

Las lipasas: enzimas con potencial para el desarrollo de biocatalizadores inmovilizados por adsorción interfacial

Lipases: enzymes having the potential for developing immobilised biocatalysts by interfacial adsorption

Jorge González-Bacerio¹, Jairo Rodríguez Hernández², Alberto del Monte Martínez^{3}*

Resumen

Las lipasas son enzimas con propiedades funcionales muy interesantes que permiten su utilización práctica en diversos campos de las industrias agroquímica, farmacéutica, de detergentes y alimentaria, así como en química fina. Entre las aplicaciones más importantes de estas moléculas se encuentran: la resolución de mezclas racémicas, la obtención de compuestos ópticamente puros y la bioconversión de principios activos. En este trabajo se presenta una amplia revisión del tema, que abarca desde aspectos estructurales y funcionales de las lipasas, hasta la inmovilización de estas enzimas mediante adsorción interfacial y su empleo en biotecnología.

Palabras clave: activación interfacial, adsorción interfacial, bioconversión, esterases.

Abstract

Lipases are enzymes having very interesting functional properties thereby enabling their practical use in different fields related to agro-chemical, pharmaceutical and food industries, as well as in fine chemistry. The most relevant applications for these molecules would be racemic mixture resolution, obtaining optically-pure compounds and the bioconversion of active principles. This work presents a broad review of the topic, ranging from lipases' structural and functional features to these enzymes' immobilisation by interfacial adsorption and their use in biotechnology.

Key words: Bioconversion, esterases, interfacial activation, interfacial adsorption.

Recibido: septiembre 16 de 2009

Aprobado: junio 23 de 2010

-
- 1 Bioquímico, profesor, Centro de Estudio de Proteínas, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba. jogoba@fbio.uh.cu
 - 2 Microbiólogo, Centro de Estudio de Proteínas, Facultad de Biología, Universidad de La Habana.
 - 3 Autor de correspondencia, bioquímico, profesor e investigador, Centro de Estudio de Proteínas, Facultad de Biología, Universidad de La Habana. adelmonte@fbio.uh.cu

Introducción

Las lipasas (glicerol-éster hidrolasas; EC 3.1.1.3) son enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces éster presentes en los acilglicérols in vivo. Además, pueden catalizar la hidrólisis o síntesis de un grupo amplio de ésteres carboxílicos (Bornscheuer *et al.* 1994). Estas enzimas están ampliamente distribuidas en la naturaleza, y se encuentran en microorganismos, plantas y animales (Berner y Hammond, 1970; Mukherjee, 1996; Ruiz *et al.*, 2007). Una característica peculiar de las lipasas es que son enzimas solubles en agua que actúan sobre sustratos insolubles y agregados, por lo que operan unidas a interfaces lípido-agua. Bajo estas condiciones, se produce un incremento de la actividad catalítica, respecto a las soluciones con concentraciones por debajo de la concentración micelar crítica, fenómeno conocido como activación interfacial (Sarda y Desnuelle, 1958).

Entre las aplicaciones más exitosas de las enzimas están aquellas que se consiguen con sus formas inmovilizadas. Esto se debe a las ventajas que confiere la inmovilización, entre las que se encuentran: la posibilidad de recuperar la enzima del medio de reacción, la obtención de un producto no contaminado con la enzima, y el incremento de la estabilidad operacional del biocatalizador (Guisán *et al.*, 1996a; Malcata, 1996; Knežević *et al.*, 2004). Uno de los protocolos de inmovilización más difundidos para las lipasas es la adsorción selectiva sobre soportes hidrofóbicos que reproducen las interfaces formadas por los sustratos naturales de estas enzimas (Malcata *et al.*, 1992; Fernández-Lafuente *et al.*, 1998). En este caso, la inmovilización se produce a través de un mecanismo de adsorción interfacial (Reis *et al.*, 2009), basado en la activación de estas enzimas en interfaces.

Las lipasas han suscitado un interés creciente para la industria debido a su versatilidad, estereoselectividad, estabilidad frente a solventes orgánicos y capacidad de sintetizar compuestos orgánicos en mezclas de reacción

con baja actividad de agua (Segura *et al.*, 2004; Dandavate *et al.*, 2009). Bajo determinadas condiciones, las lipasas pueden catalizar reacciones químicas distintas de la hidrólisis, como esterificación, interesterificación, alcoholisis, acidolisis y aminolisis (Balcão *et al.*, 1996; Pandey *et al.*, 1999). Estas hidrolasas se han empleado ampliamente como aditivos para detergentes, en las industrias alimentaria, papelera, química y energética; así como para la producción de cosméticos, en tratamientos ambientales y en el diseño de biosensores (MacRae y Hammond, 1995). Es notable el impacto que han tenido las lipasas en la producción de fármacos más selectivos y efectivos, con efectos secundarios menores, y en la obtención de pesticidas de menor toxicidad, todo ello mediante la síntesis de compuestos ópticamente puros y la resolución de mezclas racémicas (Kirchner *et al.*, 1985; Yoshimura *et al.*, 2002; Zarevúcka y Wimmer, 2008). Es por ello que cobra vital importancia profundizar en el conocimiento sobre las características funcionales de estas enzimas, a fin de determinar las condiciones más ventajosas de aprovechamiento de sus propiedades, para lograr la optimización de los procesos en que son empleadas.

En este trabajo se presentan los resultados de una amplia revisión en la literatura especializada sobre las lipasas. En primer lugar, se ofrecen las características estructurales más importantes de estas enzimas en relación con las peculiares propiedades funcionales que estas determinan. A continuación se presenta la inmovilización de lipasas como tecnología dirigida a la obtención de biocatalizadores más eficientes, con énfasis en la inmovilización por adsorción interfacial: uno de los procedimientos de inmovilización más difundidos para estas proteínas. Por último, se resumen las principales aplicaciones biotecnológicas de las lipasas.

Masa molecular y punto isoeléctrico

La mayoría de las lipasas presenta masas moleculares entre 27 y 60 kDa. Sin embargo, se

conocen algunos ejemplos de lipasas con masas moleculares ubicadas fuera de este intervalo. Los puntos isoeléctricos que se han informado

para la mayor parte de las enzimas e isoenzimas de diversos orígenes se encuentran entre 3,8 y 7,3 (tabla 1).

Tabla 1. Masas moleculares y puntos isoeléctricos de lipasas procedentes de diversas fuentes

Fuente	Masa molecular (kDa)	Punto isoeléctrico	Referencia
<i>Chromobacterium viscosum</i>	33	7,1	Taipa <i>et al.</i> , 1995
<i>Candida rugosa</i>	60	4,80-5,04 (isoenzimas)	Lotti y Alberghina, 1996
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	32	7,3	Shuen-Fuh <i>et al.</i> , 1996
<i>Rhizomucor miehei</i>	31.6	3,8	Wu <i>et al.</i> , 1996
Salvado de arroz	9.4	ND	Bhardwaj <i>et al.</i> , 2001
<i>Acinetobacter</i> sp.	33	ND	Snellman <i>et al.</i> , 2002
Escorpión (glándulas digestivas)	50	ND	Zouari <i>et al.</i> , 2005
Calamar <i>Todarodes pacificus</i> (hígado)	27	ND	Park <i>et al.</i> , 2008

ND: No determinado.

Plegamiento y aminoácidos catalíticos

La lipasas presentan un dominio estructural canónico compuesto por ocho cadenas β que forman una hoja β . Estas cadenas están conectadas por hélices α , que quedan empaquetadas a ambos lados de la hoja β . Este núcleo central es el responsable directo de la actividad catalítica y define el plegamiento α/β -hidrolasa, común para muchas hidrolasas de orígenes filogenéticos y funciones catalíticas diferentes (Ollis *et al.*, 1992).

La actividad funcional de las lipasas se sustenta en la tríada de aminoácidos clásica: nucleófilo-ácido-histidina (Alam *et al.*, 2002; Mead *et al.*, 2002), dilucidada inicialmente para las proteasas serínicas (Carter y Wells, 1988). Los elementos de la tríada se ubican en lazos muy bien conservados del dominio catalítico. El nucleófilo, generalmente una serina, se localiza en un giro que conecta una cadena β con una hélice α (Petersen, 1996), en el contexto

secuencial pequeño-x-nucleófilo-x-pequeño-pequeño; donde x es cualquier aminoácido y “pequeño” se refiere a un aminoácido poco voluminoso (Ransac *et al.*, 1996). Solo la histidina está completamente conservada en la tríada de las lipasas (Derewenda *et al.*, 1994a), cuyo arreglo topológico y secuencial es la imagen especular de la tríada de las proteasas serínicas (Ollis *et al.*, 1992) (figura 1).

