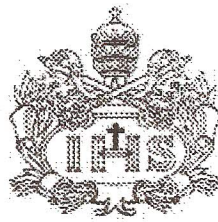


PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL



**DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD LIPOLÍTICA DE MICROORGANISMOS
TERMÓFILOS Y/O ACIDÓFILOS AISLADOS DE MUESTRAS DE MANANTIALES
TERMALES DEL PARQUE NACIONAL NATURAL LOS NEVADOS.**

ANDREA CATALINA ESPITIA ARIAS

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito parcial

Para optar el título de

MICROBIÓLOGA INDUSTRIAL

Bogotá D.C.

Mayo de 2010

**DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD LIPOLÍTICA DE MICROORGANISMOS
TERMÓFILOS Y/O ACIDÓFILOS AISLADOS DE MUESTRAS DE MANANTIALES
TERMALES DEL PARQUE NACIONAL NATURAL LOS NEVADOS.**

ANDREA CATALINA ESPITIA ARIAS

APROBADO

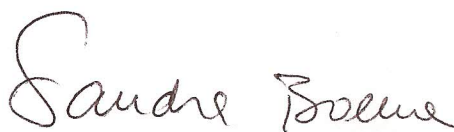
INGRID SCHULER Ph.D
Decana académica

JANETH ARIAS M. Sc
Directora de Carrera

**DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD LIPOLÍTICA DE MICROORGANISMOS
TERMÓFILOS Y/O ACIDÓFILOS AISLADOS DE MUESTRAS DE MANANTIALES
TERMALES DEL PARQUE NACIONAL NATURAL LOS NEVADOS.**

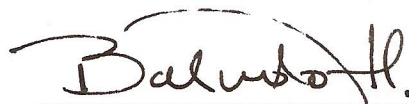
ANDREA CATALINA ESPITIA ARIAS

APROBADO



SANDRA BAENA Ph.D

Bióloga
Directora



BALKYS QUEVEDO M. Sc

Ingeniera Química
Jurado

NOTA DE ADVERTENCIA

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque la tesis no contenga ataques personales contra persona alguna, antes bien se ve en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

Artículo 23 de la resolución N°

13 de Julio de 1946.

Dedico este trabajo a Dios,
por guiarme en cada una de
mis acciones, y
especialmente a mis papás,
hermana y abuelita por su
apoyo incondicional, por
estar conmigo siempre y
acompañarme en el logro de
mis metas y sueños.

AGRADECIMIENTOS

-Al proyecto GeBiX, por el financiamiento de este trabajo.

-A la Unidad de Saneamiento y Biotecnología Ambiental por prestar sus instalaciones permitiendo el desarrollo de este estudio.

-A mi directora Sandra Baena, por brindarme sus conocimientos y colaboración y darme la oportunidad de realizar este proyecto bajo su dirección.

-A mi codirectora Gina López, por cada una de sus enseñanzas, por su paciencia y por su apoyo incondicional brindado durante todo este proceso.

- A mis amigas y compañeras de laboratorio Liza Franco y Ángela Mantilla por ayudarme todos los días, por su apoyo constante, y por brindarme su valiosa amistad.

- A mis compañeros de laboratorio de la USBA; Carolina Diaz, Carolina Rubiano, Javier Gómez y Luisa Fernanda Bernal por su apoyo, colaboración y por todas las enseñanzas que me ofrecieron.

- A los integrantes del laboratorio GeBiX, Jose Salvador Montaña, Diego Jiménez y Daniel Borda, por las asesorías brindadas.

-A mis padres por todo su apoyo y su comprensión, y porque son ellos quienes me han inculcado responsabilidad y compromiso en todos los aspectos de mi vida. A toda mi familia por su amor.

TABLA DE CONTENIDO

1	INTRODUCCIÓN	2
2	JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
3	MARCO TEÓRICO / REFERENTES CONCEPTUALES	4
3.1	Microorganismos extremófilos.....	4
3.2	Microorganismos termoacidófilos.....	4
3.3	Enzimas de microorganismos termoacidófilos.....	4
3.4	Enzimas lipolíticas de organismos termófilos y/o acidófilos.....	5
3.5	Técnicas para la determinación de actividad lipolítica.....	6
3.5.1	Ensayos en placa con sustratos lipídicos.....	6
3.5.2	Técnicas colorimétricas con sustratos derivados del p-nitrofenil ester.....	6
4	OBJETIVOS	7
4.1	Objetivo General.....	7
4.2	Objetivos específicos.....	7
5	MATERIALES Y MÉTODOS	7
5.1	Población de estudio y muestra.....	7
5.2	Medio de cultivo y condiciones de cultivo.....	8
5.3	Caracterización fenotípica.....	8
5.4	Determinación de condiciones óptimas de crecimiento.....	8
5.4.1	Determinación de temperatura óptima de crecimiento.....	8
5.4.2	Determinación de pH óptimo de crecimiento.....	8
5.5	Determinación de actividad lipolítica por medio de técnicas cualitativas.....	9
5.5.1	Evaluación por medio de halos de hidrólisis.....	9
5.5.2	Evaluación de crecimiento en diferentes sustratos lipídicos.....	9
5.6	Determinación cuantitativa de la Actividad lipolítica.....	9
5.7.1	Evaluación de la actividad lipolítica por medio de técnicas cuantitativas, método colorimétrico.....	10
5.7.1.1	Ensayos enzimáticos usando sustratos derivados del p-nitrofenil ester.....	10
5.8	Cromatografía de Gases.....	10
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	11
6.1	Características Generales de las cepas USBA-GBX-505 y USBA-GBX-499.....	11
6.2	Condiciones óptimas de crecimiento.....	12
6.2.1	Condiciones óptimas de crecimiento de la cepa USBA-GBX-505.....	12
6.2.2	Condiciones óptimas de crecimiento de la cepa USBA-GBX-499.....	13
6.3	Evaluación de crecimiento en diferentes sustratos lipídicos.....	14
6.4	Determinación de actividad lipolítica por medio de técnicas cualitativas.....	15
6.5	Evaluación de la actividad lipolítica por medio de técnicas cuantitativas.....	17
7	CONCLUSIONES	19
8	RECOMENDACIONES	20
9	BIBLIOGRAFÍA	20
10	ANEXOS	23

RESUMEN

El banco de cepas de la Unidad de Saneamiento y Biotecnología Ambiental (USBA), cuenta con microorganismos extremófilos aislados de manantiales termales del Parque Nacional Natural (PNN) Los Nevados. Se evaluó la actividad lipolítica de las cepas USBA-GBX-505, con similitud del 98% con *Acidocella facilis* y USBA-GBX-499 con similitud del 99% con la especie *Acidicaldus organivorans*. Se tuvieron en cuenta las condiciones óptimas de crecimiento de estas dos cepas, la cepa *Acidocella* USBA-GBX-505 presentó una temperatura óptima de 30°C y un pH óptimo de 3.5, mientras que en la cepa *Acidicaldus* USBA-GBX-499 se evidenció un pH y temperatura óptimos de 3.0 y 60°C, respectivamente. En estas condiciones óptimas se evaluó el crecimiento de las cepas en medio líquido con diferentes sustratos lipídicos: Gliceril tributirato, Ácido oléico, Etil oleato, Gliceril trioleato, Tween 80, Aceite de oliva y Aceite de palma. Además, se realizó una evaluación cualitativa a través de la detección de halos de hidrólisis en medio sólido con el sustrato lipídico. A partir de los resultados obtenidos, se escogió el Tween 80 para *Acidocella* USBA-GBX-505 y el Gliceril tributirato para *Acidicaldus* USBA-GBX-499 como sustratos para medir cuantitativamente la actividad lipolítica por medio de una fermentación discontinua con *p*-nitrofenil butirato, tomando muestras cada 12 horas por 5 días durante el crecimiento del microorganismo. La cepa *Acidocella* USBA-GBX-505 produjo en la fase estacionaria (entre las 36 y 48 horas) la mayor actividad lipolítica con valores entre 317.7 U/L y 315.3 U/L, mientras que la cepa *Acidicaldus* USBA-GBX-499 presentó su mayor actividad 675 U/L, después de un periodo de 48 horas de fermentación. Es importante resaltar que la actividad lipolítica cuantificada para las cepas USBA-GBX-505 y USBA-GBX-499 se presentó bajo condiciones cercanas a la neutralidad, característica similar reportada para otros organismos acidófilos y termoacidófilos como *Sulfolobus* sp.

1. INTRODUCCIÓN

Los ambientes extremos, son un gran reservorio de enzimas con alto potencial biotecnológico, las aplicaciones de los organismos que habitan en estos ambientes se destacan principalmente en el campo de la biocatálisis ya que sus enzimas pueden resistir diferentes condiciones en procesos industriales como estabilidad a altas y bajas temperaturas, a amplios rangos de pH y actividad en presencia de solventes orgánicos. Las enzimas provenientes de microorganismos extremófilos tienen además grandes ventajas frente a la catálisis química tradicional, ya que se puede obtener una gran variedad de productos químicos puros, menor liberación de residuos contaminantes, menor consumo de energía y mayor selectividad en las reacciones (1).

