde otro punto de vista, el oxígeno electronegativo acomoda muy bien la carga negativa de los electrones abandonados (Morrison & Boyd 1998).

#### **2.2.2.2 Cetonas**

Las cetonas son compuestos de fórmula general  $RR'CO$ . Los grupos R y R' pueden ser alifáticos o aromáticos. Tienen un grupo carbonilo  $C=O$  y a menudo se denominan compuestos carbonílicos. El grupo carbonilo es el que determina en gran medida las propiedades químicas de las cetonas. Las cetonas se oxidan con dificultad y son menos reactivas en adiciones nucleofílicas. El grupo carbonílico convierte a las cetonas en sustancias polares, por lo que tienen puntos de ebullición más elevados que los compuestos no polares de peso molecular comparable (Holum 2009). La acetona, dietil cetona, es la cetona comercial más importante. Tanto la acetona como la etil metil cetona son disolventes industriales comunes ya que disuelven una amplia variedad de sustancias orgánicas, tienen puntos de ebullición apropiados para que sean fáciles de destilar y su toxicidad es baja. Muchas cetonas se utilizan como saborizantes, como aditivos en los alimentos, y como precursores de medicamentos (Wade 2004).

### 2.2.2.3 Alcanos

Un alcano es un hidrocarburo de fórmula general  $C_nH_{2n+2}$ , que sólo contiene enlaces C-H. Los alcanos son la clase más simple y menos reactiva de todos los compuestos orgánicos, ya que sólo contienen carbono e hidrógeno, son hidrofóbicos, no tienen grupos funcionales, y se utilizan mayoritariamente como combustibles, disolventes y lubricantes. Los alcanos tienen densidades aproximadas de 0.7 g/ml, comparadas con la densidad de 1.0 g/ml del agua, teniendo como consecuencia que en una mezcla entre agua y alcanos se formen dos fases. Los alcanos de  $C_5$ - $C_8$ , como el hexano, son líquidos volátiles. Una de las ventajas de utilizar hexano en sistemas bifásicos es su punto de ebullición (69 °C), ya que ayuda en la separación de los productos en reacciones de síntesis (Wade 2004).

### 2.2.3 Ventajas y desventajas de usar enzimas en presencia de solventes orgánicos

El usar solventes orgánicos para reacciones enzimáticas en lugar de sistemas acuosos tiene ventajas y desventajas, ya que algunas enzimas desnaturalizan en medios orgánicos. En la Tabla 4 se describen algunas ventajas y desventajas de usar enzimas en solventes orgánicos.

Tabla 4. Ventajas y desventajas de usar solventes orgánicos en reacciones enzimáticas.

Ventajas	Desventajas
Se incrementa la solubilidad de sustratos hidrofóbicos.	Algunas enzimas pueden perder actividad.
Pueden producirse reacciones químicas que no son posibles en soluciones acuosas.	El uso de solventes con alta viscosidad limita la transferencia de masa.
El equilibrio termodinámico se ve favorecido a reacciones de síntesis.	En procesos en donde se requieren reacciones de condensación, se necesita controlar la actividad de agua.
Algunas enzimas pueden presentar especificidad solo por alguna región del sustrato o distinguir entre enantiómeros.	
Algunas enzimas pueden recuperarse y reusarse sin tener que inmovilizarlas.	
Se incrementan los rendimientos de separación de los productos.	
Algunas enzimas son termoestables en sistemas anhidros.	
Se eliminan los riesgos de contaminación microbiana.	

#### 2.2.4 Clasificación de los sistemas que usan solventes orgánicos

Dependiendo de la miscibilidad del solvente en el agua y la relación de éstos en el medio, se pueden encontrar tres tipos de sistemas:

- 1) **Co-solvente orgánico.** En este tipo de mezclas, el solvente usado es miscible en agua. Estos sistemas tienen la función de incrementar la solubilidad de los compuestos hidrofóbicos reduciendo las limitaciones de transferencia de masa, obteniendo mayor eficiencia catalítica. Este sistema tiene la ventaja de que modifica el equilibrio termodinámico a favor de reacciones de síntesis.
- 2) **Bifásico o sistema de dos fases.** En estos sistemas la enzima está disuelta en la fase acuosa y el sustrato se encuentra disuelto en la fase orgánica e interactúan entre sí cuando se da una emulsión. El producto presenta características hidrofóbicas por lo cual puede extraerse de la fase orgánica.
- 3) **Mezclas anhidras.** Las enzimas en forma nativa son insolubles en solventes orgánicos, por lo tanto, en este tipo de sistemas, la liofilización, la inmovilización y la modificación con compuestos anfipáticos son opciones para solubilizar enzimas. La liofilización puede causar daños en la estructura de las proteínas por lo que la co-liofilización con aditivos como algunos carbohidratos, polímeros y algunas sales previenen estos daños. La enzima proveniente de una solución acuosa en condiciones óptimas, presentan las mismas características catalíticas al liofilizarlas o precipitarlas, este fenómeno es llamado “Memoria al pH”. En estos sistemas las enzimas liofilizadas exhiben alta termoestabilidad, pero menor actividad que en sistemas acuosos. La actividad de agua es importante para la actividad enzimática. Como regla general se sabe que en solventes hidrofóbicos las enzimas muestran mayor actividad que en solventes hidrofílicos ya que la movilidad conformacional de las proteínas se restringe en sistemas con poco agua. En este tipo de sistemas, las reacciones más comunes son transesterificación de ésteres y síntesis de péptidos (Doukyu & Ogino 2010).

#### 2.2.5 Efecto de solventes orgánicos en enzimas

Una enzima en su forma nativa presenta una estructura tridimensional con geometrías precisas para poder transformar moléculas con exquisita fidelidad y selectividad en soluciones acuosas (Serdakowski & Dordick 2007). En medios no acuosos, las enzimas pueden presentar diferentes efectos como la separación de los diferentes monómeros que conforman a una enzima, si es el caso. Esto se refiere a que en conformación nativa,

el balance de la estructura proteica está dada por interacciones no covalentes, como puentes de hidrógeno, interacciones iónicas, fuerzas de Van der Waals e interacciones hidrofóbicas. El agua es un requisito para que se den estas interacciones. En presencia de solventes orgánicos estas interacciones se rompen teniendo como consecuencia la desestabilización de la estructura terciaria de la proteína. Una de las características de los solventes orgánicos polares es que éstos pueden penetrar dentro de la estructura de la proteína, siendo capaces de inducir cambios en las estructuras secundaria y terciaria. En enzimas con estados de transición altamente polares, la interacción con solventes orgánicos reduce la polaridad del sitio activo desestabilizando los estados de transición polares en la catálisis (Serdakowski & Dordick 2007). En la Figura 4 se presenta un modelo de interacción del agua (esferas azules) y del octano (esferas rojas) en el sitio activo de subtilisina haciendo una modelación de desplazamiento de moléculas de agua por parte de las moléculas de octano.

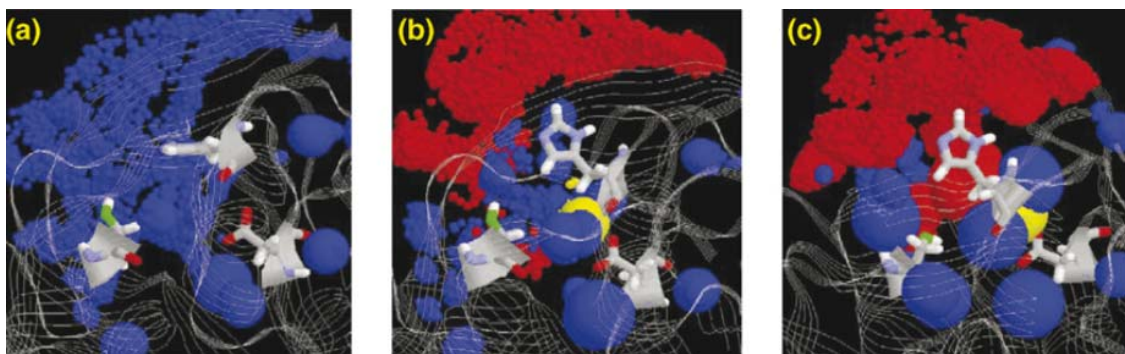


Figura 4. Representación de la interacción de agua y octano en el sitio activo de la subtilisina Carlsberg (Serdakowski & Dordick 2007)

### 2.2.5.1 Propiedades dieléctricas de las proteínas

Las proteínas son moléculas complejas definidas por las características de los aminoácidos que las componen. Para explicar y tratar de entender este tipo de propiedades hay que definir que son las constantes dieléctricas. La permitividad eléctrica (comúnmente conocida como constante dieléctrica) es una variable que mide la facilidad con la que un material puede ser polarizado en un campo eléctrico (dipolos atómicos y moleculares) y cuantifica el efecto del medio sobre las fuerzas de atracción de dos placas cargadas con polaridad diferentes (Moreno et al. 2007). En química, el medio en donde se da una reacción dictará el comportamiento de los reactivos, observando cambios cinéticos, teniendo como consecuencia variaciones en las constantes de velocidad (Harris 1973). En bioquímica, se ha estudiado el efecto de las



constantes dieléctricas del medio y el efecto de solventes, ligandos, pH y temperatura en medios de reacción. Pitera y colaboradores en el 2001, reportaron la simulación del efecto del cloroformo en la permitividad de la lisozima de huevo. En la Figura 5, se describe la estructura terciaria de esta proteína, en donde se señalan con tonos rojos los aminoácidos con carga positiva (lisina, arginina e histidina) y en tonos azules los aminoácidos con carga negativa (ácido aspártico y ácido glutámico), estos aminoácidos fueron analizados para calcular las fluctuaciones de momento dipolar y obtener la permitividad dieléctrica  $\epsilon(0)$ . Se prosiguió a analizar y excluir los aminoácidos con carga y las cargas de los N- y C-terminal para obtener la permitividad de las proteínas sin las cargas de los aminoácidos,  $\epsilon_{\text{proteína}}(0)$ . Al final se analizaron los átomos que forman las proteínas (H, N, C $_{\alpha}$ , C, y O),  $\epsilon_{\text{cadena polipeptídica}}(0)$ , encontrando que en cloroformo, la lisozima de huevo disminuía su permitividad ( $\epsilon$ ) 10 unidades, sin embargo no se encontraron diferencias significativas en la permitividad de la proteína ( $\epsilon_{\text{proteína}}$ ) ni en la permitividad de la cadena polipeptídica ( $\epsilon_{\text{cadena polipeptídica}}$ ), teniendo como control el análisis de la proteína en agua. Estos resultados muestran el efecto que pueden estar teniendo los solventes en los grupos funcionales que definen el momento dipolar total, ya que cuando se cristalizan proteínas en agua y en solventes orgánicos, el patrón de difracción es el mismo, siendo las características del medio las que modifican las cargas de la superficie de las proteínas.