Centro activo

El centro activo de las lipasas permanece protegido por una cubierta que impide la entrada del sustrato. Este solo tiene acceso cuando la enzima se encuentra en su conformación activa y la cubierta se ha desplazado (Derewenda *et al.*, 1994b; Miled *et al.*, 2003). Esta cubierta puede ser una hélice α anfífilica (Lotti y Alberghina, 1996) o un lazo (Hui y Howles, 2002). La estructura nativa de las lipasas es un sistema dinámico de interconversión entre la estructura cerrada, que predomina en ambientes homogéneos, y la estructura abierta, que se

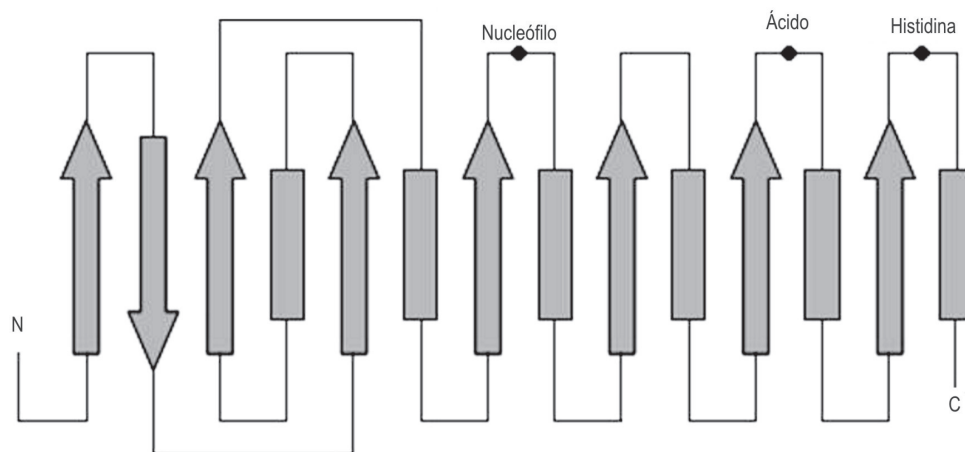


Figura 1. Diagrama esquemático del plegamiento α/β -hidrolasa, presente en el dominio catalítico canónico de las lipasas. Flechas: cadenas β . Rectángulos: hélices α . Conexiones: lazos. Puntos: residuos que componen la tríada catalítica (nucleófilo, ácido, histidina). N y C: extremos amino y carboxilo-terminal.

estabiliza en las interfaces lípido-agua (Grochulski *et al.*, 1994a; Guisán *et al.*, 1996a). Las estructuras tridimensionales de algunas lipasas en sus conformaciones activas se han determinado por cristalografía y difracción de rayos X (Derewenda *et al.*, 1994b; Kim *et al.*, 1997; Tyn-dall *et al.*, 2002; Ericsson *et al.*, 2008).

Además del centro activo principal, las lipasas pancreáticas humana y porcina, y otras de origen microbiano, presentan en su región C-terminal lo que parece ser un sitio catalítico mínimo. Este pudiera ser responsable de la actividad enzimática frente a sustratos hidrosolubles como los ésteres del *p*-nitrofenol (De Caro *et al.* 1986). Por otra parte, esta actividad también pudiera explicarse por las transiciones conformacionales que experimentan estas enzimas, aun en ambientes homogéneos, dadas por la interconversión estructura cerrada-estructura abierta (Kim *et al.*, 1997).

En su conformación activa, las lipasas presentan en su centro activo un grupo de residuos hidrofóbicos dispuestos alrededor de la serina catalítica que constituyen una región electrofílica conocida como cavidad oxianiónica (Grochulski *et al.*, 1994b). Además, aparece una superficie significativamente apolar alrededor de la entrada al centro activo que se conoce

como zona de contacto lipídico (Okkels *et al.*, 1996). También están presentes algunas moléculas de agua que participan en interacciones importantes para mantener una conformación del sitio activo catalíticamente competente (Triantafyllou *et al.*, 1993).

Activación interfacial

De manera general, las lipasas son enzimas que requieren de activación interfacial para desplegar al máximo su actividad catalítica (Malcata, 1996; Ransac *et al.*, 1996). Este fenómeno consiste en el incremento de la actividad enzimática en presencia de interfaces lípido-agua (Sarda y Desnuelle, 1958; Chahinian *et al.*, 2002). Se entiende por interface a la superficie imaginaria que separa dos porciones del espacio homogéneas y distintas físicamente. A nivel molecular, una interface consiste en un conjunto de dos capas adyacentes de moléculas ordenadas con diferente carácter hidrofóbico-hidrofílico (Malcata, 1996).

Cuando la enzima entra en contacto con una interface, el ambiente dieléctrico en la superficie proteica se modifica, en el sentido de potenciar las interacciones electrostáticas. Ello posibilita que la cubierta del centro activo se

desplaza (Grochulski *et al.*, 1994a; Petersen, 1996; Foresti y Ferreira, 2004), y se produce una reestructuración en la conformación de la molécula (Jensen *et al.*, 2002; Aloulou *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2007). Como resultado, los aminoácidos catalíticos quedan expuestos al solvente en una orientación adecuada, y alrededor de éstos se conforma la cavidad oxianiónica, por exposición de determinados residuos hidrofóbicos e internalización de otros hidrofílicos (Ransac *et al.*, 1996). Además, se estructura la zona de contacto lipídico en la vecindad del centro activo y de la cubierta móvil (Grochulski *et al.*, 1994a; Jensen *et al.*, 2002). Todo esto incrementa la afinidad de la enzima por sus sustratos lipídicos y contribuye a la estabilización del estado de transición durante el ciclo catalítico (Malcata, 1996; Ransac *et al.*, 1996; Mead *et al.*, 2002).

Las características físico-químicas del sustrato también contribuyen de manera significativa a la activación interfacial (Egmond, 1996). En el estado agregado, los triacilglicéridos exhiben un grado de ordenamiento elevado, que minimiza el número de estados conformacionales que pueden presentar estas moléculas en solución acuosa, debido a la gran flexibilidad de sus cadenas de ácidos grasos. Este efecto tiene

implicaciones favorables para el reconocimiento enzima-sustrato (Petersen, 1996) (figura 2).

Agregación molecular

Dado el carácter hidrofóbico de la zona de contacto lipídico cercana al centro activo, no es descartable su interacción con otras sustancias de su misma naturaleza presentes en el medio, incluyendo las zonas hidrofóbicas de otras moléculas de enzima. Estas interacciones conducirían a la formación de agregados (Snellman *et al.*, 2002) con baja o ninguna actividad catalítica, debido al bloqueo de los centros activos por las propias moléculas enzimáticas. El fenómeno de agregación en soluciones acuosas ha sido demostrado experimentalmente por varios grupos de investigadores (Flaschel y Renken, 1991; Guisán *et al.*, 1996b; Palomo *et al.*, 2003), los que obtuvieron un rápido descenso de la actividad enzimática al aumentar la concentración de enzima (Pedersen *et al.*, 2006).

Especificidad y selectividad

Si bien las lipasas han sido definidas como enzimas específicas para catalizar la separación

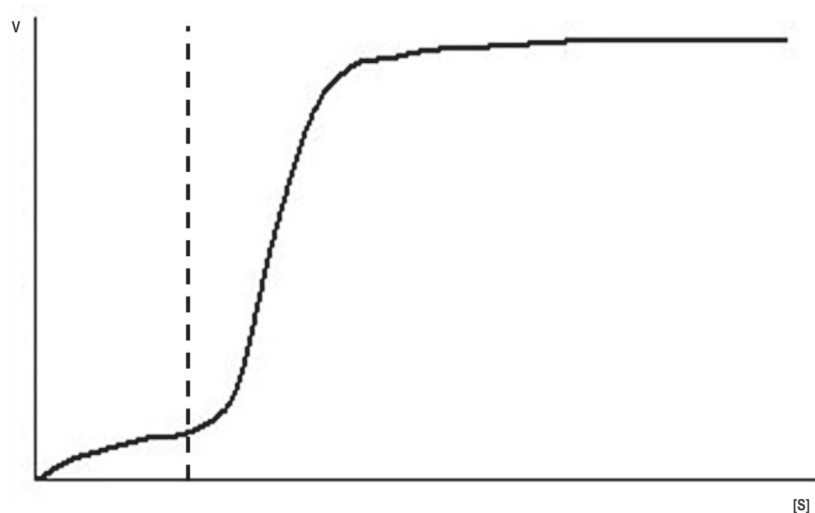


Figura 2. Esquema cinético de la activación interfacial. v: velocidad inicial de la reacción catalizada por la lipasa. [S]: concentración de sustrato. Líneas discontinuas: concentración micelar crítica del sustrato, a partir de la cual el sustrato agrega y aparece la interface lípido-agua.

hidrolítica de los ácidos grasos de cadena larga presentes en los acilglicérols (Snellman *et al.*, 2002), los cuales son sus sustratos naturales, muy pocas lipasas son específicas en sus reacciones. Por este motivo, el término especificidad se ha ido reemplazando en la literatura por el de selectividad, el cual describe mucho mejor el comportamiento reactivo de estas hidrolasas. En última instancia, la determinación de la especificidad de una lipasa depende de la sensibilidad del método empleado para ello (Jensen y Hamosh, 1996).