Se han realizado muchos estudios sobre las enzimas de microorganismos extremófilos, dentro de ellas se encuentran las pululanases, DNA polimerasas, ligasas, xilanasas, proteasas, celulasas y lipasas (2).

Las enzimas lipolíticas pueden ser producidas por diferentes tipos de microorganismos extremófilos, como los termoacidófilos que crecen a temperaturas superiores a los 55°C y pH inferiores a 4.0. Dentro del dominio Archaea se encuentra la gran mayoría de organismos termoacidófilos productores de enzimas lipolíticas, principalmente esterases. Los géneros más estudiados son *Archaeoglobus*, *Sulfolobus* y *Picrophilus*. En el año 2009 se caracterizó la primera lipasa proveniente de termoacidófilos, de la especie *Archaeoglobus fulgidus* (3). Por el contrario dentro del dominio Bacteria sólo han sido identificados dos organismos termoacidófilos productores de esterases perteneciente a los géneros *Alicyclobacillus* y *Acidothermus* (4).

A partir de investigaciones realizadas en la Unidad de Saneamiento y Biotecnología Ambiental (USBA), bajo el marco del proyecto GeBiX, que tiene como objetivo explorar, aprovechar y valorar, la diversidad microbiana en ecosistemas extremos, se aisló un microorganismo acidófilo, la cepa USBA-GBX-505, que en estudios previos utilizando el análisis de la secuencia del gen 16S rRNA fue identificada como *Acidocella* sp y otro termoacidófilo, la cepa USBA-GBX-499, identificada como *Acidicaldus organivorans* de los manantiales termales El Coquito (A4) y Termales 1 (A1) respectivamente, localizados en el PNN Los Nevados.

El objetivo de este trabajo fue determinar tanto cualitativa como cuantitativamente la actividad lipolítica de *Acidocella* USBA-GBX-505 y *Acidicaldus* USBA-GBX-499, creciendo

en sus condiciones óptimas de temperatura y pH, en presencia de un sustrato lipídico como única fuente de carbono.

2. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente, el bajo porcentaje de microorganismos aislados y cultivados representan una pequeña parte (cerca del 1%) de los existentes en los diferentes ecosistemas de la Tierra. Se estima que aproximadamente un 15% de estos organismos han sido estudiados para generar diferentes aplicaciones biotecnológicas (5).

Debido a la capacidad que tienen algunos organismos de vivir en ambientes extremos, se ha aumentado el interés por estudiar sus metabolitos, y también sus enzimas. Debido a la alta aplicabilidad que tienen enzimas como las proteasas y las amilasas, estas ocupan los primeros lugares en producción y ventas a nivel comercial, seguidas de estas están las lipasas microbianas que constituyen un grupo de enzimas con aplicaciones biotecnológicas porque presentan propiedades como estereoespecificidad, regioselectividad, enantioselectividad y alta estabilidad frente a solventes orgánicos; estas características permiten por ejemplo la síntesis de enantiómeros puros, lo cual es de gran interés para sectores como el farmacéutico y química fina (6).

Actualmente, los estudios de enzimas lipolíticas se han centrado en microorganismos que son fácilmente manipulables como los que pertenecen al género *Pseudomonas*, sin embargo, en la búsqueda de extremozimas, muy poco se conoce sobre enzimas lipolíticas producidas a partir de microorganismos acidófilos y termoacidófilos que puedan resistir altas temperaturas y/o bajos pH. Por lo tanto, es de interés evaluar la actividad enzimática de microorganismos que crecen bajo estas condiciones.

El banco de cepas de la USBA, cuenta con dos microorganismos extremófilos *Acidocella* USBA-GBX-505 bacteria acidófila y *Acidicaldus* USBA-GBX-499 bacteria termoacidófila, que fueron aisladas del PNN Los Nevados, a partir de sustratos lipídicos como única fuente de carbono. En este estudio se evaluará si estos organismos presentan actividad lipolítica lo que permitiría identificar cepas termoacidofilas cuyas enzimas lipolíticas podrán ser caracterizadas en profundidad en futuros estudios.

3. MARCO TEÓRICO / REFERENTES CONCEPTUALES

3.1 Microorganismos extremófilos

Los microorganismos que crecen en condiciones ambientales adversas y extremas, son conocidos como extremófilos. Las condiciones en las cuales se pueden encontrar son: presión (mayor a 100 atmósferas), salinidad (mayor de 1.0 M NaCl), altas concentraciones de metales pesados, altos niveles de exposición a radiación, temperatura (mayor a 50°C y menor a 10°C), pH (mayor a 8.0 y menor a 5.0), entre otros (7).

3.2 Microorganismos termoacidófilos

Son microorganismos que poseen la capacidad de vivir y multiplicarse bajo condiciones extremas de altas temperaturas (entre 50°C y 92°C) y a pH ácidos entre 0 y 4. Sin embargo, aquellos que presentan mayor resistencia a altas temperaturas, no son necesariamente aquellos que toleran niveles más ácidos de pH (8, 9).

Archaea es el dominio que cuenta con más microorganismos termoacidófilos descritos, se encuentran géneros como: *Picrophilus*, *Thermoplasma*, *Ferroplasma*, *Sulfolobus* y *Acidianus* (8). Algunos representantes dentro del dominio Bacteria son *Alicyclobacillus*, *Acidithiobacillus*, *Acidimicrobium*, entre otros (10). Estos microorganismos han sido aislados de hábitats como termales, solfataras, fumarolas, sedimentos hidrotermales, etc. que son ambientes cuyas características físico químicas pueden permitir el crecimiento de estos organismos.

3.3 Enzimas de microorganismos termoacidófilos

La biocatálisis microbiana, especialmente la de los microorganismos extremófilos puede ser superior a la catálisis tradicional llevada a cabo en condiciones normales, debido a que sus enzimas pueden actuar en condiciones adversas, bajo las cuales, proteínas convencionales, serían completamente denaturalizadas. Las enzimas de microorganismos extremófilos tienen características especiales como estabilidad, especificidad, selectividad y eficiencia, factores que las hacen atractivas industrialmente (2).

Existen muchas ventajas al utilizar enzimas que sean activas a altas temperaturas, ya que en los procesos industriales llevados a cabo bajo esta condición se incrementa la solubilidad de muchos sustratos poliméricos resultando en el decrecimiento de la viscosidad, incremento de la disponibilidad de sustrato, disminución en los tiempos de reacción, y disminución del riesgo de la contaminación microbiana (11).

Las enzimas lipolíticas han sido reportadas en varios microorganismos termoacidófilos incluyendo miembros del orden Thermoplasmatales y Sulfolobales (12) y bacterias como

Alicyclobacillus acidocaldarius (13) y son de interés debido a que minimizan las emisiones de contaminantes industriales, reducen el consumo de energía y simultáneamente mejoran la calidad y la pureza de los productos (1).

3.4 Enzimas lipolíticas de organismos termófilos y/o acidófilos

Las enzimas lipolíticas se han identificado en todos los dominios de la vida (Bacteria, Archaea y Eucaria). Estas catalizan la hidrólisis de enlaces éster, generando un alcohol, y un ácido carboxílico. Estas enzimas pertenecen a la familia α/β -hidrolasa siendo las dos más importantes las lipasas verdaderas y las esterases (3). Las lipasas verdaderas, presentan una preferencia por sustratos con más de 10 átomos de carbono y mayor actividad frente a un estado insoluble de su sustrato y son activadas cuando son absorbidas en una interfase lípido-agua. Esto se debe a que poseen residuos no polares cerca de su superficie, incrustados alrededor de su sitio activo, el cual está cubierto por una estructura *lid*, característica que las hace diferenciarse especialmente de las esterases. Por otro lado, las esterases, presentan una preferencia por sustratos con menos de 10 átomos de carbono y muestran su mayor actividad frente al estado soluble de su sustrato (14).

Dentro de las características fundamentales de las lipasas microbianas, se incluyen el no requerimiento de cofactores, estabilidad a solventes orgánicos, amplia especificidad de sustrato, enantio, estereo y regioselectividad, que permiten la síntesis de enantiómeros puros, entre otros. Además de la hidrólisis, las lipasas pueden llevar a cabo reacciones reversas como esterificación, alcoholisis y acidólisis (15).

Las lipasas pueden ser activas a diferentes pH, ácidos, neutros y alcalinos, actuando la gran mayoría a pH neutro. Existen microorganismos extremófilos como los termoacidófilos los cuales pueden producir enzimas termoestables, que actúan en amplios rangos de pH (16, 17).