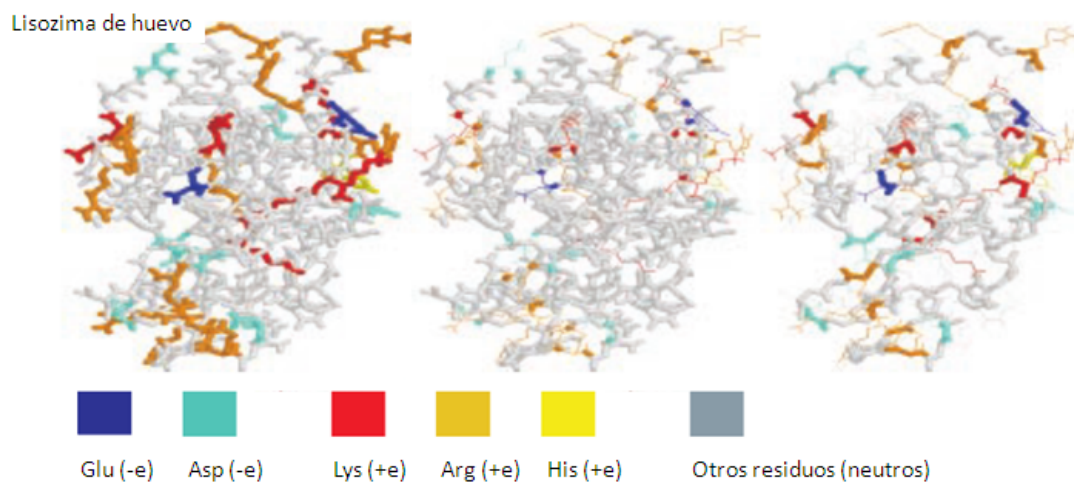


Figura 5. Residuos de aminoácidos afectados por la permitividad del medio de la lisozima de huevo incubada en cloroformo (Pitera et al. 2001). En tonos rojos se señalan los aminoácidos con carga positiva y en azul los que tienen carga negativa.

### **2.2.5.2 Participación del agua como reactivo**

Cuando el agua participa como reactivo o como producto de la reacción, el equilibrio hídrico se altera conforme la reacción se lleva a cabo. En estos casos no es seguro que la actividad de agua dicte el comportamiento de una enzima en una reacción, ya que en términos cinéticos la colisión de partículas y la difusión son esencialmente definidas por la concentración.

La cantidad de agua puede afectar la cinética de la reacción aun cuando no esté estequiométricamente involucrada. Las moléculas de agua pueden intervenir en el mecanismo de reacción entre un éster y un ácido catalizada por lipasas. En estas reacciones, el agua es necesaria para hidrolizar el intermediario acil-enzima. De esta manera el reemplazo del ácido graso se condensa regenerando agua y un nuevo y diferente complejo acil-enzima. En un caso así, el equilibrio hídrico total no se verá afectado, pero se puede esperar que a bajas actividades de agua la hidrólisis del complejo acil-enzima esté limitada (Huerta 2004).

Existen evidencias experimentales que indican que el equilibrio hídrico de un sistema de reacción en solventes orgánicos se alcanza rápidamente (Halling 1992). Sin embargo, hay razones para pensar que este equilibrio no es real, se sabe que la unión del agua a las proteínas presenta una histéresis significativa. Esto produce que la actividad de las enzimas pueda depender de la “historia hídrica”.

Además de medir la actividad de agua durante las reacciones en solvente orgánicos, se puede fijar un valor apropiado para la reacción con el uso de amortiguadores hídricos. Los diversos componentes de la reacción pueden previamente equilibrarse a un valor determinado de actividad de agua por medio del uso de soluciones saturadas en diversas sales.

### **2.2.5.3 Participación del sustrato entre el sitio activo y el solvente**

Las enzimas catalizan reacciones por medio de una interacción específica con el sustrato en un estado de transición para formar un complejo estabilizador enzima-sustrato como estructura preferencial. En esta unión al sustrato en su estado de transición, la enzima lo desestabiliza y se reduce la energía de activación de la reacción. Las enzimas comúnmente se unen a sustratos y productos de manera débil, con constantes de disociación entre  $10^{-3}$  y  $10^{-6}$  M. Sin embargo, las constantes de disociación de la enzima con los estados de transición pueden tener valores de  $10^{-24}$  M. La gran especificidad de las enzimas es debido a un estricto reconocimiento del sustrato por medio de

interacciones electroestáticas intermoleculares, principalmente puentes de hidrógeno e interacciones iónicas. Estas interacciones de carácter electrostático son mayores al interior del sitio activo debido al carácter hidrofóbico del mismo. En muchos casos, las cavidades que conforman los sitios activos contienen residuos aromáticos y alifáticos, sugiriendo que en las proteínas que ligan sustratos hidrofóbicos la interacción hidrofóbica puede ser la principal fuerza conductora del proceso (Huerta 2004).

En 1997, Kawaguchi y colaboradores estudiaron el reconocimiento de sustratos hidrofóbicos en las enzimas aspartato aminotransferasa (AspAT), aroma aminotransferasa (AroAT) y una enzima quimera (DY18), encontrando que a pesar de que 44% de los residuos de aminoácidos de AspAT y AroAT son conservados, al igual que el sitio activo, la flexibilidad y no la hidrofobicidad, es el factor determinante en la selectividad de la enzima cuando se trata de sustratos hidrofóbicos. Se sabe que ambas propiedades del sitio activo, hidrofobicidad y flexibilidad, son alteradas por la presencia de solventes orgánicos. Este efecto es debido, principalmente, al cambio en la constante dieléctrica del sistema lo cual acentúa las interacciones de carácter polar, reduciendo la flexibilidad, y además, disminuyendo la interacción hidrofóbica, cambiando la afinidad por el sustrato.

#### **2.2.5.4 Efecto de los solventes en el estado de transición de la enzima**

Una vía para el análisis del efecto de los solventes orgánicos en la actividad enzimática ha sido propuesto por Zaks & Klivanov (1988). Este método está basado en que el solvente afecta la selectividad enzimática sólo por medio de la energía libre de desolvatación de la porción del sustrato que se encuentra unida a la enzima en el estado de transición (complejo enzima-sustrato). El uso de esta metodología requiere de la construcción de modelos de los estados de transición enzima-sustrato, seguido del cálculo de sus energías libres de desolvatación relativas. Estas energías libres de desolvatación son estimadas por medio de los coeficientes de actividad provenientes de la Ley de Raoult y de la información obtenida en los modelos sobre la porción del estado de transición. Se ha demostrado en varios trabajos que el solvente orgánico afecta la selectividad de la enzima por medio de una diferencia de la energía libre de Gibbs de desolvatación para el estado de transición. Un análisis cuantitativo puede ser aplicado para la selectividad de una enzima para los sustratos A y B usando una ecuación derivada de los coeficientes de actividad de la ley de Raoult para las mitades desolvatadas del sustrato y en un solvente dado, donde los valores son para el sustrato A

y el sustrato B. Debido a que no se conoce la estructura cristalina de muchas enzimas y a que tampoco se sabe si la estructura de la enzima es la misma en su estado cristalina y en el estado liofilizado, no siempre se pueden usar los modelos moleculares de las proteínas para determinar los coeficientes de actividad de la región desolvatada del sustrato en el estado de transición.

### 2.2.6 Modificación del medio de reacción en solventes orgánicos

Como se ha mencionado anteriormente, la mayoría de las lipasas reducen su actividad catalítica en presencia de solventes polares. La teoría más aceptada para explicar este fenómeno, es que los solventes polares compiten con las proteínas por las moléculas de agua que forman la capa monomolecular BET. Solanki & Gupta, en 2011, analizaron la capacidad de transesterificación en hexanol y dimetilformamida de una lipasa de *Pseudomonas cepacia* adicionando ácidos carboxílicos anhidros, como el dianhidrido piromelítico, el cual interactúa con el grupo amino de la proteína (Figura 6), en donde se aumenta hasta 15 veces el rendimiento de la reacción.

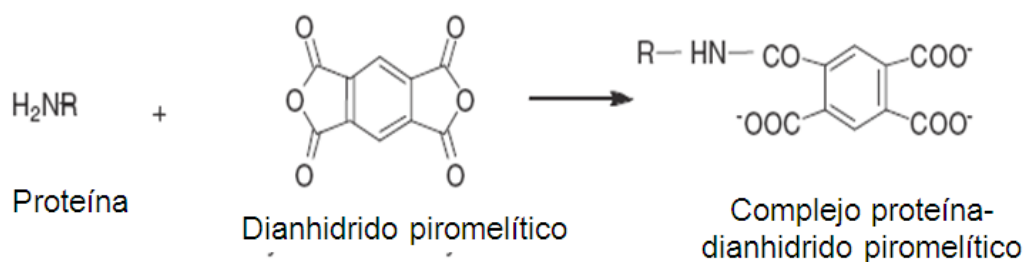


Figura 6. Modificación de medios no acuosos (Solanki & Gupta 2011).

### 2.2.7 Estabilización termodinámica de los sistemas de transición en solventes orgánicos

La mayor energía necesaria en una reacción enzimática es la que se da cuando el sustrato se une a la enzima. Muchas enzimas tienen sitios activos hidrofóbicos teniendo un incentivo energético para que los sustratos hidrofóbicos desplacen el agua cercana al sitio activo. Cuando el agua es reemplazada con solventes orgánicos, se estabilizan los estados de transición de los sustratos. El alterar el equilibrio termodinámico puede resultar en un decremento de la actividad enzimática. En 1998, Torres y colaboradores propusieron un modelo para evaluar el efecto de los solventes en la actividad, ya que el coeficiente de partición no se puede aplicar a solventes miscibles en agua. La hidrofobicidad (H) se considera como el coeficiente de partición del sustrato en el sitio activo de la enzima y en el medio no acuoso. Al incrementar la hidrofobicidad del

solvente, el sustrato se desplaza del sitio activo al medio no acuoso observando un decremento en la actividad catalítica. Este parámetro de hidrofobicidad correlaciona la actividad termodinámica del solvente orgánico en la mezcla de reacción y es inversamente proporcional a la polaridad del solvente. Ng y Tsai (2005) estudiaron las propiedades de una lipasa de papaya para la síntesis de fármacos, especialmente el naproxeno y encontraron diferencias en las energías de activación para la discriminación de enantiómeros así como una compensación entre entalpía-entropía y lo atribuyeron a la similitud de cadena de acilo de los sustratos.

### **2.2.8 Inactivación de enzimas en solventes orgánicos**

En general, el plegamiento de la estructura terciaria de las proteínas en medios acuosos da como resultado que los grupos polares en el exterior de la molécula interactúen con el medio y los grupos no polares a formar una coraza hidrofóbica dentro de la proteína. La estructura de la proteína se mantiene gracias al balance de las interacciones hidrofóbicas, interacciones electroestáticas, fuerzas de Van der Waals y puentes de hidrógeno y la desnaturalización de las proteínas se da cuando el equilibrio de las interacciones se rompe. En medios orgánicos, la pérdida de actividad enzimática se debe al rompimiento de la coraza hidrofóbica dentro de la proteína. Los solventes polares pueden penetrar dentro de la proteína para inducir algunos cambios estructurales a diferencia de los solventes no polares. La flexibilidad conformacional de las proteínas es crucial para mantener la actividad biológica de las proteínas. Las enzimas requieren de ciertas moléculas de agua unidas a la superficie de la estructura para funcionar. Como ya se mencionó anteriormente, en medios anhidros, la actividad decrece considerablemente, sin embargo, se ha comprobado que añadiendo una cantidad mínima de agua, puede conservarse la actividad (Serdakowski & Dordick 2007).

### **2.2.9 Uso de solventes en síntesis**

En 1996, Cerovsky y Jakubke estudiaron la especificidad nucleofílica de la subtilopectidasa A y encontraron que no es una opción viable para síntesis de péptidos en medios acuosos, pero explicaron las bases moleculares porque si es una buena opción en medios orgánicos. Investigaron las constantes de partición de la subtilopectidasa acilada en agua y en 10% de acetonitrilo, y una serie de derivados de aminoácidos teniendo glicina como nucleófilos concluyendo que los solventes orgánicos bajo condiciones alcalinas, los grupos amino de los nucleófilos se encuentran

desprotonados, siendo esto un requisito para que los nucleófilos participen en la transferencia de acilos. También se encontró que se necesitan residuos de glicina continuos u otros residuos hidrofílicos pequeños para que puedan participar en la reacción y se dedujo que existen interacciones electroestáticas entre los residuos cargados negativamente de la enzima y los residuos cargados positivamente del sustrato, concluyendo que los péptidos (sustratos) con residuos hidrofílicos alrededor de glicina en suspensiones orgánicas presentan características nucleofílicas al contrario de aminoácidos alifáticos y aromáticos alrededor de glicina.