Las lipasas pueden ser selectivas por la clase de lípido (Bornscheuer *et al.*, 1994; Li *et al.*, 2009) y por la posición (Berner y Hammond, 1970) y el tipo de ácido graso (Snellman *et al.*, 2002; Zouari *et al.*, 2005). Estas enzimas pueden ser además estereoselectivas

(Cygler *et al.*, 1995), y alcanzan a distinguir entre enantiómeros, frente a sustratos racémicos, o entre grupos enantiotópicos, para triacilglicéridos proquirales (Bornscheuer 2002). Por último, pueden establecerse ciertas combinaciones entre los tipos de selectividades anteriores (Jensen *et al.*, 1994).

Efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad enzimática

El efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad lipasa ha sido ensayado con diferentes sustratos para enzimas de diversas fuentes. En la tabla 2 se presentan algunos resultados que se han informado para lipasas en sus formas solubles.

Tabla 2. Parámetros cinéticos de diferentes lipasas en sus formas solubles

Fuente	Sustrato	K _M	V _{máx}	Referencia
Páncreas porcino	<i>p</i> -nitrofenil acetato	0,20 mmol/L	ND	de Caro <i>et al.</i> 1986
<i>Thermus</i> sp.	Trioleína	7,1% (V _{Trioleína} / V _{isooctano})	55,5 mol / (mL * h * mg prot.)	Silva <i>et al.</i> , 1991
<i>Candida rugosa</i> A	<i>p</i> -nitrofenil butirato	0,0392 mmol/L	ND	Rúa <i>et al.</i> , 1993
<i>C. rugosa</i> B	<i>p</i> -nitrofenil butirato	> 0,4 mmol/L	ND	Rúa <i>et al.</i> , 1993
<i>C. rugosa</i>	Aceite de oliva	703 mmol/L	6032 mmol / (min * mg)	Prazeres <i>et al.</i> , 1996
Salvado de arroz	Trioleína	6,71 mmol/L	ND	Bhardwaj <i>et al.</i> , 2001
<i>Bacillus</i> sp.	<i>p</i> -nitrofenil laurato	3,63 mmol/L	0,26 μmol / (min * mL)	Dosanjh y Kaur, 2002
<i>Burkholderia multivorans</i> V2	<i>p</i> -nitrofenil palmitato	1,56 mmol/L	5,62 μmol / (mg * min)	Dandavate <i>et al.</i> , 2009

ND: No determinado. K_M: Constante de Michaelis-Menten para el par enzima-sustrato. V_{máx}: Velocidad máxima de la reacción catalizada por la lipasa.

El efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad enzimática también se ha evaluado para lipasas inmovilizadas. En esos casos, se obtienen valores aparentes de

los parámetros cinéticos, ya que estos se encuentran sesgados por las condiciones de la inmovilización (Tutar *et al.*, 2009).

Efecto del pH y la temperatura sobre la actividad enzimática

Las condiciones óptimas de pH dependen, entre otros factores, del sustrato (Berner y Hammond, 1970) y del tampón empleados (Chávez *et al.*, 1990). El pH óptimo para las lipasas se encuentra generalmente en el intervalo entre 7,0 y 9,0 (tabla 3), cuando la actividad enzimática se ensaya frente a sus sustratos específicos, como el aceite de oliva, la tributirina, otros triacilglicéridos pequeños y la trioleína (Rúa *et al.*, 1993; Prazeres *et al.*, 1996). No obstante, para algunas lipasas, el pH óptimo se encuentra en la región ácida. Asimismo, se han encontrado lipasas con la mayor actividad a valores de pH más alcalinos (tabla 3).

También puede suceder que se obtenga más de un valor de pH óptimo, manteniendo invariables las demás condiciones del ensayo (Kiyotani *et al.*, 1983). Esto suele ocurrir para lipasas obtenidas a partir de extractos crudos o para mezclas heterogéneas con actividad lipolítica (Berner y Hammond, 1970). La inmovilización puede variar el valor de pH óptimo de las lipasas con respecto a sus formas solubles (Wei y Wu, 2008), en depen-

dencia del grado de exposición resultante de sus centros activos (Balcão *et al.*, 1996).

La temperatura óptima para una enzima depende, entre otros factores, del sustrato con el que se trabaje, ya que los ligandos ejercen un efecto protector frente a la desnaturalización térmica (Chávez *et al.*, 1990). La temperatura óptima para las lipasas puede encontrarse en el intervalo entre 35 y 50 °C, aunque existen lipasas termoestables que exhiben valores de temperatura óptima superiores a 50 °C (tabla 3).

El medio en el que se encuentre la enzima también influye en el valor de temperatura óptima. De este modo, las lipasas presentes en preparados crudos, con altas concentraciones de otras proteínas contaminantes distintas de las proteasas, serán más estables y exhibirán valores aparentes de temperatura óptima superiores (Chávez *et al.*, 1990). La inmovilización puede producir incrementos en los valores de temperatura óptima de las lipasas solubles (Palomo *et al.*, 2004; Wei y Wu, 2008), debido a su efecto sobre la estabilidad enzimática (Balcão *et al.*, 1996).

Tabla 3. Valores óptimos de pH y temperatura de diferentes lipasas en sus formas solubles.

Fuente	pH óptimo	Temperatura óptima (°C)	Referencia
<i>Conejillo de indias</i> (macrófagos del peritoneo)	4,5/7,0	ND	Kiyotani <i>et al.</i> 1983
<i>Chromobacterium viscosum</i>	7,0	42	Prazeres <i>et al.</i> , 1996
<i>Rhizomucor miehei</i>	8,0	50	Wu <i>et al.</i> , 1996
Salvado de arroz	11,0	80	Bhardwaj <i>et al.</i> , 2001
<i>Acinetobacter</i> sp.	9,0	55	Snellman <i>et al.</i> , 2002
<i>Helicobacter pylori</i>	10,0	50	Ruiz <i>et al.</i> , 2007
Calamar <i>Todarodes pacificus</i> (lipasa hepática)	8,0	35-40	Park <i>et al.</i> , 2008
<i>Burkholderia</i> sp.	8,0	40	Wei y Wu, 2008

ND: No determinado.

Inhibidores, inhibición y efecto de aditivos sobre la actividad enzimática

Las lipasas son inhibidas por los organofosfatos (Kordel y Schmid, 1991; Cavalier *et al.*, 2000), como el dietil-*p*-nitrofenilfosfato y el diisopropil-fluorofosfato (Bhardwaj *et al.*, 2001), por las carbodiimidias en presencia de nucleófilos, como el glicin-etil éster, y por el yodo. También son inhibidores de lipasas los ácidos borónicos y el fenil-metil-sulfonil-fluoruro (Dandavate *et al.*, 2009), así como los metales pesados, el EDTA (Snellman *et al.*, 2002; Dandavate *et al.*, 2009), algunos terpenos (Morikawa *et al.*, 2009), los iones halógenos, los alcaloides, el cloroformo, el *n*-hexanol, el dietil-fenil carbonato, el bromoformo, varias lactonas (Colowick y Kaplan, 1955; Kordel y Schmid, 1991) y algunos 1,2-etilen-di-*N*-alquil-carbamatos en presencia de detergentes (Lin *et al.*, 2007). Algunos cationes metálicos pueden producir inhibición (Wu *et al.*, 1996; Snellman *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2008; Dandavate *et al.*, 2009).

Los inhibidores de naturaleza proteica son más específicos por su lipasa blanco, como es el caso del aislado a partir de la harina de trigo, que inhibió a la lipasa pancreática, pero no fue capaz de inhibir completamente la actividad lipasa de *Candida cylindracea* y no ejerció ningún efecto sobre otras lipasas aisladas de micobacterias (Tani *et al.*, 1994). Algunas proteínas hidrofóbicas, como la albúmina de suero bovino, inhiben a las lipasas mediante su unión competitiva a las interfaces (Larsson y Erlanson-Albertsson, 1983). Para varias lipasas se han informado los fenómenos de inhibición por exceso de sustrato, frente a trioléina (Biesiot y Capuzzo, 1990; Prazeres *et al.*, 1996), e inhibición por producto, causado por los ácidos grasos (Larsson y Erlanson-Albertsson, 1983). Los detergentes (Tsai *et al.*, 1996; Brockman, 2000) y las emulsiones de varios solventes orgánicos (Sugiura e Isobe, 1975) pueden actuar como inhibidores de las lipasas. Algunos

autores han informado inhibición competitiva causada por concentraciones elevadas de detergentes (Kimura *et al.*, 1982).