Sin embargo, actualmente muy poco se conoce sobre enzimas lipolíticas que puedan resistir amplios niveles de temperatura y pH, algunas de ellas han sido evaluadas a partir de organismos extremófilos especialmente de los termófilos e hipertermófilos, no obstante se han identificado enzimas lipolíticas de organismos termoacidófilos. Algunos de sus representantes como *Sulfolobus tokodaii* tienen la capacidad de producir enzimas lipolíticas tipo esterasa que actúan en un rango de pH entre 3 a 9, presentando la mayor actividad a pH alcalino (8.0) y un rango de temperaturas entre 35 a 75°C, siendo el óptimo a 70°C (18).

3.5 Técnicas para determinación de actividad lipolítica

La medición de la actividad lipolítica ha tenido gran dificultad, ya que la mayoría de las enzimas lipolíticas son solubles en agua y actúan sobre sustratos insolubles en ésta, lo cual ha llevado a desarrollar una amplia gama de métodos para determinar su actividad. Estos métodos pueden medir la cantidad de sustrato consumido, la cantidad de ácidos grasos generados ó la producción de halos de hidrólisis del sustrato evaluado. Entre estos se encuentran ensayos en placa con sustratos lipídicos, titulación, nefelometría, conductividad eléctrica, métodos colorimétricos y espectrofotométricos con sustratos derivados del *p*-nitrofenil éster, espectrofotometría de masa, cromatografía líquida de alta eficiencia, cromatografía de gases, métodos inmunológicos, entre otros (19, 20).

3.5.1 Ensayos en placa con sustratos lipídicos

La lipólisis es observada directamente por cambios en la apariencia de sustratos como gliceril tributirato y gliceril trioleato los cuales son añadidos al medio de cultivo. La producción de la enzima se evidencia por la formación de halos alrededor de las colonias. Los colorantes fluorescentes como la Rodamina B, pueden ser usados en el medio que contiene el sustrato emulsificado para detectar microorganismos lipolíticos. La hidrólisis del sustrato genera la formación de halos naranjas ó rosados fluorescentes alrededor de las colonias que son visibles bajo irradiación U.V (21).

3.5.2 Técnicas colorimétricas con sustratos derivados del *p*-nitrofenil éster

La actividad de las lipasas y las esterases sobre sustratos lipídicos puede ser estimada empleando ensayos con sustratos derivados del *p*-nitrofenil éster. El fundamento de esta técnica es la estimación colorimétrica del *p*-nitrofenol liberado como resultado de la hidrólisis enzimática del enlace éster que une el *p*-nitrofenol y el ácido graso (15). La aparición de la coloración amarilla por el *p*-nitrofenol puede ser monitoreada, leyendo a una absorbancia de 410 nm. La actividad enzimática es expresada en μmol de *p*-nitrofenol liberado por minuto (19). Para esta técnica se pueden usar diferentes *p*-nitrofenil ésteres, ya sean de cadena larga ó corta. Algunos ésteres de cadena corta son el butirato y el acetato que son empleados para medir actividad esterasa, mientras que los ésteres de cadena larga como el ácido hexadecanoico (palmitato) y ácido 9-octadecenoico (ácido oléico) se emplean para medir la actividad de lipasas (22). La mayor ventaja de este ensayo con respecto a otros métodos de rutina, como la titulación, es la rapidez y la simplicidad con la que se lleva a cabo. Sin embargo en algunas ocasiones, una solución turbia es obtenida en el proceso, la cual interfiere con la medida espectrofotométrica. Este

problema puede aliviarse añadiendo surfactantes como el Tritón X-100 para obtener una solución clara (15).

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General:

- Evaluar la actividad lipolítica de dos cepas, una termoacidófila y otra acidófila, aisladas de manantiales termales del PNN los Nevados del banco de microorganismos de la Unidad de Saneamiento y Biotecnología Ambiental.

4.2 Objetivos específicos:

- Determinar las condiciones óptimas de temperatura y pH para el crecimiento, de las cepas USBA-GBX-505 y USBA-GBX-499.
- Evaluar cualitativa y cuantitativamente la actividad lipolítica de las cepas USBA-GBX-505 y USBA-GBX-499.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo fue llevado a cabo en la Unidad de Saneamiento y Biotecnología Ambiental (USBA), hace parte del estudio del Centro de Excelencia de Genómica y Bioinformática en Ambientes Extremos (GeBiX).

Las cepas fueron tomadas del banco de microorganismos de la USBA, conservadas en glicerol al 20% a -80°C . Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Para cada evaluación se hicieron dos subcultivos consecutivos (subcultivo 1 (s1) y subcultivo 2 (s2)), del s2 se partió para la realización de los ensayos. Como control positivo se empleó *Pseudomonas aeruginosa* obtenida del cepario de USBA.

5.1 Población de estudio y muestra

Las cepas *Acidocella* USBA-GBX-505 y *Acidicaldus* USBA-GBX-499 fueron seleccionadas para determinar su actividad lipolítica, debido a que estas cepas tuvieron la capacidad de crecer sobre sustratos lipídicos como única fuente de carbono, por otro lado al ser organismos aislados de ambientes extremos hacen que sean de interés de investigación para los objetivos de GeBiX. Estas cepas fueron aisladas de manantiales termales del PNN Los Nevados; la cepa USBA-GBX-505 fue aislada del termal el Coquito (A4) que tiene pH de 2.7 y una temperatura de 29°C , y USBA-GBX-499 del manantial Termal 1 (A1) que presenta un pH de 2.0 y una temperatura de 57°C .

5.2 Medio de cultivo y condiciones de cultivo

El medio de cultivo utilizado fue el medio 991(23) (anexo 1) a pH a 3.0, las fuentes de carbono fueron sustratos lipídicos con ácidos grasos tanto de cadena larga como de cadena corta (concentración final de 10mM) (anexo 2) los cuales se adicionaron luego de esterilizar el medio. Los medios de cultivo fueron inoculados con 10%v/v del s2. La temperatura de incubación para USBA-GBX-505 fue de 35°C y para USBA-GBX-499 de 55°C.

5.3 Caracterización fenotípica

Las cepas USBA-GBX-505 y USBA-GBX-499 se caracterizaron fenotípicamente evaluando morfología, coloración de Gram, movilidad, catalasa, condición frente al oxígeno y características de sus colonias.

5.4 Determinación de condiciones óptimas de crecimiento

5.4.1 Determinación de la temperatura óptima de crecimiento

Para conocer la temperatura óptima de crecimiento de cada cepa se evaluaron temperaturas entre 20°C y 70°C, con rangos de 5°C. Se realizaron lecturas a 580nm por espectrofotometría cada 3 horas durante 48 horas. La absorbancia fue transformada a concentración (μg de biomasa seca/ml) por medio de la curva de peso seco realizada bajo la metodología descrita en el anexo 2. Después de transformados los datos, se obtuvieron las velocidades específicas de crecimiento μ específica (expresada en h^{-1}), esta corresponde a la pendiente de la recta: $\text{LN}(\text{DO}) = \mu \text{ específica} * \text{tiempo (horas)} + \text{intercepto}$ y el tiempo de duplicación expresado en horas: $\text{Td} = \text{LN}(2)/\mu \text{ específica}$. La temperatura óptima fue escogida teniendo en cuenta en qué punto se presentó una mayor μ específica y un menor tiempo de duplicación.

5.4.2 Determinación del pH óptimo de crecimiento

Para conocer el pH óptimo de crecimiento de los microorganismos se evaluó la biomasa a diferentes valores de pH de 1.0 a 8.0 con rangos de 0.5. Se realizaron lecturas a 580 nm por espectrofotometría cada 3 horas durante 48 horas. La absorbancia fue transformada a concentración de μg de biomasa seca/ml por medio de la curva de peso seco realizada bajo la metodología descrita en el anexo 2. Después de transformados los datos, se obtuvieron las velocidades específicas de crecimiento μ específica (expresada en h^{-1}), esta corresponde a la pendiente de la recta: $\text{LN}(\mu\text{g de biomasa seca/ml}) = \mu \text{ específica} * \text{tiempo (horas)} + \text{intercepto}$ y el tiempo de duplicación expresado en horas: $\text{Td} = \text{LN}(2)/\mu$

específica. El pH óptimo fue escogido teniendo en cuenta en qué punto se presentó una mayor μ específica y un menor tiempo de duplicación.

5.5 Determinación de actividad lipolítica por medio de técnicas cualitativas

5.5.1 Evaluación por medio de halos de hidrólisis

Para la evaluación cualitativa de la actividad lipolítica de las cepas USBA-GBX 505 y USBA-GBX 499 se tomó como base el medio de cultivo 991 sólido (preparado adicionando phytigel a una concentración de 25 g/L) suplementado con gliceril tributirato, Tween 80, etil oleato, ácido oléico ó aceite de palma al 1%, Triton X-100 al 0.1% v/v y CaCl_2 al 0,01% p/v. Después de esterilizar el medio de cultivo se llevó a sonicar por 15 minutos para lograr que el sustrato se homogenizara en el medio.

Para la evaluación se siguieron tres métodos de siembra; a partir de cultivo fresco en fase exponencial se sembró en cada medio por agotamiento, siembra en superficie, y siembra de 10 μ l del cultivo en dos discos puestos en el medio. La actividad lipolítica fue detectada por medio de halos de hidrólisis visibles alrededor de cada colonia, ó de cada disco.