#### **2.2.10 Efecto de solventes orgánicos en lipasas de origen marino**

El amplio uso de enzimas en procesos industriales ha creado la necesidad de identificar nuevas fuentes de enzimas de bajo costo. El potencial uso de peces y otros organismos marinos como los crustáceos como fuentes de lipasas sigue en investigación. En 2007, Aryee y colaboradores, reportaron la caracterización bioquímica de una lipasa proveniente de las vísceras del pez *Mugil cephalus* encontrando actividad enzimática en solventes polares como metanol, propanol, acetona y dimetil sulfóxido a concentraciones de 10 y 25% de solvente en la mezcla de reacción. A 50% de solventes polares, no se encontró actividad catalítica. En solventes inmiscibles en agua, la actividad enzimática aumentó, hasta 326% en hexano y 174% en octano.

En 2010, Kurtovic y colaboradores purificaron y caracterización lipasas digestivas de dos peces *Oncorhynchus tshawytscha* y *Macruronus novaezelandiae* evaluando el efecto de solventes orgánicos en la estabilidad de estas lipasas. En concentraciones de 10% de metanol, propanol y acetona se encontró actividad catalítica, en concentraciones de 50%, sólo en propanol, estas lipasas presentaron actividad. Cuando se evaluó la estabilidad de estas lipasas en solventes inmiscibles, la actividad residual fue de 82 y 90% en hexano. Sólo en heptano, la actividad de la lipasa de *Macruronus novaezelandiae* aumento su actividad residual a 103%.

Poco se sabe sobre las lipasas de crustáceos y su estabilidad en solventes orgánicos. En 2009, Cherif y Gargouri evaluaron el efecto de solventes polares en la actividad enzimática de una lipasa digestiva del cangrejo *Carcinus mediterraneus* encontrando un aumento de la actividad residual de hasta 110% en metanol. En acetona, etanol y



propanol, la actividad se mantuvo entre 92 y 100%. En butanol no se encontró actividad catalítica.

En 2011, Rivera y colaboradores purificaron y caracterizaron dos lipasas, una digestiva y una intracelular de camarón blanco *Penaeus vannamei* encontrando que en la estructura primaria es diferente al resto de las lipasas reportadas y que pueden hidrolizar sustratos con cadena de acilo corta como larga, teniendo mayor especificidad por sustratos con insaturaciones, por lo que para este trabajo se planteó buscar nuevas características de estas lipasas para futuras aplicaciones biotecnológicas, como lo es la estabilidad en solventes orgánicos y su estabilidad cuando se exponen a temperaturas mayores a la óptima.

### 3. Hipótesis

Si la estructura primaria de las lipasas de camarón blanco *Penaeus vannamei* no presenta similitud con la estructura primaria de las lipasas microbianas que pierden su actividad enzimática en solventes orgánicos polares, entonces se espera que las lipasas de camarón blanco presenten actividad enzimática en solventes orgánicos polares al igual que la lipasa digestiva de *Carcinus mediterraneus*.

### 4. Objetivo

Evaluar el efecto de solventes orgánicos en la actividad enzimática de las lipasas digestiva e intracelular de *Penaeus vannamei* y en su estabilidad térmica, así como también en las constantes de cinéticas.

#### 4.1 Objetivos específicos

- Purificación de lipasas digestiva e intracelular de *Penaeus vannamei*.
- Cuantificar el efecto de los solventes orgánicos en la actividad de lipasa digestiva e intracelular.
- Evaluar el efecto de solventes y temperaturas mayores a la óptima en la actividad de las lipasas digestiva e intracelular.

## **5. Materiales y métodos**

### **5.1 Obtención de muestras**

Se disectaron 30 organismos adultos del género *Penaeus vannamei* con el fin de extraer glándula digestiva y pleópodos. Posteriormente los tejidos se homogenizaron en los siguientes amortiguadores: PBS 50 mM (1:4 p/v) para glándula digestiva y Tris-HCl 50 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5 M pH 8 para pleópodos. Los extractos se centrifugaron por 30 min, 10,000 g, 4 °C. El sobrenadante del extracto de las glándulas digestivas (extracto crudo para cromatografía de exclusión molecular) y de pleópodos (extracto crudo para cromatografía de interacción hidrofóbica) fueron almacenados a -20°C hasta su análisis. La concentración de proteína de los extractos crudos fue determinada por el método de Bradford (1976) empleando albúmina sérica bovina como estándar.

### **5.2 Cuantificación de la actividad de lipasa**

La actividad de lipasa fue evaluada con MUF-butirato (Sigma 19362) 100 µM disuelto en 1 ml de dimetil sulfóxido y 49 ml de amortiguador Tris-HCl pH 8. La fluorescencia fue medida a 355 nm (excitación) y 460 nm (emisión) por 10 min en un fluorómetro (BioTek Synergy 4). Se preparó una curva estándar con 4-metilubeliferona con concentraciones de 40 a 360 nM (Sigma, M1381). A partir de la ecuación de la curva se calculó la cantidad de nM de 4-metilubeliferona liberada por minuto.

### **5.3 Purificación de la lipasa digestiva**

#### **5.3.1 Cromatografía de exclusión molecular**

El extracto crudo de la glándula digestiva fue aplicado a una columna NAP<sup>TM</sup>-10 Sephadex G25 (Amersham Biosciences) equilibrada con amortiguador PBS y se eluyó con 1.5 ml de amortiguador PBS. Posteriormente, las proteínas del extracto crudo fueron separadas por filtración en gel con una columna HiLoad Superdex 200 16/60 (Amersham Biosciences) con un volumen de 150 ml de fase estacionaria, las proteínas fueron eluidas empleando 175 ml de amortiguador PBS con un flujo de 1 ml/min. Se colectaron 50 fracciones de 5 ml cada una, las cuales fueron concentradas por centrifugación (AMICON® Ultra-15, Millipore) a 4,000 g por 15 min a 4 °C hasta obtener un volumen final de 1 ml.

### **5.3.2 Cromatografía de intercambio aniónico**

Las fracciones con actividad de lipasa obtenidas de la cromatografía de filtración en gel fueron aplicadas a una columna NAP<sup>TM</sup>-10 Sephadex G25 (Amersham Biosciences) equilibrada con Tris-HCl 50 mM pH 8. Posteriormente, la muestra fue aplicada a una columna de intercambio aniónico, Q-Sepharose (Pharmacia, Biotech), la cual fue previamente equilibrada con amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 8.0. Las proteínas adsorbidas a la fase estacionaria se eluyeron con un gradiente de NaCl (0–1 M). El flujo de salida de la columna fue de 1 ml/min y el volumen final de elusión fue 35 ml. Se colectaron fracciones de 500 µl cada una. Las fracciones con la enzima aislada fueron almacenadas a -20 °C.

### **5.4 Purificación de la lipasa intracelular**

Las proteínas del extracto de pleópodos fueron separadas por una cromatografía de interacción hidrofóbica con una fase estacionaria de fenil-sefaroza CL-4B (1 ml) (Amersham) la cual fue previamente equilibrada con amortiguador Tris-HCl 50 mM, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5 M, pH 8. La columna fue lavada con el amortiguador de equilibrio y las proteínas que no se adsorbieron fueron removidas durante el lavado. Las proteínas adsorbidas se eluyeron con Tris-HCl 50 mM pH 8. Dada la fuerte interacción de la proteína a purificar con el soporte se hizo una segunda elusión mediante un gradiente de propanol (0 – 100%). El flujo fue de 1 ml/min, el volumen final de elusión fue 20 ml y se colectaron fracciones de 500 µl cada una. El solvente fue removido por centrifugación (AMICON® Ultra-15, Millipore) a 4,000 g por 15 min a 25 °C, la muestra concentrada y sin solvente fue almacenada a 0 °C.

### **5.5. Electroforesis y zimogramas para lipasas**

Las proteínas fueron analizadas mediante electroforesis bajo condiciones no reductoras (Laemmli, 1970). Las muestras fueron diluidas (1:2) con amortiguador de muestra (Tris-HCl 0.125 M, 2% SDS, 20% v/v glicerol, 0.04% bromofenol azul, pH 6.8). La separación de las proteínas se llevó a cabo a 15 mA y 2 °C. El gel fue teñido con una solución de azul de Coomassie (R- 250) 0.1% en ácido acético 7.5% y metanol 5% a temperatura ambiente y el gel fue desteñido con ácido acético 10% y metanol 40%.

La actividad de lipasa fue revelada en zimogramas utilizando el método de Prim et al., 2003. El gel fue incubado en 50 ml de amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 8.0, conteniendo 1% de Tritón X-100 con el fin de reducir el exceso de SDS.

Posteriormente, el gel fue sumergido en una solución de MUF-butilato 100  $\mu\text{M}$  en el mismo amortiguador sin Tritón X-100 por 10 min. El gel se reveló bajo luz ultravioleta.

### **5.6 Evaluación de la actividad enzimática de la lipasa digestiva e intracelular en presencia de solventes orgánicos**

Se incubaron 5  $\mu\text{g}$  de cada enzima en acetona, metanol, etanol, propanol, butanol, dimetil sulfóxido y hexano (SIGMA) a concentraciones de 10-50% en la mezcla de reacción a 30 °C y amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 8 por 30 minutos. Para cada concentración de solvente se evaluó el efecto de ésta en la estabilidad del sustrato. Después de la incubación de las enzimas en solventes, se evaluó la actividad enzimática.

### **5.7 Evaluación de la actividad enzimática de la lipasa digestiva e intracelular en presencia de solventes orgánicos y a temperaturas mayores a la óptima**

Se incubaron 5  $\mu\text{g}$  de lipasa digestiva en metanol y etanol y 5  $\mu\text{g}$  de lipasa intracelular en metanol, etanol y dimetil sulfóxido (SIGMA) a concentraciones de 10-50% en la mezcla de reacción en un Termomixer Comfort (Eppendorf) a 40 y 50 °C y amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 8 durante 30 minutos. Después de la incubación de las enzimas en solventes, se evaluó la actividad enzimática y el efecto de los solventes y la temperatura en la estabilidad del sustrato.

## 6. Resultados

### 6.1 Purificación de la lipasa digestiva

#### *Paso 1. Exclusión molecular*

La lipasa digestiva fue purificada por medio de cromatografía de exclusión molecular con el objetivo de separar a la proteína de interés de proteasas del tipo serino que pudieran hidrolizarla. La Figura 7a muestra un cromatograma de filtración en gel en donde se señalan las fracciones con actividad de lipasa con área sombreada, en la Figura 7b se presentan geles de electroforesis para evidenciar el fraccionamiento de las proteínas de la glándula digestiva y un zimograma mostrando las fracciones con actividad enzimática.