La actividad lipasa puede ser afectada de diferentes maneras por la presencia de iones metálicos en la preparación, los que pueden estabilizar o desestabilizar la estructura de estas enzimas en solución (Tyndall *et al.*, 2002). Muchas lipasas requieren del ion Ca^{2+} para mantener una conformación estable y/o catalíticamente competente (Amada *et al.*, 2001; Snellman *et al.*, 2002). Además del efecto inhibitorio ya mencionado, los cationes metálicos también pueden actuar como activadores de las lipasas (Kimura *et al.*, 1982; Snellman *et al.*, 2002; Dandavate *et al.*, 2009). El efecto activador del Ca^{2+} puede manifestarse como un incremento de la $V_{\text{máx}}$ y/o un decremento de la K_M (Kimura *et al.*, 1982). Algunos iones provocan efectos opuestos en lipasas diferentes (Wu *et al.*, 1996; Snellman *et al.*, 2002). También pueden influir sobre la actividad de estas enzimas el tampón (Alston y Freedman, 2001), el solvente (Sugiura e Isobe, 1975; Triantafyllou *et al.*, 1993; Sharma *et al.*, 2002; Dandavate *et al.*, 2009) y la fuerza iónica del medio (Mead *et al.*, 2002). El efecto inhibitorio del EDTA se basa en su capacidad de quelar el Ca^{2+} .

Los detergentes o surfactantes son aditivos de primera importancia para la actividad lipolítica (Dandavate *et al.*, 2009), puesto que intervienen en la formación de micelas a partir de la dispersión de los grandes agregados hidrofóbicos en que se organizan espontáneamente los sustratos naturales de estas enzimas en solución acuosa. Esto trae como consecuencia un incremento notable del área superficial disponible para la interacción enzima-sustrato, con el consiguiente efecto sobre la velocidad de la reacción (Egmond, 1996). Estas sustancias pueden además formar micelas invertidas en solventes orgánicos con un contenido de agua moderado, lo que puede traducirse en una mayor actividad y estabilización de las moléculas enzimáticas ubicadas en su interior (Shome *et al.*, 2007). Los detergentes también pueden in-

fluir sobre las propiedades estereoselectivas de las lipasas (Tsai *et al.*, 1996).

Sin embargo, el efecto de los detergentes no es homogéneo para todas las enzimas, ni éstas son afectadas del mismo modo por todos los surfactantes (Aloulou *et al.*, 2007). Además, la influencia de estos compuestos sobre la actividad lipasa es dependiente de la dosis (Sonesson *et al.*, 2006). Las sales biliares son activadores fundamentales para las lipasas pancreáticas de mamíferos en presencia de colipasa (Kimura *et al.*, 1982; Larsson y Erlanson-Albertsson, 1983), y resultan inhibitorias para otras lipasas (Barnescu *et al.*, 1997). El SDS, conocido por su efecto desnaturalizante sobre las proteínas, activa a determinadas lipasas e inhibe a otras (Wu *et al.*, 1996). Algunos detergentes no iónicos previenen la formación de agregados enzimáticos (Palomo *et al.*, 2003) y estabilizan estructuralmente a la molécula (Guisán *et al.*, 1996b). El Triton-X100 es un detergente no iónico conocido por su capacidad de estimular la actividad de las lipasas (Sharma *et al.*, 2002).

Métodos de determinación de la actividad enzimática

La actividad esterasa más general puede determinarse empleando como sustratos los ésteres de cadena acílica del *p*-nitrofenol o del α/β -naftol, siguiendo la liberación de la base alcohólica por métodos espectrofotométricos. Deben considerarse los distintos coeficientes de extinción del *p*-nitrofenol a diferentes valores de pH, la ausencia de absorbancia a pH ácido, y la ocurrencia de hidrólisis espontánea a pH básico (De Caro *et al.*, 1986; Gupta *et al.*, 2003).

Se han desarrollado numerosos ensayos para cuantificar la actividad hidrolítica de las lipasas en distintas muestras biológicas. Éstos permiten monitorear tanto el consumo de los sustratos como la liberación de los productos en el tiempo (Beisson *et al.*, 2000). La desaparición de los sustratos puede seguirse por nefelometría o turbidimetría (von Tigerstrom y

Stelmaschuk, 1989). Sin embargo, algunas variantes de estos métodos experimentan interferencias debidas a la complejidad de ciertas mezclas. El consumo de los sustratos también puede ser monitoreado por métodos espectrofotométricos (Goujard *et al.*, 2009), tensiometría interfacial (Aloulou *et al.*, 2007), microscopía de fuerza atómica (Prim *et al.*, 2006) y espectroscopía infrarroja. Los últimos tres métodos requieren un equipamiento costoso.

El análisis de la velocidad de liberación de los ácidos grasos puede efectuarse indirectamente mediante el seguimiento de los protones liberados durante la hidrólisis enzimática. El método de pH-stat, que se fundamenta en la valoración de la disminución del pH en el tiempo, es una de las técnicas más utilizadas bajo este principio (Bertolini *et al.*, 1995). Los ácidos grasos liberados por la actividad de la lipasa se ionizan en solución acuosa mediante la pérdida de protones y la mezcla de reacción tiende a acidificarse. La velocidad de liberación de los ácidos grasos es proporcional a la velocidad de liberación de los protones y, por tanto, a la velocidad de acidificación del medio. Si se añade NaOH a la misma velocidad a la que se liberan los protones, el pH de la mezcla se mantiene constante en el tiempo. Este ensayo consiste en registrar la velocidad a la que es necesario añadir el NaOH titulante a la mezcla de reacción, a fin de mantener el pH en un valor fijo. Esta velocidad es proporcional a la velocidad de hidrólisis enzimática de los enlaces éster del sustrato y, por tanto, su medición permite determinar la actividad de la enzima. La técnica de pH-stat se ha empleado para cuantificar la actividad lipasa en plantas, suero, plasma y secreción duodenal. El ensayo presenta un límite de detección en el orden de 0,1 $\mu\text{mol}/\text{min}$ y solo puede desarrollarse en un intervalo restringido de valores de pH, los que deben igualar o exceder el valor aparente de pK_a de los ácidos grasos liberados, ya que éstos deben encontrarse parcialmente ionizados (Beisson *et al.*, 2000).

Otra forma de medir la liberación de protones durante el avance de la reacción es mediante el empleo de indicadores coloreados,

cuyos espectros de absorción cambian con la variación del pH. Estos métodos son poco específicos y pueden detectar cualquier enzima que acidifique el medio (Lobo de Araújo y Radvanyi, 1987). También es posible medir directamente la disminución en el pH, pero esta variante es muy poco sensible y los cambios de pH pueden quedar enmascarados por la acción del tampón (Tan y Tan, 1988).

La cuantificación de los ácidos grasos liberados durante el transcurso de la reacción se ha abordado utilizando métodos colorimétricos que apelan a reactivos cromogénicos cuyas absorbancias varían al interactuar con estas moléculas. Para garantizar una señal de fondo lo más baja posible, los triacilglicéridos empleados como sustratos no deben contener cantidades elevadas de ácidos grasos libres acompañantes. También se han desarrollado ensayos fluorimétricos (Knotz *et al.*, 2006), basados en la interacción entre los ácidos grasos liberados y determinados fluoróforos. Estos métodos son muy sensibles y costosos. La cromatografía en placa fina permite cuantificar los ácidos grasos liberados mediante técnicas densitométricas o autorradiográficas. Este método es discontinuo y consume mucho tiempo. La separación entre el sustrato y los productos radiactivos también puede realizarse mediante HPLC, centrifugación o extracción con solventes. El ensayo radioisotópico es muy específico y sensible, y su límite de detección es del orden de los picomoles. Su inconveniente principal radica en el empleo de triacilglicéridos sintéticos marcados radiactivamente (Beisson *et al.*, 2000).

Esta variedad de ensayos enzimáticos proporciona amplias posibilidades al investigador en este campo, pero al mismo tiempo dificulta la comparación entre los resultados obtenidos en distintos laboratorios mediante el empleo de métodos diferentes. Esto se debe a que las condiciones del ensayo influyen sobre la velocidad de la reacción catalizada enzimáticamente (Chávez *et al.*, 1990).

Inmovilización

Las ventajas derivadas de la inmovilización de enzimas también son aplicables a las lipasas. Debido a la hidrofobicidad marcada que presentan los sustratos naturales de estas enzimas, las mezclas de reacción en las que ellas operan deben contener un solvente orgánico o un agente emulsificante apropiados, que traen consigo la ruptura de la homogeneidad del medio. Bajo estas condiciones, es deseable que la lipasa constituya una fase independiente dentro del sistema de reacción, a fin de prevenir la contaminación de los productos con cierto nivel de actividad enzimática residual. Esta aspiración tecnológica puede alcanzarse con la inmovilización, la que además extiende el tiempo de vida útil del reactor (Balcão *et al.*, 1996; Knežević *et al.*, 2004). Se ha desarrollado una variedad amplia de protocolos de inmovilización para las lipasas (tabla 4).