El halo de hidrólisis fue medido como, el diámetro de la colonia más el halo de hidrólisis menos el diámetro de la colonia (24).

5.5.2 Evaluación de crecimiento en diferentes sustratos lipídicos

Se evaluaron los siguientes sustratos lipídicos: gliceril tributirato, ácido oléico, etil oleato, gliceril trioleato, Tween 80, aceite de oliva y aceite de palma (anexo 3). El crecimiento de las cepas en cada sustrato se verificó por microscopía, usando como control negativo, el medio 991 con el sustrato sin inocular.

A partir de esta evaluación cualitativa se escogió el sustrato lipídico para determinar cuantitativamente la actividad lipolítica de cada cepa.

5.6 Determinación cuantitativa de la actividad lipolítica

Se realizó una fermentación discontinua bajo las condiciones óptimas de crecimiento de las cepas utilizando el sustrato lipídico gliceril tributirato para USBA-GBX-499 y Tween 80 para USBA-GBX-505. La cepa USBA-GBX-505 fue mantenida en agitación a 120 r.p.m, durante toda la cinética. Se tomaron muestras a las horas 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96 y 108, para realizar la evaluación de la actividad lipolítica a partir de los extractos crudos (anexo 4) y también evaluar el crecimiento por recuento en placa.

Para el recuento en placa se tomaron muestras del cultivo realizando diluciones de 10^{-1} a 10^{-5} . Las últimas tres diluciones se sembraron en superficie en medio 991 suplementado

con glucosa 10mM y se llevó a incubar a condiciones óptimas de cada cepa durante 3 días. El crecimiento se midió a partir del recuento en UFC/ml y posteriormente estos datos fueron transformados a Log₁₀ UFC/ml.

5.7.1 Evaluación de la actividad lipolítica por medio de técnicas cuantitativas, método colorimétrico:

5.7.1.1 Ensayos enzimáticos usando sustratos derivados del *p*-nitrofenil éster

Se realizó la curva patrón del *p*-nitrofenol, en la cual se tomó el *p*-nitrofenol a diferentes concentraciones conocidas entre 25 μ M - 0,625 μ M y se le adicionó el buffer HEPES a una concentración final de 50mM pH 7.5, se midió la absorbancia por espectrofotometría y se tomó como blanco el buffer.

La actividad de la enzima fue medida espectrofotométricamente usando *p*-nitrofenil butirato y *p*-nitrofenil palmitato como sustratos. 200 μ l del extracto crudo de la enzima (anexo 4) fueron mezclados con 2.275 ml de buffer HEPES a 50 mM pH 7.5 ó buffer MES a 50mM pH 4.0. Esta mezcla, fue preincubada durante 10 minutos a una temperatura de 30°C (USBA-GBX-505 y USBA-GBX-499) y de 55°C (USBA-GBX-499). La reacción se empezó añadiendo 25 μ l de la solución stock del sustrato (50mM de *p*-nitrofenil éster disuelto en acetonitrilo). Esta se llevó a incubar durante 30 minutos en cada temperatura correspondiente. El incremento de la absorbancia a 410 nm fue leído frente a un blanco que no tenía la enzima. Todas las mediciones fueron calculadas por triplicado. Bajo estas condiciones se tomó como unidad de actividad enzimática (U) aquella cantidad de enzima que catalizó la formación de 1 μ mol de *p*-nitrofenol (*p*NP) por minuto. La actividad fue expresada en U/L.

Cuando se usó el *p*-nitrofenil palmitato como sustrato, 0.05 ml de Tritón X-100 (0.1%) fueron añadidos a 2.225 ml de Buffer HEPES 50 mM pH 7.5. La solución *stock* del sustrato fue sonicada durante 15 minutos, antes de dar inicio a la reacción.

Los controles utilizados fueron *Pseudomonas aureginosa*, el medio básico 991 y el medio 991 suplementado con el sustrato lipídico.

5.8 Cromatografía de Gases:

La determinación de ácido butírico producido en la fermentación discontinua de *Acidicaldus* USBA-GBX-499 en gliceril-tributirato se cuantificó por cromatografía de gases (CG). Para ello, se realizó la curva de calibración utilizando como estándar patrones de ácido butírico en diferentes concentraciones.

Se utilizó un cromatógrafo Shimadzu GC 2014 equipado con una columna RTtm 2560 de 100 m y 0,25 mm de diámetro, y 0,2 µm de diámetro interno, detector de ionización de llama (FID) y helio como gas transportador a una velocidad lineal de 14,4 cm/seg. El gradiente de temperatura trabajado fue de 180°C a 200°C a 1°C/min. La temperatura del inyector fue de 250°C y del detector fue de 220°C.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Características Generales de las cepas USBA-GBX-505 y USBA-GBX-499.

En este trabajo se caracterizaron dos cepas *Acidoceella* USBA-GBX-505 y *Acidicaldus* USBA-GBX-499, bacilos Gram negativos aerobios (Tabla 1).

Tabla 1. Características generales y morfología de las cepas USBA-GBX-505 y USBA-GBX-499.

Cepa	% similitud gen 16S rRNA.	Morfología	Gram	Colonias	Movilidad	Catalasa	Condición frente al Oxígeno	Sustratos de crecimiento
USBA-GBX-505	<i>Acidoceella facillis.</i> 98%	Bacilos solos ó formando cadenas (Figura 1).	Gram Negativo	Blancas, cremosas, pequeñas, redondeadas, uniformes.	Móvil	Positivo	Aerobio	-T.80 -Etil oleato -Ácido oléico -Glucosa -Xilosa -Peptona
USBA-GBX-499	<i>Acidicaldus organivorans</i> 99%	Bacilos solos, en parejas ó formanando cadenas, móviles (Figura 2).	Gram Negativo	Cafés, cremosas, pequeñas, redondeadas, de bordes regulares.	Móvil	Negativo	Aerobio	-Gliceril tributirato -Aceite de Palma -Glucosa -Etanol -Xilosa -Peptona

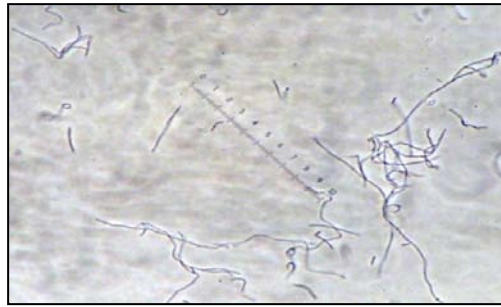


Figura 1. Fotografía de la cepa USBA-GBX-505 tomada a las 60 horas de cultivo, en medio 991 suplementado con Tween 80 1µl/ml.

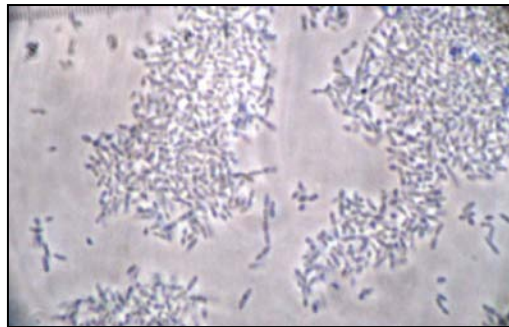


Figura 2. Fotografía de la cepa USBA-GBX-499 tomada a las 48 horas de cultivo, en medio 991 suplementado con tributirina 10mM.

El género *Acidocella* tiene 3 especies, *A. facilis*, *A. aluminidurans* y *A. amilolytica*, las cuales son bacilos Gram negativos aerobios, acidófilos obligados, mesófilos, no presentan esporas y pueden crecer quimiorganotróficamente a partir de sustratos como la glucosa, la xilosa y la arabinosa. Estas características son similares a las presentadas por la cepa USBA-GBX-505 que al igual que las especies de *Acidocella* no es capaz de utilizar ningún aceptor de electrones diferente al O₂ (25).

Por otro lado la cepa USBA-GBX-499, presenta características morfológicas y fisiológicas semejantes a *A. organivorans*, ambos son bacilos Gram negativos aerobios, acidófilos obligados, termófilos, no presentan esporas, son heterótrofos obligados que puede crecer en presencia de glucosa, xilosa, etanol, entre otros y son capaces de oxidar compuestos como el azufre elemental. Sin embargo, difieren en que la cepa USBA-GBX-499 no es capaz de crecer anaerobiamente en presencia de Hierro férrico como lo hace *A. organivorans* (26).

6.2 Condiciones óptimas de crecimiento

6.2.1 Condiciones óptimas de crecimiento de la cepa USBA-GBX-505

El crecimiento de la cepa USBA-GBX-505 se dio entre 25°C y 45°C (figura 3), siendo su temperatura óptima 30°C, con una velocidad específica de crecimiento de 0,13 h⁻¹ y un tiempo de duplicación de 5 h, y los resultados indican que esta es una bacteria mesófila. Su crecimiento además fue medido en medios de cultivo con diferentes valores de pH desde 1.0 hasta 7.0 con rangos de 0.5. Esta cepa creció dentro del intervalo de 2.5 a 5.0 (figura 3) siendo su pH óptimo 3.5.