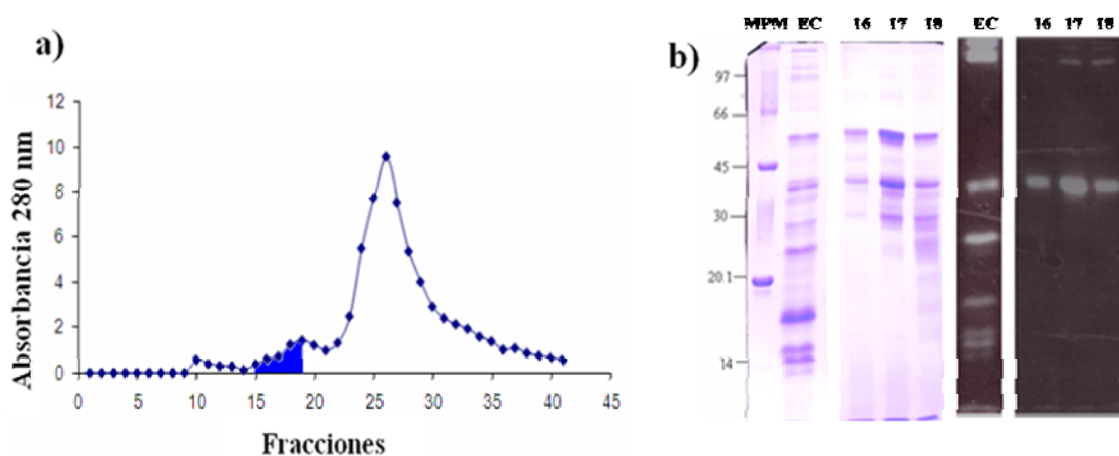


Figura 7. Cromatografía de exclusión molecular. a) Cromatograma mostrando fracciones con actividad de lipasa, b) SDS-PAGE 12% teñido con azul de Coomassie y zimograma revelado con luz ultravioleta. MPM: Marcador de pesos moleculares, EC: Extracto crudo.

#### *Paso 2. Intercambio iónico*

Las fracciones con actividad de lipasa obtenidas en la cromatografía de exclusión molecular fueron concentradas para posteriormente cambiarlas de amortiguador a Tris-HCl 50 mM pH 8.0. Las proteínas se separaron de acuerdo a su carga usando un intercambiador aniónico y concentración creciente de NaCl para eluir las proteínas adsorbidas. En la Figura 8a se muestra el cromatograma de este paso de purificación, la línea continua representa la absorción de las proteínas a 280 nm y la línea punteada representa un gradiente de NaCl, la Figura 8b muestra un gel de electroforesis con las fracciones que contienen a la lipasa digestiva pura y un zimograma evidenciando actividad enzimática.

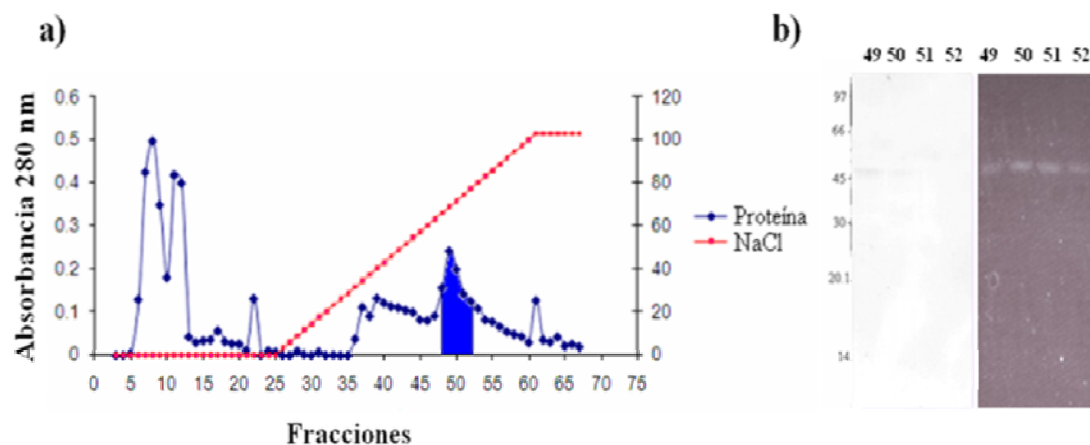


Figura 8. Cromatografía de intercambio iónico. a) Cromatograma mostrando fracciones con actividad de lipasa, b) SDS-PAGE 12% teñido con azul de Coomassie y zimograma revelado con luz ultravioleta.

## 6.2 Purificación de la lipasa intracelular

Con el objetivo de purificar la lipasa intracelular de *Penaeus vannamei* se recurrió a una cromatografía de interacción hidrofóbica, eluyendo las proteínas con un gradiente inverso de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . La Figura 9a muestra un cromatograma representando la separación de proteínas. La línea indica la absorción de las fracciones a 280 nm y el área sombreada representa la actividad enzimática de las fracciones. En la Figura 9b se muestran geles de electroforesis al 8% en donde se evidencia la purificación de la enzima y su actividad enzimática por medio de zimogramas.

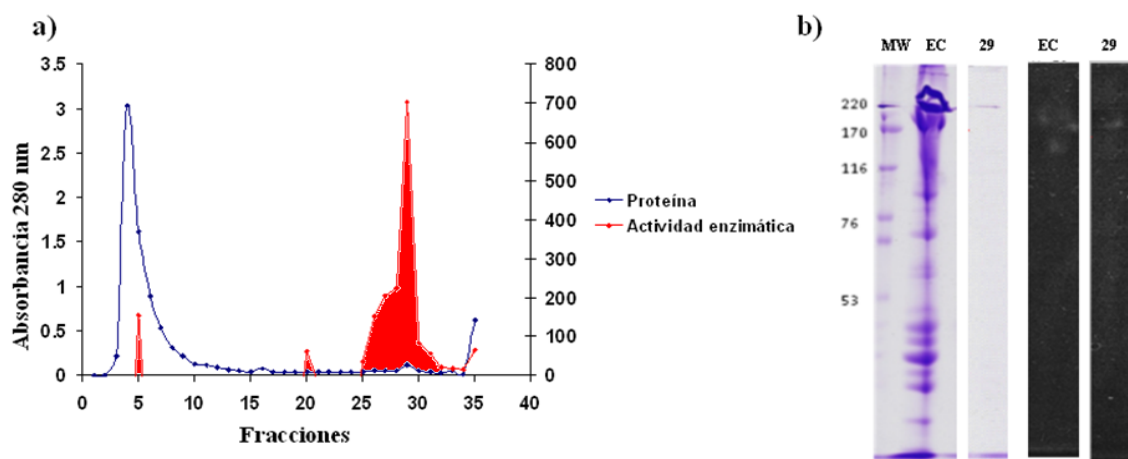


Figura 9. Cromatografía de interacción hidrofóbica. a) Cromatograma mostrando fracciones con actividad de lipasa, b) SDS-PAGE 12% teñido con azul de Coomassie y zimograma revelado con luz ultravioleta.

## 6.3 Efecto de los solventes orgánicos en la actividad de la lipasa digestiva

La actividad enzimática aumentó 25 y 20% en 10 y 20% de metanol. A partir de 30% de metanol, la actividad enzimática disminuyó hasta obtener 10% de actividad residual en

50% metanol en la mezcla de reacción. En etanol y propanol la actividad enzimática disminuyó al aumentar la concentración de solvente en la mezcla de reacción. Cuando la enzima fue incubada en butanol, no se encontró actividad a ninguna concentración del solvente. Cuando la enzima se incubó en acetona y dimetil sulfóxido, la actividad disminuyó conforme aumento la concentración de solvente en la mezcla de reacción. En hexano, la actividad aumentó hasta 125% a concentraciones de 10 y 20% en la mezcla de reacción, sin embargo a partir de 30% se perdió la actividad por completo (Figura 11).

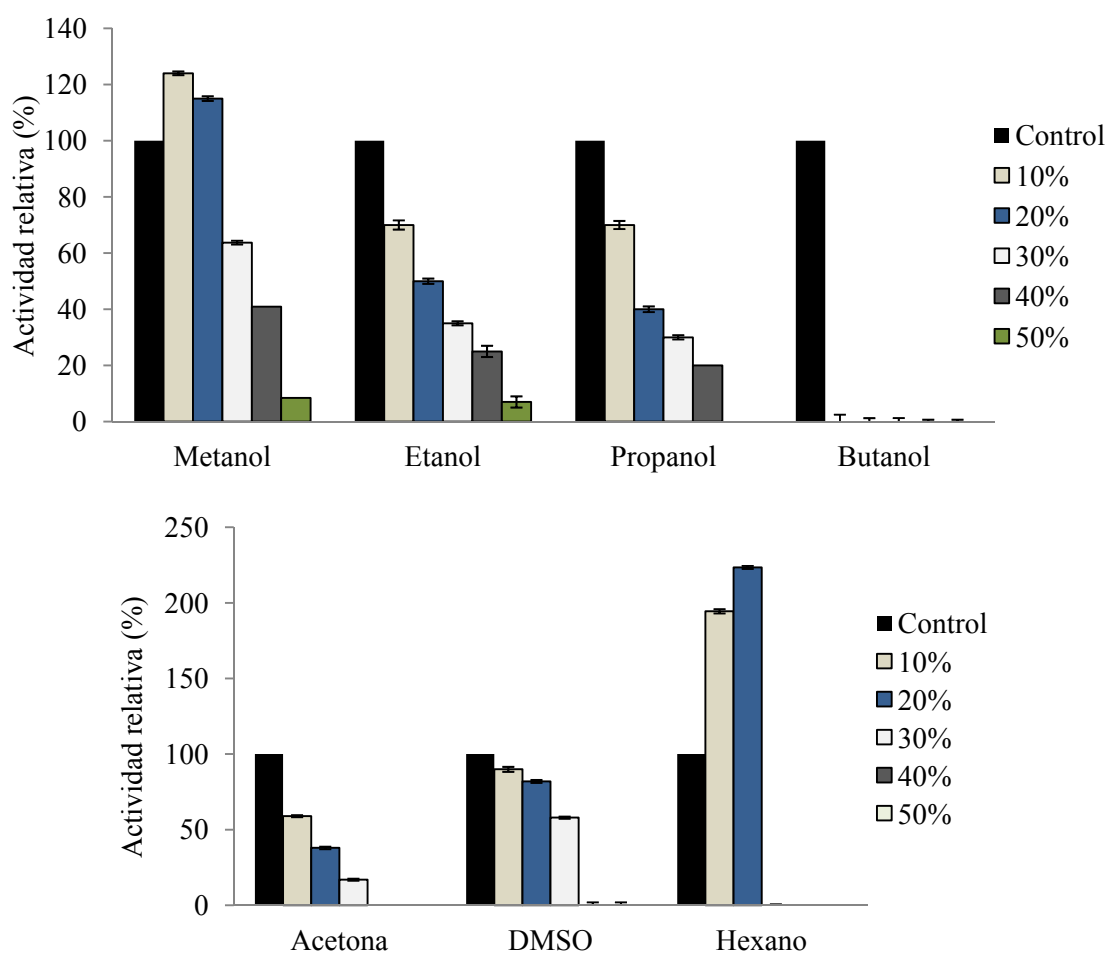


Figura 10. Efecto de solventes orgánicos en la actividad de la lipasa digestiva de *P. vannamei*.

#### 6.4 Efecto de la temperatura en la actividad enzimática de la lipasa digestiva en metanol y etanol

Dado que el agua es el principal factor en la desnaturalización de proteínas por el aumento de la temperatura, se evaluó el efecto que tenía la disminución de ésta, midiendo el efecto de los solventes en la desnaturalización de proteínas por calor. En la



Figura 11 se puede observar que a 40 °C la actividad de la lipasa digestiva aumentó cuando fue expuesta a concentraciones de 10 a 40% de metanol en la mezcla de reacción. A 50 °C y a las concentraciones de 30 y 40% de metanol, la actividad fue mayor que a la reportada a su temperatura óptima (30 °C).