Inmovilización por adsorción interfacial

Uno de los protocolos de inmovilización más difundidos para las lipasas es la adsorción selectiva sobre soportes con cierto grado de hidrofobicidad (Fernández-Lafuente *et al.*, 1998). Según la propuesta de Bastida *et al.* (1998), los soportes hidrofóbicos mimetizan las interfaces formadas por los sustratos naturales de las lipasas, por lo que estas enzimas se adsorben fuertemente sobre ellos en una forma abierta e hiperactivada, involucrando la zona de contacto lipídico (Okkels *et al.*, 1996). Esta interacción no es un efecto de asociaciones hidrofóbicas, ya que se produce a fuerzas iónicas bajas (Bastida *et al.*, 1998; Fernández-Lafuente *et al.*, 1998; Sabuquillo *et al.*, 1998; Snellman *et al.*, 2002) y las lipasas son proteínas muy hidrofílicas (Fernández-Lafuente *et al.*, 1998). Por tanto, este es un mecanismo de adsorción interfacial, basado en la activación interfacial y propio solo de proteínas con actividad superficial como las lipasas.

Tabla 4. Algunos métodos de inmovilización empleados para las lipasas

Fuente	Soporte	Método	Referencia
<i>Candida cylindracea</i>	Alginato de sodio	Atrapamiento	Hertzberg <i>et al.</i> 1992
Páncreas porcino	Celite, esferas de vidrio-aminopropil, silanizado y con lavado ácido.	Adsorción física	Martins <i>et al.</i> , 1994
<i>C. antarctica</i>	Resina acrílica	Enlazamiento iónico	Claon y Akoh, 1994
<i>C. rugosa</i>	Polipropileno	Adsorción física	López <i>et al.</i> , 2001
<i>C. antarctica</i> A y B, <i>C. rugosa</i> , <i>Rhizomucor miehei</i> , <i>Rhizopus oryzae</i>	Sulfato-dextrana-MANAE-agarosa CL 4B	Enlazamiento iónico	Fuentes <i>et al.</i> , 2004
Páncreas porcino	Esferas de criogel polivinil-alcohol	Enlazamiento covalente	Markvicheva <i>et al.</i> , 2005
<i>Arthrobacter</i> sp.	Materiales hidrofóbicos sol-gel	Encapsulación	Yang <i>et al.</i> , 2009
<i>Thermomyces lanuginosa</i>	Glutaraldehído	Entrecruzamiento	Gupta y Khare, 2009

Entre las bondades que presenta el método de inmovilización por adsorción interfacial pueden citarse la sencillez de la técnica, la ausencia de reactivos caros y tóxicos, la capacidad para retener o incrementar la actividad específica (Malcata *et al.*, 1992; Palomo *et al.*, 2004; Cunha *et al.*, 2009), la potenciación de la estereoselectividad de la lipasa (Bastida *et al.*, 1998; Fernández-Lafuente *et al.*, 1998), y la posibilidad de recuperar el soporte, debido a la reversibilidad parcial de las interacciones (Balcão *et al.*, 1996).

Entre los soportes más utilizados para estos fines se encuentran aquellos basados en la activación de la agarosa con grupos hidrofóbicos como butilo, fenilo y octilo (Bastida *et al.*, 1998; Sabuquillo *et al.*, 1998; Fernández-Lafuente *et al.*, 1998; Cunha *et al.*, 2009). La fortaleza de la adsorción de las lipasas sobre octyl-agarosa es de tal magnitud, que se requieren altas concentraciones de detergente, urea o guanidina para romper las interacciones (Fernández-Lafuente *et al.*, 1998).

Aplicaciones biotecnológicas

Las enzimas son catalizadores biológicos extraordinariamente específicos y de gran

poder catalítico. La aplicación industrial de la tecnología enzimática es particularmente interesante en procesos que requieren condiciones de reacción suaves, en términos de pH, temperatura y presión, debido a la labilidad de la mezcla. Estas moléculas se requieren en cantidades pequeñas, pueden distinguir entre grupos funcionales de reactividad similar y son capaces de modificar un sustrato dado dentro de una mezcla compleja, llegando a discriminar incluso entre dos isómeros ópticos en el caso de compuestos quirales. En la literatura especializada puede encontrarse abundante documentación sobre el empleo de enzimas en la obtención de principios activos (Klibanov, 1990).

Las lipasas son enzimas con una aplicación amplia en diferentes procesos industriales, particularmente en sus formas inmovilizadas. Ellas se emplean en la producción de detergentes y de saborizantes naturales (Pandey *et al.*, 1999), en la hidrólisis de aceites y grasas (Taylor, 1996), en la producción de papel (Jaeger y Reetz, 1998) y en la elaboración de cosméticos (Benjamin y Pandey, 1998). Debido a su capacidad de catalizar la síntesis de determinados compuestos en medios orgánicos con actividad de agua controlada (Dandavate *et al.*, 2009;

Gupta y Khare, 2009), las lipasas se han empleado en la producción de intermediarios para la síntesis orgánica (Vaidya, 1996), así como de penicilinas (Savidge, 1984).

Las lipasas han sido utilizadas extensivamente en la obtención de compuestos ópticamente puros (Yoshimura *et al.*, 2002) y en la resolución de mezclas racémicas (Kirchner *et al.*, 1985; Felluga *et al.*, 2009), aprovechando sus propiedades estereoespecíficas (Bornscheuer, 2002; Segura *et al.*, 2004). Esta aplicación tiene un impacto considerable en la producción de fármacos más selectivos y efectivos, con efectos secundarios menores, y en la obtención de pesticidas con menor incidencia en el medio ambiente (Zarevúcka y Wimmer, 2008). Esto se debe a que la actividad funcional de los compuestos quirales es debida generalmente a uno de los enantiómeros, mientras que el otro es inocuo o perjudicial, y puede reducir la actividad del primero, provocar reacciones colaterales indeseadas, o simplemente aportar una contribución innecesaria a la dosis terapéutica con su presencia en la mezcla (Ariens, 1984).

Conclusiones

Las lipasas son enzimas extraordinariamente versátiles que han recibido considerable atención en biotecnología desde hace más de tres décadas. Esto se debe a las peculiares propiedades funcionales que exhiben estas moléculas, dado su carácter de enzimas interfaciales. La activación en interfaces, una especificidad de sustrato amplia y una selectividad basada en múltiples determinantes estructurales, una sensibilidad de la actividad enzimática muy rica frente a numerosos y variados efectores, la posibilidad de inmovilización con altas retenciones de la actividad funcional, la estabilidad operacional de los biocatalizadores inmovilizados, la estabilidad en solventes orgánicos, y la capacidad de desarrollar la catálisis en medios con baja actividad de agua, son algunos de los aspectos más atractivos de las lipasas que han determinado su papel protagónico en numerosos procedimientos de la tecnología enzimática.

Profundizar en las bondades y limitaciones de estas enzimas como biocatalizadores, contribuye a la optimización de los procesos biotecnológicos en los que ellas participan y, por tanto, a una mejor aplicación de las lipasas para la obtención de bioproductos de utilidad humana.

Referencias bibliográficas

- Alam, M., Vance, D. E., Lehner, R. 2002. Structure-function analysis of human triacylglycerol hydrolase by site-directed mutagenesis: identification of the catalytic triad and a glycosylation site. *Biochem J* 41 (21): 6679-87.
- Aloulou, A., Puccinelli, D., De Caro, A. M., Leblond, Y., Carrière, F. 2007. A comparative study on two fungal lipases from *Thermomyces lanuginosus* and *Yarrowia lipolytica* shows the combined effects of detergents and pH on lipase adsorption and activity. *Biochim Biophys Acta* 1771 (12): 1446-56.
- Aloulou, A., Rodríguez, J. A., Fernández, S., van Oosterhout, D., Puccinelli, D., Carrière, F. 2006. Exploring the specific features of interfacial enzymology based on lipase studies. *Biochim Biophys Acta* 1761 (9): 995-1013.
- Alston, M. J., Freedman, R. B. 2001. A comparison of lipase-catalyzed ester and lactone synthesis in low-water systems: Analysis of optimum water activity. *J Basic Microbiol* 41 (6): 363-6.
- Amada, K., Kwon, H. J., Haruki, M., Morikawa, M., Kanaya, S. 2001. Ca²⁺-induced folding of a family I.3 lipase with repetitive Ca²⁺ binding motifs at the C-terminus. *FEBS Lett* 509 (1): 17-21.
- Ariens, E. J. 1984. Stereochemistry, a basis for sophisticated nonsense in pharmacokinetics and clinical pharmacology. *Eur J Clin Pharmacol* 26 (6): 663-8.
- Balcão, V. M., Paiva, A. L., Malcata, F. X. 1996. Bioreactors with immobilized lipases: State of the art. *Enzyme Microb Technol* 18: 392-416.
- Barnescu, R., Serban, M., Rugina, A., Crisan, I., Cepisca, C., Caloianu, M. 1997. Biochemical characteristics in heterogeneous catalysis correlated with bioactive effect of the extracted components. *Romanian J Biol Sci* 1-2: 84-9.
- Bastida, A., Sabuquillo, P., Armisen, P., Fernández-Lafuente, R., Hugué, J., Guisán, J. M. 1998. A single step purification, immobilization and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. *Biotechnol Bioeng* 58 (5): 486-93.