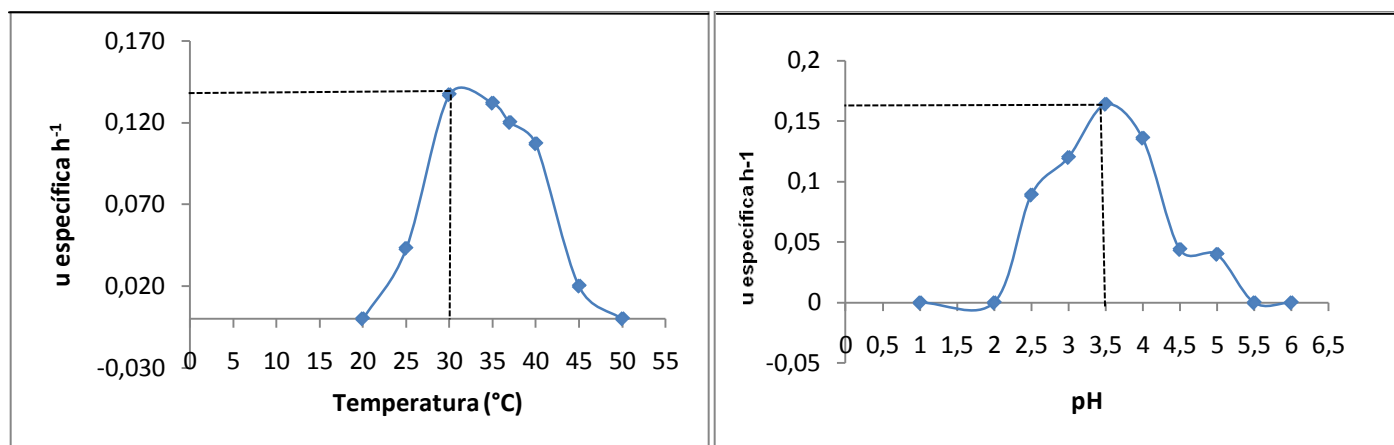


Figura 3. Determinación de la temperatura y el pH óptimo de crecimiento de *Acidocella* USBA-GBX-505.

Hiraishi y colaboradores (1995), reportan que el género *Acidocella* crece en un rango de pH entre 3.0 y 6.0, algunas cepas pueden crecer a pH 2.5, pero no hay crecimiento a pH \geq 6.1 (25). Valores similares fueron encontrados en este estudio (figura 3), en donde hubo crecimiento en el rango de pH de 2.5 a 5.0, con un óptimo de 3.5. Estos resultados indican y confirman que efectivamente esta cepa es un microorganismo acidófilo, pues es incapaz de crecer a pH superiores a 5.5.

6.2.2 Condiciones óptimas de crecimiento de la cepa USBA-GBX-499

La cepa USBA-GBX-499 crece en un rango de temperaturas entre 35°C y 70°C, siendo su temperatura óptima 60°C, con una velocidad específica de crecimiento de 0,13 h⁻¹ y un tiempo de duplicación de 5,2 horas (Figura 4)

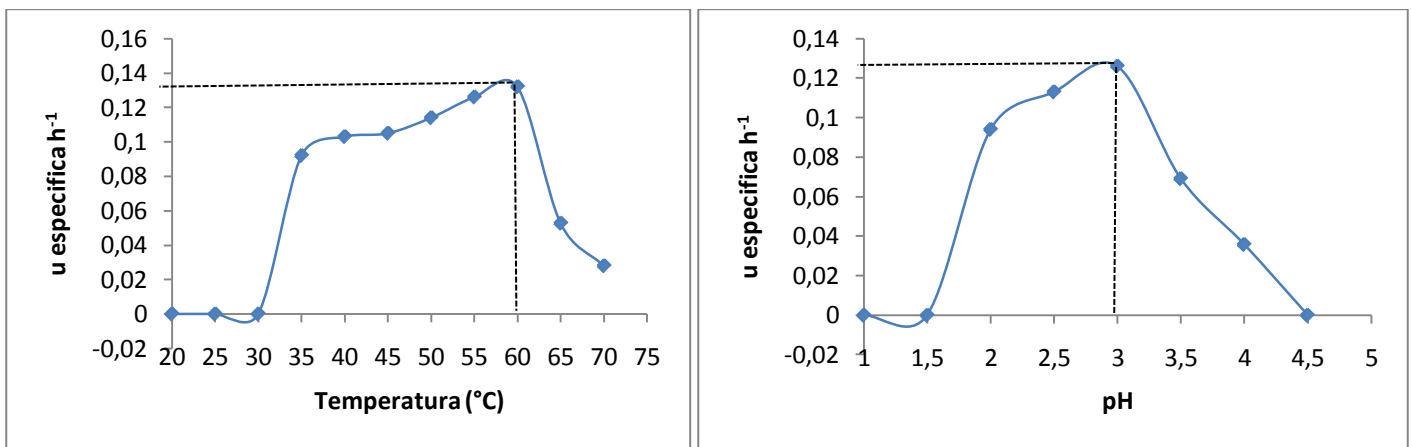


Figura 4. Determinación de la temperatura y el pH óptimo de crecimiento de *Acidicaldus* USBA-GBX-499.

La temperatura óptima de crecimiento encontrada en el estudio de Johnson *et al.* en el 2007 para la cepa *A. organivorans* estuvo entre 50°C y 55°C con un rango de crecimiento entre 40°C y 60°C (26). Esta es otra característica diferencial con USBA-GBX-499 ya que esta última puede crecer hasta 70°C y su temperatura óptima es 60°C indicando que esta cepa es un microorganismo termófilo, más no hipertermófilo porque es incapaz de crecer a temperaturas superiores de 70°C (26).

Acidicaldus USBA-GBX-499 presentó crecimiento dentro del intervalo de pH 2.0 a 4.0 (figura 4), siendo su pH óptimo 3.0, clasificándose como un acidófilo obligado, con una velocidad específica de crecimiento de 0,12 h⁻¹ y un tiempo de duplicación de 5,5 horas. Datos similares fueron encontrados en *A. organivorans* que puede crecer en pH desde 1.75 hasta 3.0, siendo su óptimo de 2.5 a 3.0 (26).

6.3 Evaluación de crecimiento en diferentes sustratos lipídicos

Se evaluó el crecimiento de las cepas USBA-GBX-505 y USBA-GBX-499, en diferentes sustratos lipídicos, a una concentración final de 10mM, los resultados de su crecimiento, se presentan en la tabla 2. Esta medición no pudo ser realizada espectrofotométricamente por aumento de turbidez, debido a que algunos sustratos lipídicos son opacos, generando interferencias en la lectura de las absorbancias.

Tabla 2. Evaluación de crecimiento en diferentes sustratos lipídicos de las cepas USBA-GBX-505 y USBA-GBX-499.

Sustrato	Crecimiento*	
	GBX-USBA-505	GBX-USBA-499
Gliceril tributirato	+	++++
Ácido oléico	+++	+++
Etil oleato	++++	+++
Gliceril trioleato	+	-
Tween 80	++++	-
Aceite de oliva	+	-
Aceite de palma	+++	++++

*Crecimiento evaluado frente a un control en donde sólo está creciendo la cepa a expensas del extracto de levadura (0.1g/L) del medio. Cada + indica cuánto más creció la cepa comparando con este control.

Teniendo en cuenta estos resultados, se puede observar que USBA-GBX-505, presenta preferencia por sustratos con ácidos grasos de cadena larga como el etil oleato (C18), el ácido oléico (C18) y el Tween 80 (monoéster del ácido oléico). Esto puede indicar que la enzima lipolítica que presenta esta bacteria es una lipasa, las cuales se caracterizan por preferir sustratos con más de 10 átomos de carbono (14).

Por otro lado la cepa USBA-GBX-499, presentó su mayor crecimiento usando el gliceril tributirato como única fuente de carbono (Tabla 2), este sustrato es un glicerol unido a 3 cadenas de ácido butírico (C4), por lo tanto, teniendo en cuenta que las esterases presentan preferencia por sustratos con menos de 10 átomos de carbono (14), es posible que esta bacteria posea una esterasa. No obstante, al observar crecimiento con sustratos que tienen ácidos grasos de cadena larga como aceite de palma y etil oleato, es posible que la enzima de este organismo actúe sobre una amplia gama de sustratos, como es reportado por Burcu y Metin (2006) para *Bacillus* sp 4, que presentó una esterasa capaz de hidrolizar sustratos con ácidos grasos de cadena larga como el Tween 80 (27).

6.4 Determinación de actividad lipolítica por medio de técnicas cualitativas

Se evaluó la actividad lipolítica a partir de pruebas cualitativas para evidenciar presencia de halos de hidrólisis, de los sustratos donde se observó mayor crecimiento (Tabla 2).