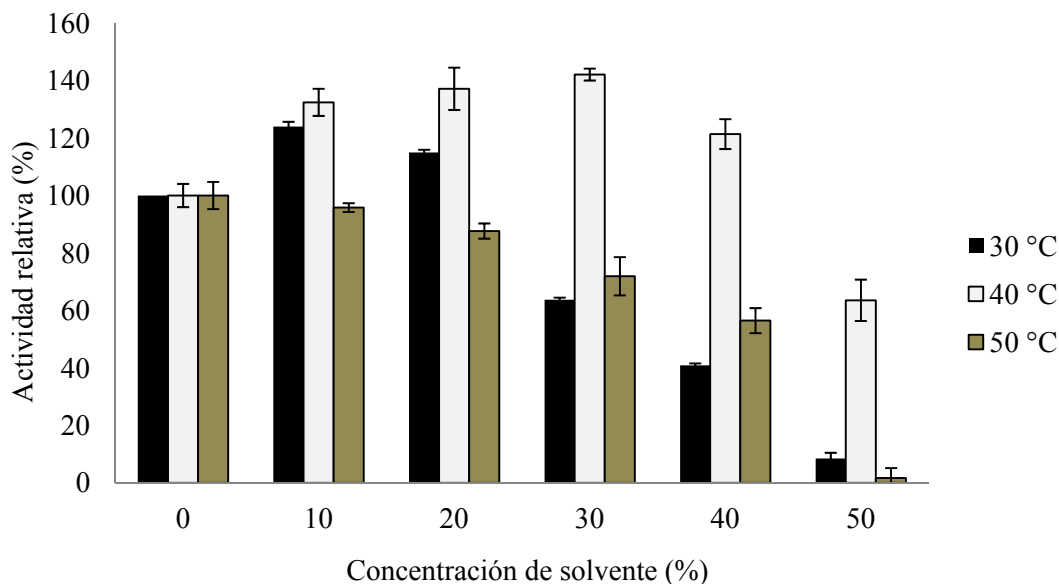


Figura 11. Efecto de temperatura y metanol en la actividad enzimática de la lipasa digestiva.

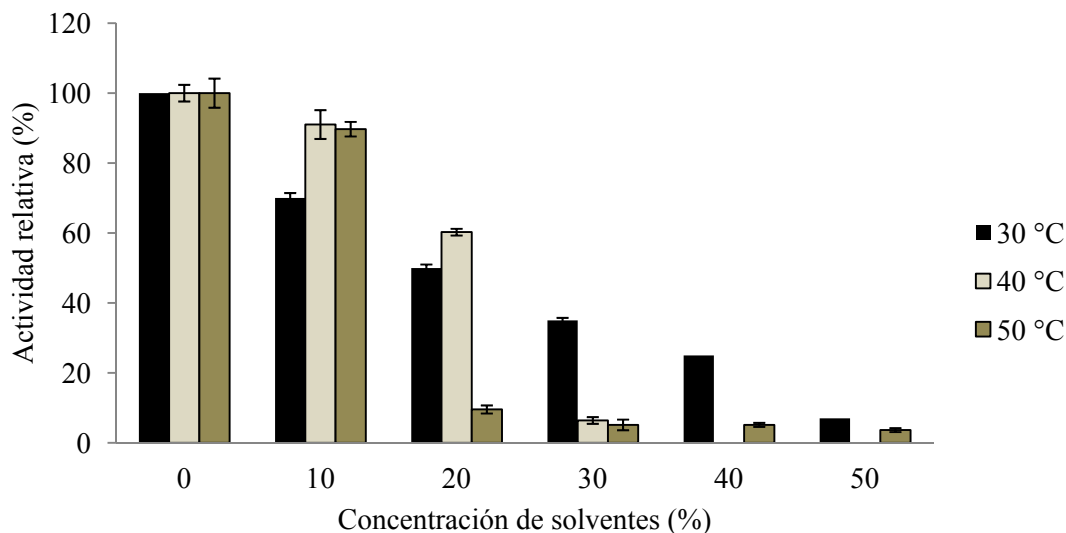


Figura 12. Efecto de temperatura y etanol en la actividad enzimática de la lipasa digestiva.

Al evaluar el efecto del etanol en la estabilidad térmica de la lipasa digestiva se encontró que con 10% de etanol en la mezcla de reacción a 40 y 50 °C se mantuvo el 95% de la actividad residual, mayor que la reportada a su temperatura óptima (30 °C). A 20% de etanol, la actividad enzimática fue mayor a 40 °C y conforme aumentó la

concentración de solvente la actividad disminuyó hasta alcanzar menos del 20% de la actividad residual. Al incubar la enzima con etanol y 50 °C, la enzima perdió 80% de su actividad residual desde 20% de etanol en la mezcla (Figura 12).

### 6.5 Efecto del metanol en la especificidad de la lipasa digestiva

Se incubó la lipasa digestiva en 10% de metanol y se midió actividad enzimática con concentraciones de sustrato de 10 a 100  $\mu\text{M}$ . La especificidad de la enzima por el sustrato aumentó al igual que la tasa de recambio, la eficiencia catalítica y la velocidad máxima (Tabla 5).

Tabla 5. Efecto del metanol en las constantes cinéticas de la lipasa digestiva.

	$V_{\text{max}}$ (mM/min)	$K_m$ (mM)	$K_{\text{cat}}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$K_{\text{cat}} / K_m$ ( $\text{mM}^{-1}\text{min}^{-1}$ )
Agua	40.81	67.16	136.05	2.025
10% metanol	161.29	59.01	537.63	9.110

### 6.6 Efecto de los solventes orgánicos en la actividad enzimática de la lipasa intracelular

Cuando la lipasa intracelular se incubó en solventes, a concentraciones de 10% de propanol en la mezcla de reacción la actividad disminuyó, perdiéndose por completo a 40 y 50% de propanol. En 10% de acetona, la actividad aumentó, y se mantuvo a 20%. A partir de 30% la actividad disminuyó hasta 60% de actividad residual. En etanol y dimetil sulfóxido la actividad aumentó en concentraciones de 10 y 30% de solvente, sin embargo a concentraciones de 20 y 40% la actividad disminuyó. Con 50% de dimetil sulfóxido la actividad aumentó y con etanol la actividad disminuyó 20% de actividad residual. Cuando la enzima se incubó en butanol, la actividad se mantuvo hasta concentraciones de 40% de solvente en la mezcla de reacción, en 50% de butanol, la actividad residual solo disminuyó 25%. En metanol se observó un efecto similar al de etanol y dimetil sulfóxido, sólo que a 10, 30 y 40% de metanol la actividad disminuyó, y a concentraciones de 20 y 50% la actividad aumentó (Figura 14).

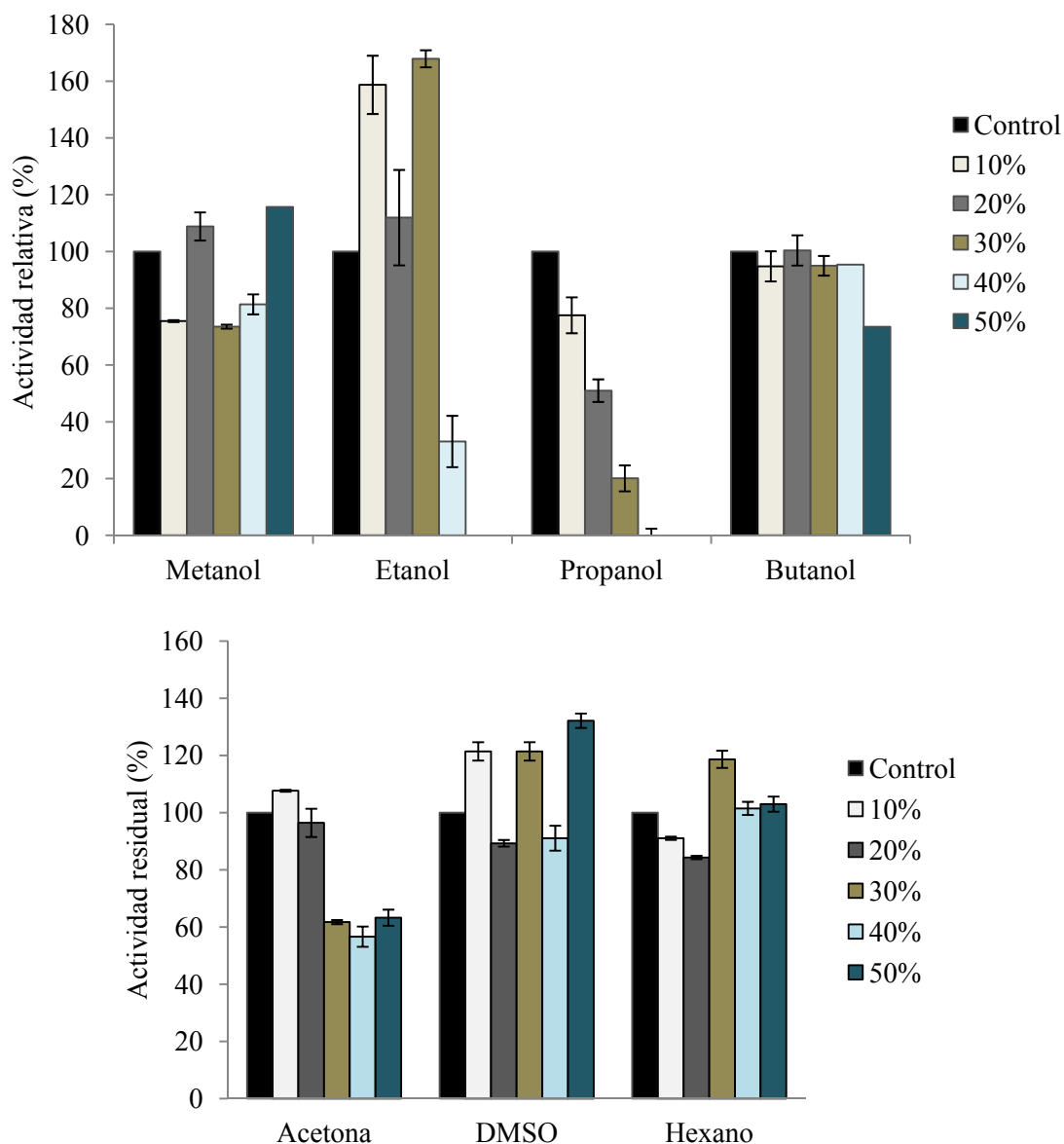


Figura 13. Efecto de solventes orgánicos en la actividad enzimática de la lipasa intracelular de *P. vannamei*.

### 6.7 Efecto de la temperatura en la actividad enzimática de la lipasa intracelular incubada en metanol, etanol y DMSO.

La lipasa intracelular aumentó su actividad relativa a 40 °C conforme se incrementó la concentración de metanol en la mezcla de reacción; a 50 °C la actividad relativa aumentó hasta 5 veces en 20% de etanol (Figura 15). Cuando la enzima fue incubada en metanol y 40 °C, la actividad enzimática aumentó casi el doble en concentraciones de 10, 20, 40 y 50% de solvente. En 30% de metanol no se encontraron diferencias significativas cuando se comparó con el control.