- Beisson, F., Tiss, A., Rivière, C., Verger, R. 2000. Methods for lipase detection and assay: a critical review. *Eur J Lipid Sci Technol* 133-53.
- Benjamin, S., Pandey, A. 1998. *Candida rugosa* lipases: molecular biology and versatility in biotechnology. *Yeast* 14 (12): 1069-87.
- Berner, D. L., Hammond, E. G. 1970. Phylogeny of lipase specificity. *Lipids* 5 (6): 558-62.
- Bertolini, M. C., Schrag, J. D., Cygler, M., Ziomek, E., Thomas, D. Y., Vernet, T. 1995. Expression and characterization of *Geotrichum candidum* lipase I gene. Comparison of specificity profile with lipase II. *Eur J Biochem* 228 (3): 863-9.
- Bhardwaj, K., Raju, A., Rajasekharan, R. 2001. Identification, purification and characterization of a thermally stable lipase from rice bran. A new member of the (phospho) lipase family. *Plant Physiol* 127 (4): 1728-38.
- Biesiot, P. M., Capuzzo, J. M. 1990. Digestive protease, lipase, and amylase activities in stage I larvae of the american lobster, *Homarus americanus*. *Comp Biochem Physiol* 95A (1): 47-54.
- Bornscheuer, U., Reif, O. W., Lausch, R., Freitag, R., Scheper, T., Kolisis, F. N., Menge, U. 1994. Lipase of *Pseudomonas cepacia* for biotechnological purposes: purification, crystallization and characterization. *Biochim Biophys Acta* 1201: 55-60.
- Bornscheuer, U. T. 2002. Methods to increase enantioselectivity of lipases and esterases. *Curr Opin Biotech* 13: 543-7.
- Brockman, H. L. 2000. Kinetic behavior of the pancreatic lipase-colipase-lipid system. *Biochimie* 82 (11): 987-95.
- Carter, P., Wells, J. A. 1988. Dissecting the catalytic triad of a serine protease. *Nature* 332: 564-8.
- Cavalier, J. F., Buono, G., Verger, R. 2000. Covalent inhibition of digestive lipases by chiral phosphonates. *Acc Chem Res* 33 (9): 579-89.
- Chahinian, H., Nini, L., Boitard, E., Dubes, J. P., Comeau, L. C., Sarda, L. 2002. Distinction between esterases and lipases: a kinetic study with vinyl esters and TAG. *Lipids* 37 (7): 653-62.
- Chávez, M. A., Díaz, J., Pérez, U., Delfín, J. 1990. *Temas de enzimología*. La Habana, Cuba: Ed. Min. Educación Superior. 567 p.
- Claon, P. A., Akoh, C. C. 1994. *Enzyme Microb. Technol* 16: 835-8. En: Balcão, V. M., Paiva, A. L., Malcata, F. X. 1996. Bioreactors with immobilized lipases: State of the art. *Enzyme Microb Technol* 18: 392-416.
- Colowick, S. P., Kaplan, N. O. 1955. Preparation and assay of enzymes. *Methods in Enzymology*. New York: Academic Press INC., Publishers. Vol. I. 835 p.
- Cunha, A. G., Fernández-Lorente, G., Gutarra, M. L. E., Bevilaqua, J. V., Almeida, R. V., Paiva, L. M. C., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J. M., Freire, D. M. G. 2009. Separation and immobilization of lipase from *Penicillium simplicissimum* by selective adsorption on hydrophobic supports. *Appl Biochem Biotechnol* 156: 563-575.
- Cygler, M., Grochulski, P., Schrag, J. D. 1995. Structural determinants defining common stereoselectivity of lipases toward secondary alcohols. *Can J Microb* 41 (1): 289-96.
- Dandavate, V., Jinjala, J., Keharia, H., Madamwar, D. 2009. Production, partial purification and characterization of organic solvent tolerant lipase from *Burkholderia multivorans* V2 and its application for ester synthesis. *Bioresour Technol* 100 (13): 3374-81.
- De Caro, J. D., Rouimi, P., Rovey, M. 1986. Hydrolysis of *p*-nitrophenyl acetate by the peptide chain fragment (336-449) of porcine pancreatic lipase. *Eur J Biochem* 158: 601-7.
- Derewenda, U., Swenson, L., Wei, Y., Green, R., Kobos, P. M., Joerger, R., Haas, M. J., Derewenda, Z. S. 1994b. Conformational lability of lipases observed in the absence of an oil-water interface: crystallographic studies of enzymes from the fungi *Humicola lanuginosa* and *Rhizopus delemar*. *J Lipid Res* 35: 524-34.
- Derewenda, Z. S., Derewenda, U., Kobos, P. M. 1994a (His) C epsilon-H...O=C< hydrogen bond in the active sites of serine hydrolases. *J Mol Biol* 241 (1): 83-93.
- Dosanjh, N. S., Kaur, J. 2002. Biochemical analysis of a native and proteolytic fragment of a high-molecular-weight thermostable lipase from a mesophilic *Bacillus sp.* *Prot. Express. Purif* 24 (1): 71-5.
- Egmond, M. R. 1996. Action of lipases. En: Malcata F. X. *Engineering of / with lipases*. Netherlands: Kluwer Academic Publishers. p. 183-91.
- Ericsson, D. J., Kasrayan, A., Johansson, P., Bergfors, T., Sandström, A. G., Bäckvall, J. E., Mowbray, S. L. 2008. X-ray structure of *Candida antarctica* lipase A shows a novel lid structure and a likely mode of interfacial activation. *J Mol Biol* 376 (1): 109-19.
- Felluga, F., Baratta, W., Fanfoni, L., Pitacco, G., Rigo, P., Benedetti, F. 2009. Efficient chemoenzymatic synthesis of chiral pincer ligands. *J Org Chem* 74 (9): 3547-50.