Los resultados obtenidos a partir de esta técnica cualitativa, permiten confirmar los datos observados en la prueba de sustratos lipídicos (tabla 2), indicando la preferencia de la

cepa USBA-GBX-505 por sustratos con cadenas largas de ácidos grasos. Kouker *et al.*(1987) reportan que la lipólisis puede ser observada directamente por cambios en la apariencia de sustratos lipídicos que son emulsificados en el medio de cultivo, en donde la actividad lipolítica es indicada por la formación de halos de hidrólisis alrededor de la colonia (28). *Acidocella* cepa USBA-GBX-505, presentó halos de hidrólisis de 5 mm en medio suplementado con etil oleato 1% (Tabla 3, Figura 5) y halos de 6 mm en medio con Tween 80. Esto indica que su enzima lipolítica, tiene la capacidad de cortar sustratos con ácidos grasos de cadenas de 18 carbonos.

Tabla 3.determinación de actividad lipolítica por medio de técnicas cualitativas para la cepa *Acidocella* USBA-GBX-505

Sustrato	USBA-GBX 505
	Halos de hidrólisis
Tween 80	Crecimiento y halo de hidrólisis de 6 mm
Etil Oleato	Crecimiento y halo de hidrólisis de 5 mm (Figura 5)





Figura 5. Halos de hidrólisis de la cepa *Acidocella* USBA-GBX-505 formados después de 6 días de crecimiento en medio 991 pH 3.5 suplementado con Etil oleato 1%, CaCl₂ 0.01% y rodamina B.

La cepa *Acidicaldus* USBA-GBX-499, aunque presentó buen crecimiento en algunos medios, en ninguno produjo halos de hidrólisis, es posible que la bacteria tome el sustrato lipídico como fuente de carbono, pero la actividad lipolítica en las condiciones en las que se realizó la prueba es muy baja ó no pudo ser detectada. Sin embargo, se puede considerar que el sustrato si es consumido porque en la prueba de crecimiento con sustratos lipídicos en medio líquido se observó crecimiento abundante (tablas 2 y 4) con

respecto al medio control que sólo contenía el extracto de levadura (0.1g/L). En ensayos preliminares realizados para esta cepa con *p*-nitrofenil butirato se observó actividad lipolítica en sustratos como aceite de palma (431 U/L), etil oleato y ácido oléico. Por lo tanto es importante verificar la actividad no solo por métodos cualitativos sino también cuantitativos.

Tabla 4. Crecimiento en sustratos lipídicos de las cepas USBA-GBX-505 y USBA-GBX-499

<i>Acidocella</i> USBA-GBX-505	<i>Acidicaldus</i> USBA-GBX-499
Sustrato: Tween 80	Sustrato: Gliceril tributirato
	

Aumento de turbidez, frente a un control de solo el medio más el sustrato (el control es el tubo que está primero en cada imagen)

6.5 Evaluación de la actividad lipolítica por medio de técnicas cuantitativas

Ensayos enzimáticos usando sustratos derivados de *p*-nitrofenil éster

La actividad de la enzima lipolítica de *Acidocella* USBA-GBX-505 fue evaluada durante una fermentación de 108 horas, utilizando medio base 991 a pH 3.5 suplementado con Tween 80 (1µl/ml) como sustrato lipídico. Como se puede observar en la figura 6, esta bacteria terminó su fase exponencial alrededor de la hora 24, y la enzima lipolítica alcanzó su mayor actividad entre las horas 36 y 48, con valores de actividad entre 317.7 U/L y 315.3 U/L respectivamente, durante la fase estacionaria y empezó a declinar a partir de la hora 60.

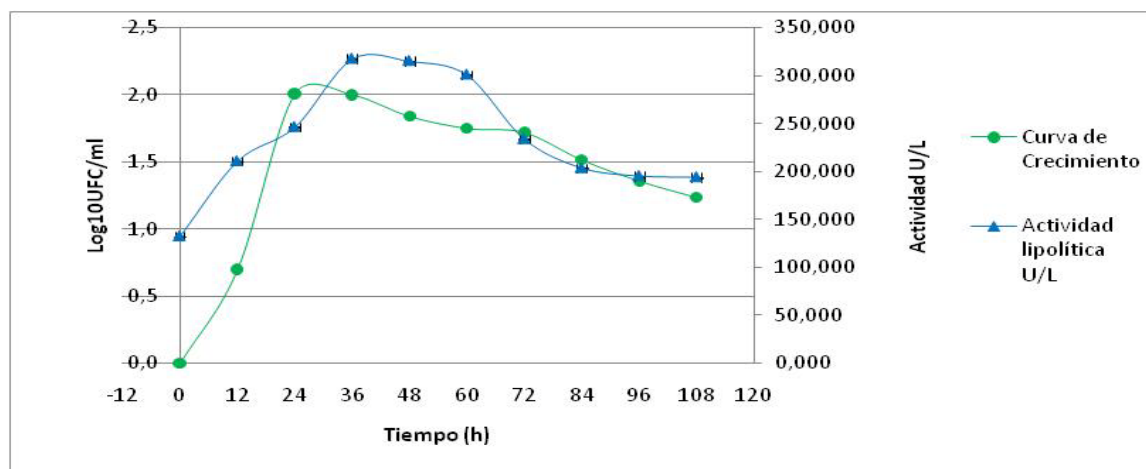


Figura 6. Curva de crecimiento y actividad lipolítica de *Acidocella* USBA-GBX-505 a 30°C pH 7.5, utilizando *p*-nitrofenil butirato como sustrato.

Al evaluar esta enzima en pH ácido (pH 4.0), no se detectó actividad por medio de la técnica colorimétrica usando *p*-nitrofenil butirato como sustrato. Sin embargo, un estudio realizado por Tatsuya *et al.* en el 2002 indica la presencia de una esterasa extracelular ácida en la cepa *Acidocella facilis* sp. AIU409, característica que diferencia esta enzima con la enzima de la cepa, ya que su actividad lipolítica solo pudo ser detectada en un pH cercano a la neutralidad (29). Por otro lado la actividad de la enzima fue evaluada también en dos temperaturas 30°C y 55°C, determinándose que a 55°C, la enzima lipolítica de *Acidocella* USBA-GBX-505 no presentó actividad.

La actividad de la esterasa de USBA-GBX-499, fue evaluada a lo largo de una fermentación de 108 horas, en medio base 991 a pH 3.0 suplementado con gliceril tributirato 10mM como sustrato lipídico. En la figura 7 se puede observar el comportamiento de esta bacteria que finalizó su fase exponencial a la hora 12 de crecimiento, y su enzima alcanzó su máxima actividad a la hora 48 con un valor de 675.6 U/L, es decir al final de fase estacionaria, su actividad empezó a bajar rápidamente a partir de la hora 60.

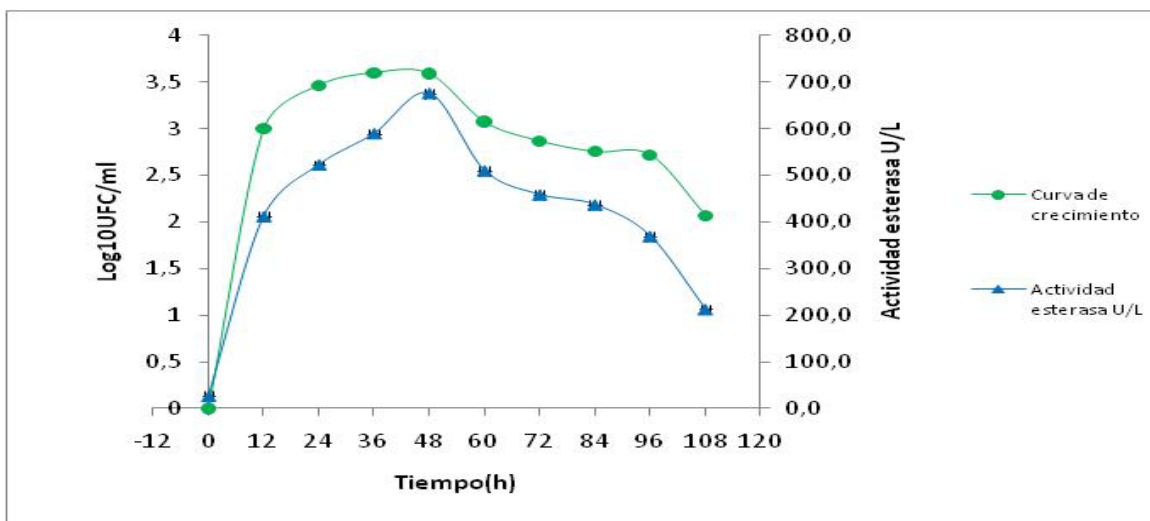


Figura 7. Curva de crecimiento y actividad esterasa de *Acidicaldus* USBA-GBX-499 a 55°C pH 7.5, utilizando *p*-nitrofenil butirato como sustrato.