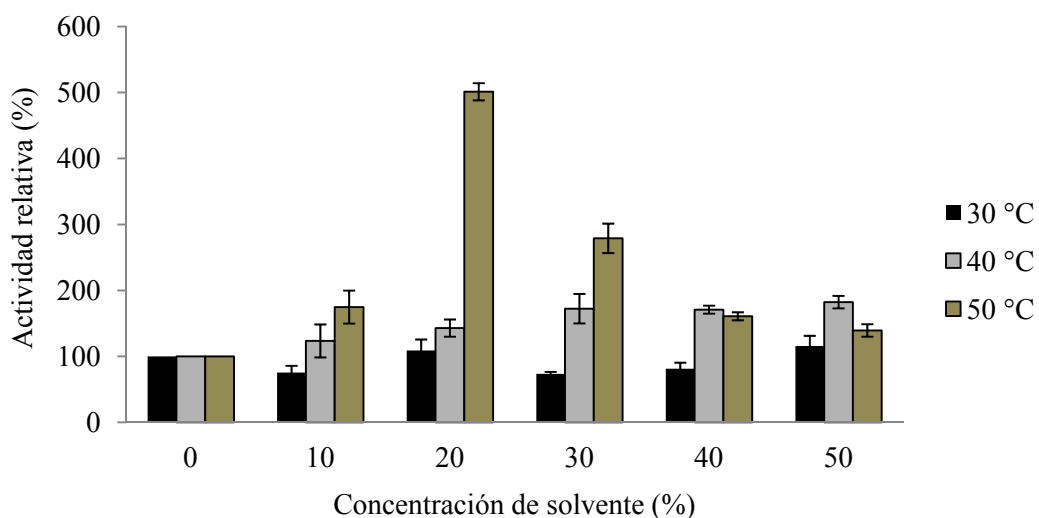


Figura 14. Efecto del etanol y la temperatura en la actividad enzimática de la lipasa intracelular.

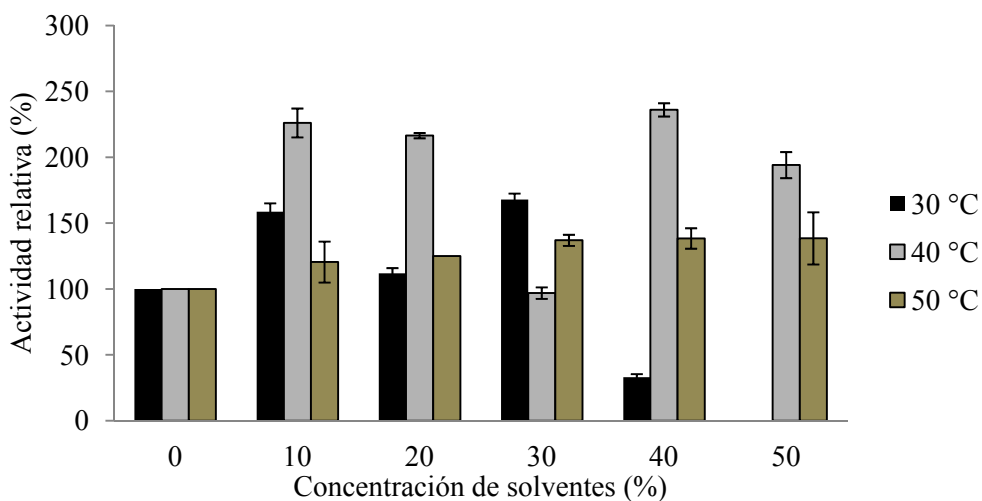


Figura 15. Efecto del metanol y la temperatura en la actividad enzimática de la lipasa intracelular.

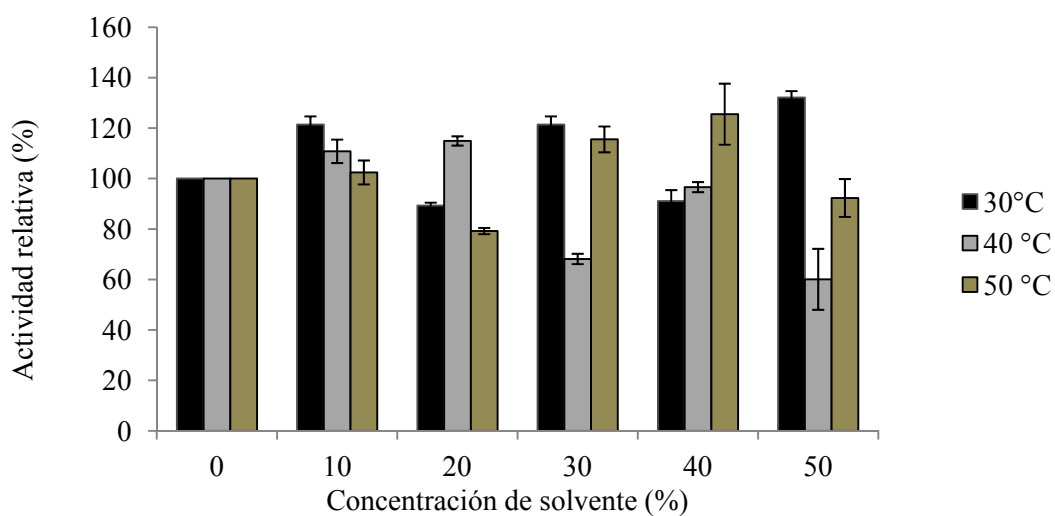


Figura 16. Efecto del DMSO y la temperatura en la actividad enzimática de la lipasa intracelular.

Al evaluar el efecto de la temperatura y el DMSO en la actividad de la lipasa intracelular, ésta disminuyó cuando se incubó a 10% de solvente, esto comparando con la actividad enzimática de la enzima a temperatura óptima. En general la enzima presentó ser estable en DMSO y temperaturas altas.

### 6.8 Efecto del metanol en la especificidad de la lipasa intracelular

Al incubar la lipasa intracelular en 10% de metanol, no solo aumentó su actividad relativa, también aumentó la velocidad máxima de reacción y la eficiencia catalítica, pero la especificidad de la enzima por el sustrato disminuyó al igual que la tasa de recambio.

Tabla 6. Efecto del metanol en las constantes cinéticas de la lipasa intracelular.

	V <sub>max</sub> (mM/min)	K <sub>m</sub> (mM)	K <sub>cat</sub> (min <sup>-1</sup> )	K <sub>cat</sub> / K <sub>m</sub> (mM <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )
Agua	33.33	24.49	81.63	3.33
10% metanol	357.14	246.89	71.42	0.28

## 7. Discusión

Aryee y colaboradores (2007) evaluaron el efecto de solventes orgánicos en la actividad de una lipasa proveniente de vísceras de la liza *Mugil cephalus* y encontraron que los solventes orgánicos polares disminuyeron la actividad enzimática a concentraciones de 10% de solvente en la mezcla de reacción y sólo en dimetil formamida la actividad fue de 100%. Cuando la enzima se incubó en 100% de hexano, la actividad aumentó hasta 326%. En 2010, se purificaron y caracterizaron dos lipasas digestivas de los peces *Oncorhynchus tshawytscha* y *Macrurus novaezelandiae* y dentro de la caracterización se evaluó el efecto de solventes orgánicos en la actividad enzimática y se reportó que metanol, propanol y acetona produjeron una disminución de la actividad desde 10% para las dos lipasas. En hexano, las lipasas sólo perdieron el 20% de la actividad (Kurtovic et al. 2010). Al comparar los resultados obtenidos en este trabajo con los de Cherif & Gargouri (2009) en donde evaluaron el efecto de solvente polares en la actividad de una lipasa digestiva de *Carcinus mediterraneus*, en metanol, la actividad enzimática aumenta para ambas enzimas, y en butanol, la actividad se pierde por completo.

Se sabe que las lipasas microbianas aumentan su actividad catalítica en solventes con Log P igual o mayor a 2, y a valores menores a 2, la actividad enzimática disminuye considerablemente (Laane et al. 1987). En el caso de las lipasas de peces y crustáceos no sucede así, ya que el coeficiente de partición (Log P) de metanol, etanol y acetona es menor a 1 por lo que se sugieren diferencias estructurales entre las lipasas de peces y crustáceos y las lipasas de origen microbiano.

La lipasa digestiva de camarón cuando es incubada en solventes con polaridad empírica igual o menor a 0.5, la enzima pierde su actividad enzimática por completo. Se ha demostrado que los solventes con constante dieléctrica menor a 5 no tienen efecto en el momento dipolar total de las proteínas (Pitera et al. 2001) por lo que se puede inferir que la disminución en la actividad relativa de la lipasa digestiva está dado por la interacción entre los solutos en la mezcla de reacción y el efecto en su solvatación. Hay que tomar en cuenta que estas interacciones excluyen a las interacciones que conllevan a modificaciones químicas (Reichardt 1994).

A pesar de que las lipasas de peces y crustáceos muestran cierta estabilidad en solventes polares, es posible que la “lid” sea determinante en su actividad en medios no acuosos. La “lid” que cubre el sitio activo de la lipasa digestiva de *P. vannamei* contiene cuatro lisinas continuas. Al comparar la lid de la lipasa de *P. vannamei* y la lid de las lipasas endotelial, hepática y lipoprotéica de mamíferos, las sustituciones son semi-conservativas. Fojan y colaboradores (2000) proponen que la presencia de aminoácidos hidrofóbicos relativamente pequeños como valina, leucina e isoleucina en una proporción de 7 a 9 residuos en la lid, es el resultado de un proceso de evolución en la familia de las lipasas. Este tipo de aminoácidos hidrofóbicos disminuyen la entropía en el proceso de solvatación, son flexibles y se pueden intercalar en una estructura membranosa para interactuar con moléculas de sustrato. Se ha propuesto que si las lipasas tuvieran residuos de mayor volumen, termodinámicamente no sería favorable; la entropía aumentaría gracias a la solvatación de estos residuos y estos residuos no interactuarían con los sustratos, sino que preferirían adherirse a membranas, este efecto aumentaría con la presencia de tirosina, gracias a su carga. La lipasa digestiva al tener cuatro lisinas continuas y una prolina a dos aminoácidos después, en lugar de alanina en la “lid”, pudiera tener un papel en la especificidad por cadenas de acilo corta y larga, y en la interacción con solventes. Carrière y colaboradores (1991) purificaron y caracterizaron una lipasa gástrica de canino, encontrando que esta enzima podía hidrolizar triacilglicéridos de cadena de acilo corta y larga al igual que la lipasa digestiva de camarón. Utilizando el programa ClustalX, se compararon las estructuras primarias de la lipasa gástrica de canino y la lipasa digestiva de camarón, encontrando similitudes en cuanto a zonas hidrofóbicas, incluso encontrando una secuencia lisinas consecutivas, por lo que a partir de la estructura tridimensional de la lipasa gástrica de canino se modeló la estructura tridimensional de la lipasa digestiva de camarón utilizando el I-TASSER (Roy et al. 2010), del laboratorio de Computación Médica y Bioinformática de la Universidad de Michigan (Figura 15), en donde se señalan los residuos de aminoácidos de la triada catalítica y los residuos que conforman el oligopéptido hidrofóbico que cubre el sitio activo. Al parecer, en la interface, el cambio conformacional que se da cuando el oligopéptido que cubre el sitio gira, afecta a toda la proteína, ya que el ácido aspártico 357 que forma parte de la triada catalítica está alejado de la histidina 338 y la serina 133.