- Fernández-Lafuente, R., Armisen, P., Sabuquillo, P., Fernández-Lorente, G., Guisán, J. M. 1998. Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. *Chem Phys Lipids* 93: 185-97.
- Flaschel, E., Renken, A. 1991. The behaviour of the *Candida rugosa* lipase in the presence of soluble substrates. En: Alberghina, L., Schmid, R. D. Verger, R. 1991. *Lipases: Structure, Mechanism and Genetic Engineering*. Weinheim: GBF Monographs, VCH. 16: 349-52.
- Foresti, M. L., Ferreira, M. L. 2004. Computational approach to solvent-free synthesis of ethyl oleate using *Candida rugosa* and *Candida antarctica* B Lipases. I. Interfacial activation and substrate (ethanol, oleic acid) adsorption. *Biomacromolecules* 5 (6): 2366-75.
- Fuentes, M., Pessela, P. C. C., Maquiese, J. V., Ortiz, C., Segura, R. L., Palomo, J. M. *et al.* 2004. Reversible and strong immobilization of proteins by ionic exchange on supports coated with sulfate-dextrans. *Biotechnol Prog* 20: 1134-9.
- Goujard, L., Villeneuve, P., Barea, B., Lecomte, J., Pina, M., Claude, S., Le Petit, J., Ferré, E. 2009. A spectrophotometric transesterification-based assay for lipases in organic solvent. *Anal Biochem* 385 (1): 161-7.
- Grochulski, P., Bouthillier, F., Kazlauskas, R. J., Serreque, A. N., Schrag, J. D., Ziomek, E., Cygler, M. 1994b. Analogs of reaction intermediates identify a unique substrate binding site in *Candida rugosa* lipase. *Biochem* 33 (12): 3493-3500.
- Grochulski, P., Li, Y., Schrag, J. D., Cygler, M. 1994a. Two conformational states of *Candida rugosa* lipase. *Protein Sci* 3 (1): 82-91.
- Guisán, J. M., Fernández-Lafuente, R., Bastida, A., Blanco, R. M., Soler, G., García-Junceda, E. 1996a. Utilization of unfolding/refolding strategies for reactivation of immobilized derivatives of lipases after inactivation by organic solvents. En: Malcata F. X. 1996. *Engineering of / with lipases*. Netherlands: Kluwer Academic Publishers. p. 257-71.
- Guisán, J. M., Fernández-Lafuente, R., Bastida, A., Blanco, R. M., Soler, G., García-Junceda, E. 1996b. Modulation of activity/stability properties of lipase from *Pseudomonas fluorescens* by multipoint covalent immobilization on glyoxyl-supports. En: Malcata F.X. 1996. *Engineering of / with lipases*. Netherlands: Kluwer Academic Publishers. p. 243-56.
- Gupta, A., Khare, S. K. 2009. Enzymes from solvent-tolerant microbes: useful biocatalysts for non-aqueous enzymology. *Crit Rev Biotechnol* 29 (1): 44-54.
- Gupta, R., Rathi, P., Gupta, N., Bradoo, S. 2003. Lipase assays for conventional and molecular screening: an overview. *Biotech Appl Biochem* 37: 63-71.
- Hertzberg, S., Kvittingen, L., Anthonsen, T., Skjak-Braek, G. 1992. *Enzyme Microb. Technol.* 14: 42-7. En: Balcão, V. M., Paiva, A. L., Malcata, F. X. 1996. Bioreactors with immobilized lipases: State of the art. *Enzyme Microb Technol* 18: 392-416.
- Hui, D. Y., Howles, P. N. 2002. Carboxyl ester lipase: structure-function relationship and physiological role in lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *J Lipid Res* 43 (12): 2017-30.
- Jaeger, K. E., Reetz, M. T. 1998. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnol* 16 (9): 396-403.
- Jensen, M. Ø., Jensen, T. R., Kjaer, K., Bjørnholm, T., Mouritsen, O. G., Günther, H. P. 2002. Orientation and conformation of a lipase at an interface studied by molecular dynamics simulations. *Biophys J* 83: 98-111.
- Jensen, R. G., De Jong, F. A., Lambert-Davis, L. G., Hamosh, M. 1994. Fatty acid and positional selectivities of gastric lipase from premature human infants, in vitro studies. *Lipids* 29: 433-5.
- Jensen, R. G., Hamosh, M. 1996. Selectivity of lipases: types and determination. En: Malcata, F. X. *Engineering of / with lipases*. Netherlands: Kluwer Academic Publishers. p.17-30.
- Kim, K. K., Song, H. K., Shin, D. H., Hwang, K. Y., Suh, S. W. 1997. The crystal structure of a triacylglycerol lipase from *Pseudomonas cepacia* reveals a highly open conformation in the absence of a bound inhibitor. *Structure* 5: 173-85.
- Kimura, H., Futami Y., Tarui, S., Shinomiya, T. 1982. Activation of human pancreatic lipase activity by calcium and bile salts. *J Biochem* 92: 243-51.
- Kirchner, G., Scollar, M. P., Klibanov, A. M. 1985. Resolution of racemic mixtures via lipase catalysis in organic solvents. *J Am Chem Soc* 107: 7072-6.
- Kiyotani, K., Tasaka, H., Tsukiyama, F., Matsuo, Y. 1983. Lipase activity of guinea pig peritoneal macrophages and mycobacterial lipase inhibitor. *Hiroshima J Med Sci* 32 (3): 267-71.
- Klibanov, A. M. 1990. Asymmetric transformations catalyzed by enzymes in organic solvents. *Acc Chem Res* 23: 114-20.
- Knežević, Z. D., Šiler-Marinković, S. S., Mojović, L. V. 2004. Immobilized lipases as practical catalysts. *AP-TEFF* 35: 151-64.

- Knotz, S., Boersma, M., Saborowski, R. 2006. Microassays for a set of enzymes in individual small marine copepods. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 145 (3): 406-11.
- Kordel, M., Schmid, R. D. 1991. Inhibition of the lipase from *Pseudomonas spec.* ATCC 21808 by diethyl *p*-nitrophenylphosphate. Hints for one buried active site for lipolytic and esterolytic activity. En Alberghina, L., Schmid, R. D., Verger, R. 1991. *Lipases: Structure, Mechanism and Genetic Engineering*. Weinheim: GBF Monographs, VCH 16: 385-7.
- Larsson, A., Erlanson-Albertsson, C. 1983. The importance of bile salt for the reactivation of pancreatic lipase by colipase. *Biochim Biophys Acta* 750: 171-7.
- Li, N., Zeng, Q. M., Zong, M. H. 2009. Substrate specificity of lipase from *Burkholderia cepacia* in the synthesis of 3'-arylaliphatic acid esters of floxuridine. *J Biotechnol* 142 (3-4): 267-70.
- Lin, M. C., Lu, C. P., Cheng, Y. R., Lin, Y. F., Lin, C. S., Lin, G. 2007. Inhibition or activation of *Pseudomonas* species lipase by 1,2-ethylene-di-N-alkylcarbamates. *Chem Phys Lipids* 146 (2): 85-93.
- Lobo de Araújo, A., Radvanyi, F. 1987. Determination of phospholipase A₂ activity by a colorimetric assay using a pH indicator. *Toxicol* 25 (11): 1181-8.
- López, N., Pérez, R., Vázquez, F., Valro, F., Sánchez, A. 2001. Immobilization of different *Candida rugosa* lipases by adsorption onto polypropylene powder; application to quiral synthesis of ibuprofen and 2-phenyl-1-cyclohexanol esters. *J Chem Technol Biochem* 77: 175-8.
- Lotti, M., Alberghina, L. 1996. *Candida rugosa* lipase isozymes. Cloning, sequencing, analysis of the substrate binding pocket. En Malcata, F. X. 1996. *Engineering of / with lipases*. Netherlands: Kluwer Academic Publishers. p. 115-24.
- MacRae, A. R., Hammond, R. C. 1995. *Biotechnol Genet Eng Rev* 3: 193-217.
- Malcata, F. X. 1996. *Engineering of / with lipases: scope and strategies*. En Malcata, F. X. *Engineering of / with lipases*. Netherlands: Kluwer Academic Publishers. p. 1-16.
- Malcata, F. X., García, H. S., Hill, Jr. C. G., Amundson, C. H. 1992. Hydrolysis of butteroil by immobilized lipase using a hollow-fiber reactor: Part I. lipase adsorption studies. *Biotechnol Bioeng* 39: 647-57.
- Markvicheva, E. A., Lozinsky, V. I., Plieva, F. M., Kochetkov, K. A., Rumsh, L. D., Zubov, V. P. *et al.* 2005. Gel-immobilized enzymes as promising biocatalysts: Results from Indo-Russian collaborative studies. *Pure Appl Chem* 77 (1): 227-36.
- Martins, J. F., Carvalho, I. B., Sampaio, T. C., Barreiros, S. 1994. *Enzyme Microb Technol* 16: 785-90. En Balcão, V. M., Paiva, A. L., Malcata, F. X. 1996. *Bioreactors with immobilized lipases: State of the art*. *Enzyme Microb Technol* 18: 392-416.
- Mead, J. R., Irvine, S. A., Ramji, D. P. 2002. Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease. *J Mol Med* 80: 753-69.
- Miled, N., Bussetta, C., De Caro, A., Riviere, M., Berti, L., Canaan, S. 2003. Importance of the lid and cap domains for the catalytic activity of gastric lipases. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 136 (1): 131-8.
- Morikawa, T., Xie, Y., Asao, Y., Okamoto, M., Yamashita, C., Muraoka, O. *et al.* 2009. Oleanane-type triterpene oligoglycosides with pancreatic lipase inhibitory activity from the pericarps of *Sapindus rarak*. *Phytochemistry* 70 (9): 1166-72.
- Mukherjee, K. D. 1996. *Plant lipases in lipid biotransformations*. En Malcata, F. X. *Engineering of / with lipases*. Netherlands: Kluwer Academic Publishers. p. 391-401.
- Okkels, J. S., Svendsen, A., Patkar, S. A., Borch, K. 1996. Protein engineering of microbial lipases with industrial interest. En Malcata, F. X. 1996. *Engineering of / with lipases*. Netherlands: Kluwer Academic Publishers. p. 203-17.
- Ollis, D. L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra B., Frolow, F., Franken, S. M. *et al.* 1992. The α/β hydrolase fold. *Prot Eng* 5 (3): 197-211.
- Palomo, J. M., Fuentes, M., Fernández-Lorente, G., Mateo, C., Guisán, J. M., Fernández-Lafuente, R. 2003. General trend of lipase to self-assemble giving bimolecular aggregates greatly modifies the enzyme functionality. *Biomacromolecules* 4 (1): 1-6.
- Palomo, J. M., Segura, R. L., Fernández-Lorente, G., Pernas, M., Rúa, M. L., Guisán, J. M., Fernández-Lafuente, R. 2004. Purification, immobilization, and stabilization of a lipase from *Bacillus thermocatenulatus* by interfacial adsorption on hydrophobic supports. *Biotechnol Prog* 20: 630-5.
- Pandey, A., Benjamin, S., Soccol, C. R., Nigman, P., Krieger N., Soccol, V. T. 1999. The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnol. Appl Biochem* 29: 119-31.