La actividad esterasa de esta cepa fue evaluada por la técnica de *p*-nitrofenil butirato a pH ácido (4.0), pero no se obtuvo actividad bajo esta condición, mientras que al evaluarla en un pH cercano a la neutralidad, la actividad pudo ser detectada (figura 7). Esta característica es similar a la presentada en la gran mayoría de enzimas de termoacidófilos. La primera enzima lipolítica aislada y caracterizada de un microorganismo termoacidófilo fue una esterasa de la archaea *Sulfolobus acidocaldarius* (3). Gran parte de estas esterazas, presentan estabilidad y optimizan su actividad en temperaturas > 60 °C, pero aunque sean aisladas de microorganismos termoacidófilos, su mayor actividad se da a pH neutro ó básico (3). Además, para el caso de *Acidicaldus* USBA-GBX-499 se determinó que al evaluar su actividad a 30°C y 55°C, fue en la temperatura más alta, donde pudo ser cuantificada, mientras que a 30°C, su actividad no pudo ser detectada, indicando que esta es una enzima que actúa en temperaturas altas.

Hasta el momento no hay algún reporte sobre esterazas caracterizadas para *Acidicaldus organivorans*, sin embargo a partir del presente estudio se obtuvieron resultados de la actividad lipolítica de la cepa *Acidicaldus* USBA-GBX-499, que puede ser comparada con otras bacterias termófilas como *Thermus thermophilus*, esta bacteria en condiciones de agitación a 70°C, produce aproximadamente una actividad de 220U/L a las 72 horas de fermentación (30). La cepa USBA-GBX-499 produce 675 U/L a las 48 horas de fermentación, valor considerable comparado con el anterior estudio.

La actividad esterasa de esta bacteria en presencia de gliceril tributirato pudo confirmarse indirectamente por la producción de ácido butírico (metabolito derivado de la hidrólisis de este sustrato), el cual se detectó a la hora 48 de la fermentación discontinua (figura 8).

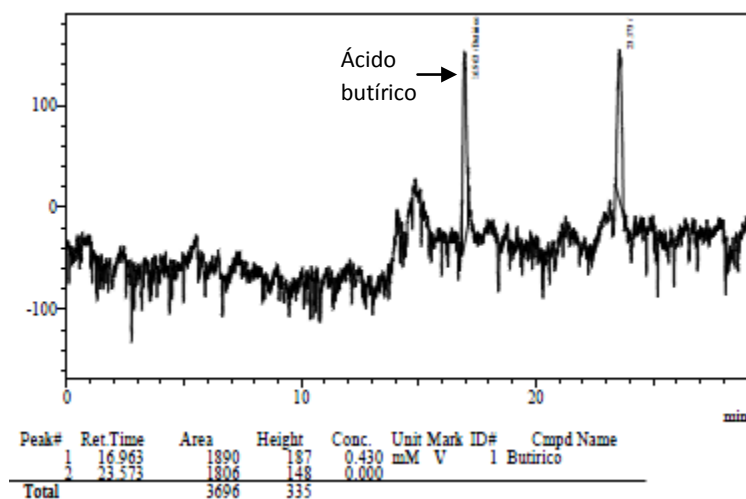


Figura 8. Detección de ácido butírico a las 48 horas de fermentación discontinua por cromatografía de gases.

Dentro del dominio bacteria, poco se conoce de enzimas lipolíticas de organismos termoacidófilos, estas solo han sido reportadas para *Alicyclobacillus acidocaldarius* y *Acidothermus cellulolyticus* (4). En *A. acidocaldarius*, a partir de un sistema de expresión heterólogo se ha caracterizado una esterasa que actúa a una temperatura de 60° y a un pH de 7.5 (31); mientras que para *A. cellulolyticus* han sido identificados 8 genes a partir de la secuenciación de su genoma que codifican para la producción de esterasas, las cuales aún no han sido caracterizadas (32).

Por lo tanto, continuar las investigaciones de las enzimas de estos microorganismos termoacidófilos contribuirá en el desarrollo de estudios relacionados con la biocatálisis de organismos extremos y sus aplicaciones.

7. CONCLUSIONES

7.1 La cepa *Acidocella* USBA-GBX-505, es un acidófilo obligado, ya que crece adecuadamente a un pH de 3.5. Se concluye también que es una bacteria mesófila con un rango óptimo de temperatura entre 30°C y 37°C.

7.2 La cepa *Acidicaldus* USBA-GBX-499, es una bacteria acidófila, teniendo en cuenta que crece en un rango de pH óptimo entre 2.0 y 4.0. Es además un organismo termófilo ya que crece adecuadamente a temperaturas superiores a los 50°C.

7.3 Se determinó que *Acidocella* USBA-GBX-505, presenta su mayor actividad lipolítica en su fase estacionaria, siendo esta de 317.7 U/L.

7.4 Se evidenció que esta cepa presenta preferencia por sustratos con ácidos grasos de cadena larga en su estructura.

7.4 Se estableció que la cepa *Acidicaldus* USBA-GBX-499 presentó actividad lipolítica de 675.6 U/L, sobre gliceril tributirato, y fue detectada en su fase estacionaria.

8. RECOMENDACIONES

8.1 Evaluar condiciones óptimas de crecimiento de los microorganismos para optimizar la producción de la enzima lipolítica (aeración, salinidad, relación C/N, entre otros).

8.2 Evaluar las condiciones óptimas de actividad (pH y T°) de las enzimas reportadas para las cepas USBA-GBX-505 y USBA-GBX-499.

8.3 Evaluar nuevos sustratos derivados del *p*-nitrofenil éster, y determinar la especificidad por sustrato de cada enzima.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Podar M, Reysenbach AL. New opportunities revealed by technological explorations of extremophiles. *Current Opinion Biotechnology*. 2006; 17:250-255.
2. Antranikian G, Vorgias C, Bertoldo C. Extreme environments as a resource for microorganisms and novel biocatalysts. *Advances in Biochemistry Engineering/Biotechnology*. 2005; 96: 219–262.
3. Levisson M, Van der Oost J, Servé, Kengen M. Carboxylic ester hydrolases from hyperthermophiles. *Extremophiles*. 2009; 13:567-581.
4. The lipase engineering database. University of Stuttgart. <http://www.led.uni-stuttgart.de/>. última actualización: Diciembre 2009. Consultado el 15 de Mayo de 2010.

5. Ravot G, Masson JM, Lefèvre F. Applications of extremophiles the industrial screening of extremophiles for valuable biomolecules. *Methods in microbiology*. 2006; Vol 35. Cap 34: 786-796.
6. Specialty and Industrial Enzymes: Market Analysis Of Biocatalysis. *MindBranch, Inc*. 2002; <http://www.healthcare-information.com/R154-344.html>. Consultado el 20 de Febrero de 2010.
7. Morozkina EV, Slutsкая ES, Fedorova TV, Tugay TI, Golubeva LI, Koroleva OV. Extremophilic microorganisms: Biochemical adaptation and biotechnological application. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2010; Vol. 46, No. 1: 5–20.
8. Angelov A, Liebl W. Insights into extreme thermoacidophily based on genome analysis of *Picrophilus torridus* and other thermoacidophilic archaea. *Journal of Biotechnology*. 2006; Vol. 126: 3-10.
9. Prokofeva M, Rusanov II, Pimenov NV, Bonch-Osmolovskaya EA. Organotrophic activity in Kamchatka hot springs with low pH. *Microbiology*. 2006; Vol 75: 237-239.
10. Kozubal M, Macur RE, Korf S, Taylor WP, Ackerman GG, Nagy A, Inskeep WP. Isolation and distribution of a novel iron-oxidizing Crenarchaeon from acidic geothermal springs in Yellowstone National Park. *Applied and environmental microbiology*. 2008; Vol 74: 942-949.
11. Gomes J, Steiner W. The Biocatalytic Potential of Extremophiles and Extremozymes. *Food Technology. Biotechnology*. 2004; 42: 223–235.
12. Hess M, Katzer M, Antranikian G. Extremely thermostable esterases from the thermoacidophilic euryarchaeon *Picrophilus torridus*. *Extremophiles*. 2008; Vol 12: 351-364.
13. Mandrich L, Manco G, Rossi M, Floris E, Jansen T, Smit G, Wouters JA. *Alicyclobacillus acidocaldarius* Thermophilic Esterase EST2's Activity in Milk and Cheese Models. *Applied and environmental microbiology*. 2006; Vol 72 5: 3191-3197.
14. Fojan P, Jonson PH, Maria TN, Petersen B, Steffen B. What distinguishes an esterase from a lipase: A novel structural approach. *Biochimie*. 2000; Vol. 82, 11: 1033-1041.
15. Gupta N, Rathi P, Gupta R. Simplified *para*-nitrophenyl palmitate assay for lipases and esterases *Analytical Biochemistry*. 2002; Vol. 311, 1: 98-99.
16. Liu CH, Chen WM, Chan JS. Methods for rapid screening and isolation of bacteria producing acidic lipase: feasibility studies and novel activity assay protocols. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2007; 23:633-640.
17. Illanes A. Stability of biocatalysts. *EJB Electronic Journal of Biotechnology*. 1999;2.
18. Suzuki Y, Miyamoto K, Ohta H. A novel thermostable esterase from the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus tokodaii* strain 7. *FEMS Microbiology Letters*. 2006; Vol 236 1: 97 – 102.
19. Hasan F, Ali A, Hameed A. Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. *Biotechnology Advances*. 2009; 27: 782-798.