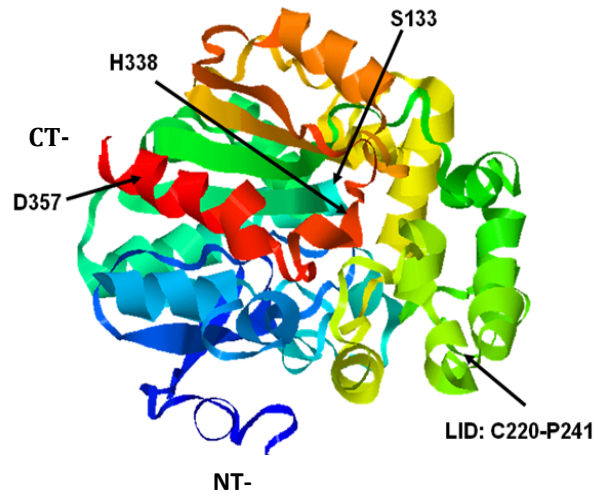


Figura 17. Modelo *in silico* de la lipasa digestiva de *Penaeus vannamei*. CT: Carboxilo terminal, NT: Amino terminal

El agua influye en todos los fenómenos biológicos, incluyendo el reconocimiento molecular, puede alterar la distribución de cargas traduciéndose en un cambio en los valores de momento dipolar y potencial electrostático molecular, afectando la conformación, preferencias de tautomerización y ionización de moléculas pequeñas, causando que grupos no polares tiendan a agregarse y se reduzca la superficie hidrofóbica expuesta a solventes, minimizando la pérdida de entropía gracias al ordenamiento de las moléculas de agua. Utilizando el algoritmo I-TASSER se calculó la accesibilidad a solventes de cada residuo de aminoácido que conforma a la lipasa digestiva de camarón. No se tiene la estructura primaria de la lipasas de salmón en donde se ha evaluado el efecto de solventes orgánicos en la actividad enzimática, pero se tiene la estructura primaria de otras lipasas de peces por lo que se comparó con la accesibilidad a solventes de una lipasa lisosomal del pez zebra *Danio rerio*, señalando en azul zonas hidrofóbicas de la lipasa digestiva y en rosa zonas hidrofóbicas de la lipasa de pez zebra. La secuencia consenso GXSXG de cada enzima se señala en gris (Figura 18).



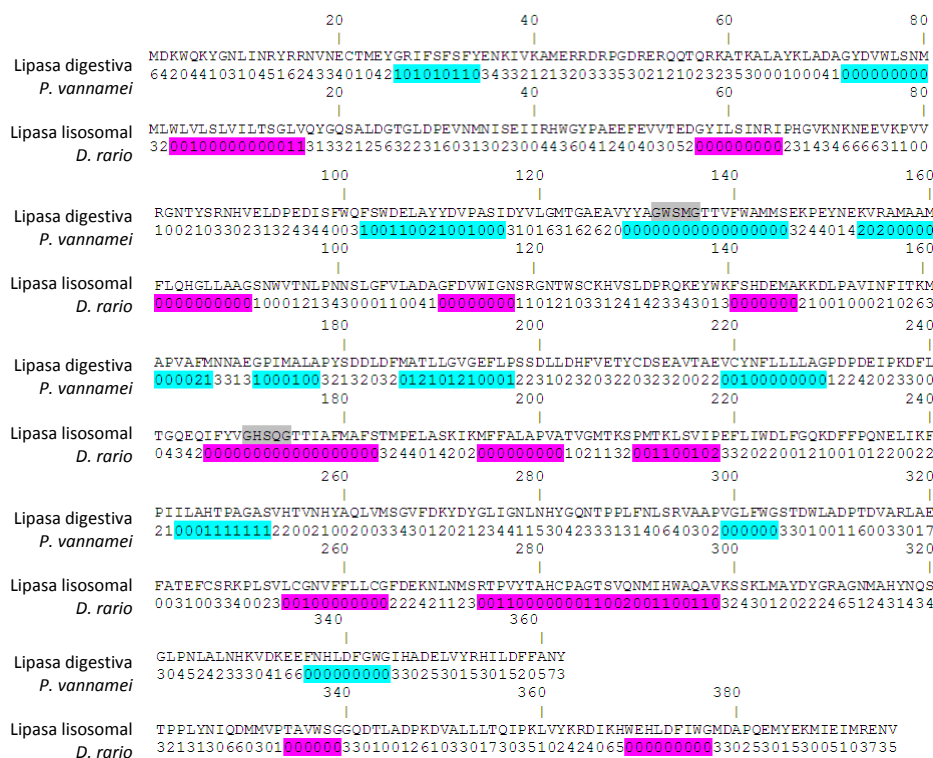


Figura 18. Comparación del área accesible a solventes presentes en la lipasa digestiva de camarón y en la lipasa lisosomal de pez zebra. El valor de cero indica una interacción nula con el agua y nueve, una mayor interacción con el agua.

Rahman y colaboradores (2010), purificaron y caracterizaron una lipasa de *Staphylococcus epidermidis*, evaluaron el efecto de solventes orgánicos en la actividad enzimática, encontrando que los solventes orgánicos polares como el metanol y la acetona disminuían la actividad hasta 0% cuando se incubaban a concentraciones de 10% de solvente. Utilizando el programa I-TASSER, se modeló la estructura tridimensional de esta lipasa y se comparó con las lipasa de pez zebra y de camarón, encontrando que el plegamiento de la estructura terciaria es un punto clave en la estabilidad a solventes orgánicos. La lipasa de pez, a pesar de que tiene zonas más hidrofóbicas que la lipasa digestiva, esas zonas hidrofóbicas se encuentran más en los extremos amino y carboxilo de la proteína, a diferencia de la lipasa digestiva, que se encuentran cerca de la secuencia consenso GXSXG, la cual es fundamental en el anclaje de los triacilglicéridos y su posterior hidrólisis. En la figura 18 se presentan los modelos *in silico* de una lipasa microbiana, una de pez, y una de crustáceo, en donde se presenta el plegamiento de estas enzimas.

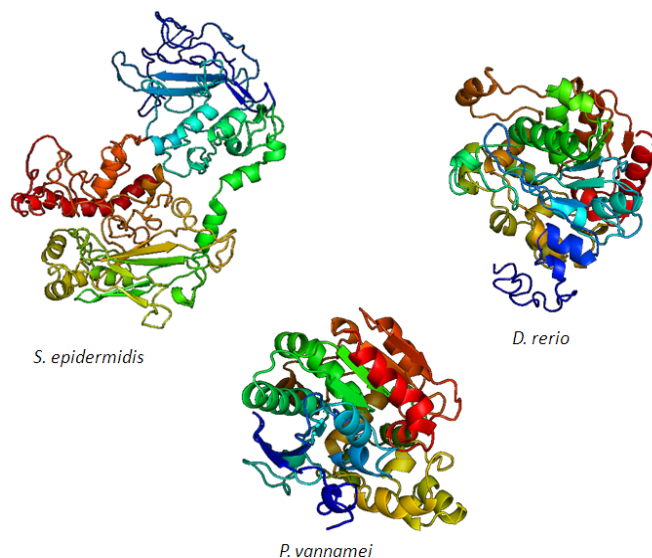


Figura 19. Modelos *in silico* de las lipasas de *S. epidermidis*, *D. rerio* y *P. vannamei*.

```

                20           40           60           80
                |           |           |           |
MGQNNETRFRS IRK YTVGVVSIITGIT IFVSGQHAQAEMTQS 8SDENE QBQQTEQVEHKEDITHLSYELNQEGETA3QS
6534644:131001100000000000000002443344444455544455445555456455544455644664545655
                100          120          140          160
HTSQENQSDGNVQKKNQIQQDSTQTS FLNDQKQTSMEQQSKDNHVTPN SRQDTYFPGQNDQMGKQFMDNQHSTQTEHQ
54445555555555554545555545456454564456454545465545555444545554555555645545555544555555
                180          200          220          240
ENTQNMNDQD8SDKKQHPSDQTQDSS SKGTQPKQS QSIE DEDKIVKQB SSKVHKI GNI KTDKTVKTNQKQTSLS PRV
5545554565554555446554455554545464455446554454454555444444444444544455344434344434
                260          280          300          320
VRSKQTPHINQLTAQAQYKNQYFVVFVHGFVGLVGEDAFS MYPNFWGGT KYNVKQELTKLGYRVHEANVGAFSSNYDRAV
34434444343333343344322231121002002432110112011113240353037340301103012021312002
                340          360          380          400
ELYYIINGGEVNDYGAHAHAAKYGHKRYGRTYEGIMEDWEPGKMIHLVGHSMGGQTIRLMEHFLRNGNQEBIDYQRQYGGTV
1013104412242334105426263233314210552766220000001101001000100443346334234334340
                420          440          460          480
SDLFWGGQDNMNSTITT LGT FHNSTPAADKLGSTKFIKDT INRIGKIGGTKALDLELGF SQWGFKQQPNESYA EYAKRIAK
23014343431000000001120010012130340023001000200323102000201111033342201020032023
                500          520          540          560
NSKVVETE DQAVNDLTTAGA EKLNQMT TLNPNIVVT SYTGAATHG PLGNEVPNIRQFFLEDLTSRVI GGDDMEGNVRVND
7241242320001100360044015303434301000002112321122110101010001000100020336402311
                580          600          620          640
GIVFVSSSLHP SDEAFKVGMMNLATD HGIWQVRFVQYDWHLDLVLGLDITD YKRTGEE LGQFYMSEMINNMLKVE ELDGITR
000000002113233434214344223202010112422000000012233232011202300220043026144254456

```

Figura 20. Estructura primaria de una lipasa de *S. epidermidis*. En azul se señalan las zonas hidrófobas de la enzima.

Una de las características de los alcoholes es que tiene un grupo hidroxilo que puede interactuar con otras moléculas polares, en este caso con residuos de aminoácidos polares presentes en las proteínas. En la figura 19, se señala la estructura primaria de la lipasa de *S. epidermidis* y la hidrofobicidad de sus residuos de aminoácidos, en donde se puede observar que a pesar de que la enzima presenta una proporción similar de zonas

hidrofóbicas que la lipasa digestiva de camarón y la lisosomal de pez zebra, el resto de los residuos de aminoácidos tienden a tener una fuerte interacción con el agua, por lo que cuando esta enzima fue incubada en solventes polares, las moléculas que interactuaron con estas zonas hidrofílicas compitieron por las moléculas de agua esenciales para mantener la estabilidad de la enzima. Las lipasas de pez y de camarón presentan menos zonas hidrofílicas por lo que son más estables que las lipasas microbianas en solventes orgánicos polares.

Existen pocos reportes sobre las características de las lipasas intracelulares. Para la lipasa intracelular de *P. vannamei* se puede asumir que es hidrofóbica por la estrategia que se utilizó para su purificación, lo cual podría ser la razón de que mantenga su actividad catalítica en solventes polares, ya que no tiene que competir por moléculas de agua en comparación con otras lipasas (Tabla 7). La capa monomolecular de agua en la lipasa intracelular es posible que se mantenga constante, ya que los solventes polares no están compitiendo por interactuar con ésta ya que esta enzima mantiene su actividad aún en concentraciones de 50% de solvente en la mezcla de reacción. La excepción fue el propanol, en donde la actividad decreció conforme aumentó la concentración de solvente. Pazhang y colaboradores (2006) evaluaron el efecto de propanol, dimetil formamida y dimetil sulfóxido en la actividad enzimática de una termolisina encontrando un efecto inhibitorio en la actividad de esta enzima. Existe el reporte de una lipasa de origen microbiano de la familia I.1 que presentó un comportamiento similar al de la lipasa intracelular de camarón en cuanto al proceso de purificación y al evaluar el efecto del propanol en la actividad enzimática, ésta se pierde por completo a 40% de solvente (Kordel et al. 1991). Angkawidjaja & Kanaya (2006) estudiaron la importancia de una secuencia repetitiva, la cual participa en la estabilidad de algunas lipasas intracelulares de la familia I.3 de lipasas microbianas. Esta secuencia de residuos de aminoácidos contiene dos residuos de aspartato, y se propuso que ayudan a la formación de la estructura secundaria. A pesar de que no se tiene la estructura primaria de la lipasa intracelular de *P. vannamei*, esto podría ser un acercamiento en tratar de explicar su comportamiento en solvente orgánicos.