- Park, J., Cho, S. Y., Choi, S. J. 2008. Purification and characterization of hepatic lipase from *Todarodes pacificus*. *BMB Rep* 41 (3): 254-8.
- Pedersen, S., Nesgaard, L., Baptista, R. P., Melo, E. P., Kristensen, S. R., Otzen, D. E. 2006. pH-dependent aggregation of cutinase is efficiently suppressed by 1,8-ANS. *Biopolymers* 83 (6): 619-29.
- Petersen, S. B. 1996. Lipases and esterases: some evolutionary and protein engineering aspects. En Malcata, F. X. 1996. *Engineering of / with lipases*. Netherlands: Kluwer Academic Publishers. p. 125-42.
- Prazeres, D. M. F., Lemos, F., García, F. A. P., Cabral, J. M. S. 1996. Reversed micellar membrane bioreactor. En Malcata, F. X. *Engineering of / with lipases*. Netherlands: Kluwer Academic Publishers. p. 483-513.
- Prim, N., Iversen, L., Diaz, P., Bjørnholm, T. 2006. Atomic force microscope studies on the interactions of *Candida rugosa* lipase and supported lipidic bilayers. *Colloids Surf B. Biointerfaces* 52 (2): 138-42.
- Ransac, S., Carrière, F., Rogalska, E., Verger, R., Marguet, F., Buono, G. *et al.* 1996. The kinetics, specificities and structural features of lipases. En Malcata, F. X. 1996. *Engineering of / with lipases*. Netherlands: Kluwer Academic Publishers. p. 143-82.
- Reis, P., Holmberg, K., Watzke, H., Leser, M. E., Miller, R. 2009. Lipases at interfaces: a review. *Adv Colloid Interface Sci* 147-148: 237-50.
- Rúa, M. L., Díaz-Mauriño, T., Fernández, V. M., Otero, C., Ballesteros, A. 1993. Purification and characterization of two distinct lipases from *Candida cylindracea*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1156: 181-9.
- Ruiz, C., Falcocchio, S., Pastor, F. I., Saso, L., Díaz, P. 2007. *Helicobacter pylori* EstV: identification, cloning, and characterization of the first lipase isolated. *Appl Environ Microbiol* 73 (8): 2423-31.
- Sabuquillo, P., Reina, J., Fernández-Lorente, G., Guisán, J. M., Fernández-Lafuente, R. 1998. Interfacial affinity chromatography of lipases: separation of different fractions by selective adsorption on supports activated with hydrophobic groups. *Biochim Biophys Acta* 1388: 337-48.
- Sarda, L., Desnuelle, P. 1958. Action de la lipase pancréatique sur les esters en émulsion. *Biocem Biophys Acta* 30 (3): 513-21.
- Savidge, T. A. 1984. Enzymatic conversions used in the production of penicillins and cephalosporins. En Vandamme, E. J. 1984. *Biotechnology of Industrial Antibiotics*. Drugs and Pharmaceuticals Sciences. New York: Marcel Dekker Inc. 22: 205-9.
- Segura, R. L., Palomo, J. M., Mateo, C., Cortés, A., Terreni, M., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J. M. 2004. Different properties of the lipases contained in porcine pancreatic lipase extracts as enantioselective biocatalysts. *Biotechnol Prog* 20 (3): 825-9.
- Sharma, A. K., Tiwari, R. P., Hoondal, G. S. 2002. Properties of a thermostable and solvent stable extracellular lipase from a *Pseudomonas sp.* AG-8. *Biotechnol Bioeng* 77 (6): 693-703.
- Shome, A., Roy, S., Das, P. K. 2007. Nonionic surfactants: a key to enhance the enzyme activity at cationic reverse micellar interface. *Langmuir* 23 (8): 4130-6.
- Shuen-Fuh, L., Chien-Ming, C., Chuan-Mei, Y., Ying-Chieh, T. 1996. Purification and partial characterization of an alkaline lipase from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-111. *Appl Environ Microbiol* 62 (3): 1093-5.
- Silva, A. M., Cabral, J. M., Costa, M. S., García, F. A. P. 1991. Characteristics of a new lipase from a *Thermus sp.* bacterium. En Alberghina, L., Schmid, R. D., Verger, R. 1991. *Structure, Mechanism and Genetic Engineering*. Weinheim: GBF Monographs, VCH. 16: 417-20.
- Snellman, E. A., Sullivan, E. R., Colwell, R. R. 2002. Purification and properties of the extracellular lipase, LipA, of *Acinetobacter sp.* RAG-1. *Eur J Biochem* 269: 5771-9.
- Sonesson, A. W., Elofsson, U. M., Brismar, H., Callisen, T. H. 2006. Adsorption and mobility of a lipase at a hydrophobic surface in the presence of surfactants. *Langmuir* 22 (13): 5810-7.
- Sugiura, M., Isobe, M. 1975. Studies on the mechanism of lipase reaction. I. Inhibition of lipase activity by emulsion of organic solvents. *Chem Pharm Bull* 23 (6): 1221-25.
- Taipa, M. A., Liebeton, K., Costa, J. V., Cabral, J. M., Jaeger, K. E. 1995. Lipase from *Chromobacterium viscosum*: biochemical characterization indicating homology to the lipase from *Pseudomonas glumae*. *Biochim. Biophys Acta* 1256 (3): 396-402.
- Tan, N. H., Tan, C. S. 1988. Acidimetric assay for phospholipase A using egg yolk suspension as substrate. *Anal Biochem* 170: 282-8.
- Tani, H., Ohishi, H., Watanabe, K. 1994. Purification and characterization of proteinaceous inhibitor of lipase from wheat flour. *J Agric Food Chem* 42 (11): 2382-5.

- Taylor, F. 1996. Lipase membrane reactor for continuous hydrolysis of tallow. En Malcata, F. X. 1996. Engineering of / with lipases. Netherlands: Kluwer Academic Publishers. p. 455-71.
- Triantafyllou, A. Ö., Adlercreutz, P., Mattiasson, B. 1993. Influence of the reaction medium on enzyme activity in bio-organic synthesis: behavior of lipase from *Candida rugosa* in the presence of polar additives. Biotechnol Appl Biochem 17: 167-79.
- Tsai, S-W., Lu, C-C., Chang, C-S. 1996. Surfactant enhancement of (S)-naproxen ester productivity from racemic naproxen by lipase in isooctane. Biotech Bioeng 51: 148-56.
- Tutar, Havva, Yilmaz, Elif, Pehlivan, Erol *et al.* 2009. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on sporopollenin from *Lycopodium clavatum*. Int J Biol Macromol 45 (3): 315-20.
- Tyndall, J. D., Sinchaikul, S., Fothergill-Gilmore, L. A., Taylor, P., Walkinshaw, M. D. 2002. Crystal structure of a thermostable lipase from *Bacillus stearothermophilus* P1. J Mol Biol 323 (5): 859-69.
- Vaidya, A. M. 1996. Bioreactors for continuous enzymatic esterification with insitu water activity control - I. En Malcata, F. X. Engineering of / with lipases. Netherlands: Kluwer Academic Publishers. p. 515-24.
- von Tigerstrom, R. G., Stelmaschuk, S. 1989. The use of Tween 20 in a sensitive turbidimetric assay of lipolytic enzymes. Can J Microb 35: 511-4.
- Wei, H-N., Wu, B. 2008. Screening and immobilization *Burkholderia* sp. GXU56 lipase for enantioselective resolution of (R,S)-methyl mandelate. Appl Biochem Biotechnol 149: 79-88.
- Wu, X. Y., Jaaskelainen, S., Linko, Y. Y. 1996. Purification and partial characterization of *Rhizomucor miehei* lipase for ester synthesis. Appl Biochem Biotech 59: 145-58.
- Yang, K. S., Sohn, J., Kim, H. K. 2009. Catalytic properties of a lipase from *Photobacterium lipolyticum* for biodiesel production containing a high methanol concentration. J Biosci Bioeng 107 (6): 599-604.
- Yoshimura, Y., Moon, H. R., Choi, Y., Márquez, V. E. 2002. Enantioselective synthesis of bicyclo[3.1.0]hexane carbocyclic nucleosides via a lipase-catalyzed asymmetric acetylation. Characterization of an unusual acetal byproduct. J Org Chem 67 (17): 5938-45.
- Zarevúcka, M., Wimmer, Z. 2008. Plant products for pharmacology: application of enzymes in their transformations. Int J Mol Sci 9 (12): 2447-73.
- Zouari, N., Miled, N., Cherif, S., Mejdoub, H., Gargouri, Y. 2005. Purification and characterization of a novel lipase from the digestive glands of a primitive animal: the scorpion. Biochim Biophys Acta 1726 (1): 67-74.