20. Gilham D, Lehner R. Techniques to measure lipase and esterase activity in vitro. *Methods* 36. 2005; 139-147.
21. Kouker, Jaeger. *Applied and environmental microbiology*. 1987; 53: 211-213.
22. Farnet AM, Qasemian L, Goujard.L, Gil G, Guiral D, Ruaudel F, Ferre E. A modified method based on *p*-nitrophenol assay to quantify hydrolysis, *Soil & Biochemistry*. 2009; Vol 42: 386-389.
23. Itoh T, Suzuki K, Sanchez PC, Nakase T. *Caldisphaera lagunensis* gen. nov., sp. nov., a novel thermoacidophilic crenarchaeote isolated from a hot spring at Mt Maquiling, Philippines. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2003; 53: 1149–1154.
24. Pedroza A, Quevedo B, Matiz A. Manual de procesos biotecnológicos. Colombia, Ed. javeriana. 2007; 31-36.
25. Hiraishi A. *Acidocella*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 1995; Genus IV.
26. Barrie D, Stallwood B, Hallberg K. Isolation and characterization of *Acidicaldus organivorus*, gen. nov., sp. nov.: a novel sulfur-oxidizing, ferric iron-reducing thermo-acidophilic heterotrophic Proteobacterium. *Archives Microbiology*. 2006; 185: 212-221.
27. Burcu Z, Metin K. Production and partial characterization of a novel thermostable esterase from a thermophilic *Bacillus* sp. *Enzyme and Microbial Technology* 2006; 38: 628–635
28. Kouker G, Jaeger KE. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. *Applied Environmental Microbiology*. 1987; 53:211-3.
29. Tatsuya T, Noboru T, Takashi T, Chika M, Kimiyasu I, Norio W, Hidehiko T, Kenji. Cloning of the extracellular acid esterase gene from acidophilic bacterium, *Acidocella facilis*. *Scientific Reports of the Faculty of Agriculture, Okayama University*. 2002; Vol.91: 7-13.
30. Dominguez A, Fuciños P, Rua M, Pastrana L, Longo M, Sanromán A. Stimulation of novel thermostable extracellular lipolytic enzyme in cultures of *Thermus* sp. *Enzyme and Microbial Technology*. 2007; 40: 187-194.
31. Aganov D, Rabe K, Grote M, Huang Y, Spinzl M. The esterase from *Alicyclobacillus acidocaldarius* as a reporter enzyme and affinity tag for protein biosynthesis. *FEBS letters*. 2005; 579: 2082-2086.
32. Barabote R, Xie G, Leu D, Normand P, Necsuela A, Daubin V, Médigue C, Adney W, Xu X, Lapidus A, Parales R, Detter C, Pujic P, Bruce D, Lavire C, Challacombe J, Brettin T, Berry A. Complete genome of the cellulolytic thermophile *Acidotherrmus cellulolyticus* 11B provides insights into its ecophysiological and evolutionary adaptations. *Genome Research*. 2009; 19: 1033-1043.

Anexos:

Anexo 1. Medio 991 o *Caldisphaera lagunensis* (Itoh et al. 2003) modificado

COMPONENTE	g/L
(NH ₄) ₂ S ₀₄	1,3 g
KH ₂ PO ₄	0,28 g
Mg SO ₄ x 7 H ₂ O	0,25 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,07 g
FeSO ₄	0,02 g
Extracto de levadura	0,1 g
Solución elementos traza SL-10	10 ml
Agua desionizada	1000 ml

Anexo 2. Sustratos lipídicos evaluados.

Sustrato	Concentración inicial	Concentración final
Gliceril-trioleato	0.25M	10mM
Tributirina	0.25M	10mM
Etil oleato	0.25 M	10mM
Ácido oléico	0.25M	10mM
Ácido dodecanóico	0.25M	10mM
Ácido palmítico	0.25M	10mM
Ácido butírico	1M	10mM
Tween 80	No aplica	1µl/ml
Aceite de oliva	No aplica	1µl/ml

Anexo 3. Establecimiento de una curva de calibración para determinación de peso seco bacteriano.

1. Primer lavado

1.1 Centrifugar durante 10' a 4000 rpm a 4°C un volumen de medio de cultivo en fase exponencial de 1 o 1.5 l, lavándolo con agua fisiológica estéril 0.85%.

El objetivo de lavar las células es eliminar del medio de cultivo una gran cantidad de sales o YE que pueden falsear los resultados porque estos pueden quedar en el precipitado. Para poder dejar la suspensión homogénea se debe pasar por el vortex, no deben quedar agregados.

1.2 Una vez finalizada la centrifugación, descartar delicadamente el sobrenadante en un vaso de precipitados. Suspender el conjunto de precipitados (de los diferentes tubos de centrífuga) en 200 ml de agua fisiológica estéril 0.85%p/v con agitadores de vidrio.

1.3 Centrifugar de nuevo tomando las mismas precauciones anteriores durante 10' a 4°C y 7000 rpm.

2. Segundo lavado

2.1 Recuperar los precipitados y suspenderlos en 200 ml de H₂O miliq y centrifugar de nuevo en las mismas condiciones.

2.2 Después del segundo lavado, las células son puestas en suspensión homogénea en 100 ml de H₂O Δ y colocadas inmediatamente en hielo para evitar lisis bacteriana.

2.3 Dividir esta suspensión madre (SM) en dos fracciones alrededor de 50 ml cada una.

2.4 Seguir el esquema de peso seco

2.5 Tomar una de estas fracciones (1/100e), esta servirá para conocer la DO teórica de la SM:

3. Secado de células

De la otra fracción de SM, tomar 10 ml o 20 ml (réplicas) cuidando de homogenizar previamente. Luego disponerlas en cápsulas de porcelana previamente secadas al horno y pesadas. Llevar las dos cápsulas al horno a 105°C durante 4 horas, luego pesar estas cápsulas habiéndolas dejado enfriar previamente en campana de desecación. Volver a pesar cada media hora hasta que se obtenga peso constante.

4. Diluciones de la suspensión madre (SM)

Para determinar las diluciones es necesario conocer el valor teórico de la DO de la SM. Una vez se conoce la DO de la SM se realiza una primera dilución de esta fracción (1/x) , teniendo en cuenta que la DO teórica de esta dilución debe estar entre 1 Y 2. Esta nueva dilución que se denominará suspensión de trabajo (ST) será utilizada para hacer la serie de diluciones de 1/10 (en solución salina 0.85%) a las cuales se les medirá la DO₅₈₀.

Tabla 1. Diluciones de la Suspensión de trabajo (ST)

Dilución	1/10	2/10	3/10	4/10	5/10	6/10	7/10	8/10	9/10

ST	100	200	300	400	500	600	700	800	900
NaCl 0.85%	900	800	700	600	500	400	300	200	100
V _f	1000µl	1000µl	1000µl	1000µl	1000µl	1000µl	1000µl	1000µl	1000µl

4.2 Estas diluciones se preparan en tubos Eppendorf y se leen en el espectrofotómetro a 580 nm utilizando solución salina al 0.85% como blanco. Normalmente los valores más concentrados (diluciones 5/10 a 9/10) no ofrecen buenos resultados porque a estas [] se pierde la linealidad en la gráfica y por eso se hace un segundo conjunto de diluciones más finas

Tabla 2. Diluciones de la suspensión de trabajo más finas.

Dilución	1/25	1/20	3/20	5/20
ST	40	50	150	250
NaCl 0.85%	960	950	850	750
V _f	1000µl	1000µl	1000µl	1000µl

4.3 Una vez se tengan suficientes puntos se traza la curva diluciones vs DO 580 nm y se calcula la ecuación, en donde el valor importante es la pendiente.

4.4 Cuando se haya establecido el peso seco de las bacterias en las cápsulas, se calcula el peso seco de bact/ml de SM. Una vez calculado el peso seco para la ST, se calcula para cada dilución el peso seco correspondiente. Se convierten las diluciones en concentraciones: µg de bacterias peso seco/ ml

4.5 Se calcula el peso seco (µg/ml) vs DO₅₈₀ y de la ecuación de la recta se calcula la pendiente.

Anexo 4. Obtención del extracto crudo para enzimas extracelulares.

Se tomaron 2 ml de la cepa crecida con el sustrato lipídico y se centrifugaron por 10 minutos a 11.000 r.p.m. El sobrenadante (extracto crudo) obtenido fue filtrado (0.45µ) y se utilizó para realizar los ensayos (5).