## 8. Conclusiones

De las lipasas usadas en la industria biotecnológica, una parte se utiliza para síntesis de esteres y para la separación de enantiómeros en mezclas racémicas. La lipasa digestiva de *Penaeus vannamei*, al ser estable y presentar mayor actividad relativa en hexano, puede dar paso a otra investigación en la cual se busquen nuevas características en solventes, como la síntesis de esteres y péptidos en sistemas bifásicos.

La lipasa intracelular de *Penaeus vannamei* mostró mayor estabilidad en solventes orgánicos miscibles en agua que la lipasa digestiva. En algunos procesos industriales, las condiciones de trabajo requieren de concentraciones de acetona o etanol mayores a 30%, por lo que la lipasa intracelular podría ser un candidato para usarse en estos procesos.

La interacción de los solventes orgánicos polares depende de la polaridad de los residuos de aminoácidos de las proteínas y de las zonas hidrofílicas, las cuales compiten por moléculas de agua esenciales para la estabilidad de la estructura tridimensional de las enzimas.

Poco se sabe de la estructura primaria de las lipasas de crustáceos, pero al comparar con la secuencia putativa de una lipasa del braquiópodo *Daphnia pulex*, también contiene una secuencia de aminoácidos hidrofóbicos conformada por ILLL, por lo que podría ayudar a entender y diferenciar a las lipasas de crustáceos.

## 9. Bibliografía

- Ahmed EH, Raghavendra T, Madamwar D. 2009. A thermostable alkaline lipase from a local isolate *Bacillus subtilis* EH 37: Characterization, partial purification, and application in organic synthesis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 160: 2102-2113.
- Angkawidjaja C, Kanaya S. 2006. Family I.3 lipase: bacterial lipases secreted by the type I secretion system. *Cellular and molecular life sciences*. 63: 2804-2817.
- Aryee A, Simpson BK, Villalonga R. 2007. Lipase fraction from the viscera of grey mullet *Mugil cephalus*. Isolation, partial purification and some biochemical characteristics. *Enzyme and microbial technology*. 40: 394-402.
- Barbe S, Lafaquière V, Guieysse D, Monsan P, Remaud-Siméon M, André I. 2009. Insights into lid movement of *Burkholderia cepacia* lipase inferred from molecular dynamics simulations. *Proteins*. 77(3): 509-523.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254.
- Carrea G, Riva S. 2008. Organic synthesis with enzymes in non-aqueous media. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. Pp. 14.
- Cefovsky V, Jakubke H. 1995. Nucleophile specificity of subtilisin in an organic solvent with low water content: Investigation via acyl transfer reactions. *Biotechnology and Bioengineering*. 49: 553-558.
- Chahinian H, Nini L, Boitard E, Dubès JP, Comeau LC, Sarda L. 2002. Distinction between esterases and lipases: A kinetic study with vinyl esters and TAG. *Lipids*. 37(7): 653-622.
- Cherif S, Gargouri Y. 2009. Thermoactivity and effects of organic solvents on digestive lipase from hepatopancreas of the green crab. *Food Chemistry*. 116:82-86.
- Costa JM. 2005. Diccionario de química física. Universidad de Barcelona. Ediciones Díaz Santos.
- Doukyu N, Ogino H. 2010. Organic solvent-tolerant enzymes. *Biochemical Engineering Journal*. 48(3): 270-282.
- Du H, Duanmu M, Rosa L. 1998. Mouse lysosomal lipase: characterization of the gene and analysis of promoter activity. *Gene*. 208: 285-295.
- Fojan P, Jonson PH, Petersen M, Petersen SB. 2000. What distinguishes an esterase from a lipase: A novel structural approach. *Biochimie* 82: 1033-1041.
- Hasan F, Shah AA, Hameed A. 2006. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*. 39: 235-251.
- Holum J. 2009. Fundamentos de química general, orgánica y bioquímica para ciencias de la salud. Editorial Limusa.
- Huerta-Ochoa S. 2004. Reactores enzimáticos. Universidad Autónoma Metropolitana.

- Kawaguchi S, Nobe Y, Yasuoka J, Wakamiya T, Kusumoto S, Kuramitsu S. 1997. Enzyme flexibility: A new concept in recognition of hydrophobic substrates. *Journal of Biochemistry*. 122: 55-63.
- Kordel M, Hofmann B, Schomburg D, Schmid RD. 1991. Extracellular lipase of *Pseudomonas* sp. Strain ATCC 21808: Purification, characterization, crystallization, and preliminary X-ray diffraction data. *Journal of bacteriology*. 173(15): 4836-4841.
- Kourist R, Brundiek H, Bornscheuer UT. 2010. Protein engineering and discovery of lipases. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 112: 64-74.
- Kurtovic I, Marshall S, Zhao X, Simpson B. 2009. Lipases from mammals and fishes. *Reviews in fisheries science*. 17(1): 18-40.
- Kurtovic I, Marshall S, Zhao X, Simpson B. 2010. Purification and properties of digestive lipases from Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and New Zealand hoki (*Macruronus novaezelandiae*). *Fish Physiology and Biochemistry*. DOI 10.1007/s10695-010-9382-y.
- Harris, G. 1973. Cinética química. Editorial Reverté. Pp. 101.
- Jaeger KE, Dijkstra BW, Reetz MT. 1999. Bacterial biocatalysts: Molecular biology, three-dimensional structure, and biotechnological applications of lipases. *Annual Review of Microbiology*. 53: 315-351.
- Laane C, Boeren S, Vos K, Veeger C. 1987. Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. *Biotechnology and Bioengineering*. 36: 81-87.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227(5259): 680-685.
- Louwrier A, Drtina GJ, Klibanov AJ. 1996. On the issue of interfacial activation of lipase in nonaqueous media. *Biotechnology and Bioengineering*. 50(1): 1-5.
- Mansfeld J, Ulbrich-Hofmann R. 2007. The stability of engineered thermostable neutral proteases from *Bacillus stearothermophilus* in organic solvents and detergents. *Biotechnology and Bioengineering*. 97: 672-679.
- McKarns SC, Hansch C, Caldwell WS, Morgan WT, Moore SK, Doolittle DJ. 1997. Correlation between hydrophobicity of short-chain aliphatic alcohols and their ability to alter plasma membrane integrity. *Fundamental and applied toxicology*. 36(1): 62-70.
- Miled N, Canaan S, Dupuis L, Roussel A, Rivière M, Carrière F, de Caro A, Cambillau C, Verger R. Digestive lipases: From the three-dimensional structure to physiology. *Biochimie*. 82: 973-986.
- Moreno-Ospina, G, Valencia-Velásquez, JA, Cárdenas-Agudelo, CA, Villa-Acevedo, WM. Fundamentos e ingeniería de las puestas de tierra: Respuestas ante fallas eléctricas y rayos. Universidad de Antioquia. Pp. 18.
- Morrison RT, Boyd RN. 1998. Química orgánica. Quinta edición. Editorial Pearson Educación. Pp. 621-627.
- Ng IS, Tsai SW. 2005. Partially purified *Carica papaya* lipase: a versatile biocatalyst for the hydrolytic resolution of (*R,S*)-2-Arylpropionic thioesters in water-saturated organic solvents. *Biotechnology and bioengineering*. 91(1): 106-113.

- Okamoto T, Ueji S. 2000. A new method for improving the enantioselectivity of lipase-catalyzed hydrolysis in organic solvent containing a small amount of water in the presence of metal ions. *Biotechnology letters*. 22: 1169-1171.
- Pazhang M, Khajeh K, Ranjbar B, Hosseinkhani S. 2006. Effects of water-miscible solvents and polyhydroxy compounds on the structure and enzymatic activity of thermolysin. *Journal of biotechnology*. 27(1): 45-53.
- Pitera JW, Falta W, van Gunsteren WF. 2001. Dielectric properties of proteins from simulation: The effects of solvent, ligands, pH and temperature. *Biophysical journal*. 80: 2546-2555.
- Pleiss J, Fischer M, Schimid R. 1998. Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site. *Chemistry and physics of lipids*. 93: 67-80.
- Prim N, Sánchez M, Ruiz C, Pastor FI, Diaz P. 2003. Use of methylumbelliferyl-derivative substrates for lipase activity characterization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 22: 339-346.
- Rahman RN, Mahamad S, Salleh AB, Basri M. 2007. A new organic solvent tolerant protease from *Bacillus pumilus* 115b. *Journal of industrial microbiology and biotechnology*. 34(7): 509-517.
- Reichardt C. 2004. Solvatochromic dyes as solvent polarity indicators. *Chemical reviews*. 94(8): 2319-2358.
- Reichardt C. 2004. Pyridinium N-phenolate betaine dyes as empirical indicators of solvent polarity: Some new findings. *Pure and applied chemistry*. 76(10): 1903-1919.
- Rivera-Pérez C, García-Carreño F, Saborowski R. 2011. Purification and biochemical characterization of digestive lipase in whiteleg shrimp. *Marine biotechnology*. 13(2): 284-295.
- Rivera-Pérez C, Navarrete MA, García-Carreño F. 2011. Purification and characterization of an intracellular lipase from pleopods of whiteleg shrimp (*Penaeus vannamei*). *Comparative biochemistry and physiology, part B*. 158: 99-105.
- Roy A, Kucukural A, Zhang Y. 2010. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature protocols*. 5(4): 725-738.
- Royter M, Schmidt M, Elend C, Höbenreich H, Schäfer T, Bornscheuer UT, Antranikian G. 2009. Thermostable lipases from the extreme thermophilic anaerobic bacteria *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* SOL1 and *Caldanaerobacter subterraneus* subsp. *tengcongensis*. *Extremophiles*. 13(5): 769-783.
- Sarda L, Desnuelle P. 1958. Actions of pancreatic lipase on esters in emulsions. *Biochimica et Biophysica Acta*. 30(3): 513-521.
- Schmid A, Dordick JS, Hauer B, Kiener A, Wubbolts M, Witholt B. 2001. Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature*. 409: 258-268.
- Sekhon A, Dahiya N, Tiwari RP, Hoondal GS. 2005. Properties of a thermostable extracellular lipase from *Bacillus megaterium* AKG-1. *Journal of Basic Microbiology*. 45(2): 147-154.



- Serdakowski AL, Dordick JS. 2007. Enzyme activation for organic solvents made easy. *TRENDS in Biotechnology*. 26(1): 48-54.
- Solanki S, Gupta MN. 2011. A chemical modified lipase preparation for catalyzing the transesterification reaction in even highly polar organic solvents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. doi:10.1016/j.bmcl.2011.03.059.
- Torres E, Siminovich B, Barzana E, Vazqués-Duhalt R. 1998. Thermodynamic hydrophobicity of aqueous mixtures of water-miscible organic solvents predict peroxidase activity. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 4: 155-161.
- Wade LG. *Química organica*. 2004. Quinta edición. Pearson Educación.
- Yeom SH, Daugulis AJ. 1999. A new method for the determination of microbial activity and critical logP in the presence of organic solvents. *Biotechnology Techniques*. 13: 549–553.
- Zaks A, Klivanov A. 1985. Enzyme-catalyzed process in organic solvents. *Biochemistry*. 82: 3192-3196.
- Zaks A, Klivanov A. 1988. Enzyme-catalyzed in non-aqueous solvents. *The Journal of Biological Chemistry*. 263(7): 3194-3201.