

LIPASAS INDUCIDAS POR HIDROCARBUROS DEL PETRÓLEO

Elsa CERVANTES-GONZÁLEZ*, Liliana Marlen SALAZAR-QUINTANILLA y
Paola Elizabeth DIAZ-FLORES

Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Coordinación Académica Región Altiplano, Carretera a Cedral km 5+600, San José de las Trojes, 78700 Matehuala, San Luis Potosí, México

* Autora responsable: elsa.cervantes@uaslp.mx

(Recibido mayo 2011, aceptado mayo 2012)

Palabras clave: lipasas, queroseno, *Pseudomonas*

RESUMEN

La inducción de las lipasas se evaluó en tres bacterias hidrocarbonoclastas (*Stenotrophomonas* sp., *Bacillus* sp. y *Pseudomonas* sp.) mediante el uso de cinco diferentes grupos de hidrocarburos (alcanos, gasolina, diésel, queroseno y petróleo ligero). El monitoreo de las lipasas se llevó a cabo durante 21 días en cultivos líquidos, conteniendo 24 000 mg del hidrocarburo/L como única fuente de carbono y energía y el inóculo de la cepa específica. Los resultados mostraron que *Bacillus* sp. aunque presentó crecimiento en cuatro de los cinco tipos de hidrocarburos utilizados, en ningún caso expresó actividad de lipasa. En tanto, *Stenotrophomonas* sp. y *Pseudomonas* sp. expresaron su capacidad de lipasa en presencia de queroseno y petróleo y adicionalmente *Pseudomonas* en presencia de n-alcanos y diésel. La actividad expresada se presentó en diferente grado, es decir la actividad enzimática fue diferente dependiendo de la fuente de carbono (queroseno>diésel>petróleo>n-alcanos), la expresión de la enzima fue nula utilizando gasolina como fuente de carbono, debido a que las cepas no la degradaron ya que ninguna de ellas presentó crecimiento. La concentración de la fuente carbono también fue un factor más para la expresión de esta enzima, mostrando que *Pseudomonas* sp. presentó una mayor actividad de lipasa a 90 000 mg queroseno/L que a 10 000 mg queroseno/L.

Key words: lipases, kerosene, *Pseudomonas*

ABSTRACT

The induction of lipases was evaluated in three hydrocarbonoclastic bacteria (*Stenotrophomonas* sp., *Bacillus* sp. and *Pseudomonas* sp.) by means of five different groups of hydrocarbons (alkenes, gasoline, diesel, kerosene and light petroleum). The lipase monitoring was carried out during 21 days in liquid cultures, containing 24 000 mg of the hydrocarbon/L as the only source of carbon and energy. The results showed that *Bacillus* sp. presented growth in four of five types of hydrocarbons, but not expressed lipase. *Stenotrophomonas* sp. and *Pseudomonas* sp. expressed its capacity of lipase in presence of kerosene and petroleum, and additionally *Pseudomonas* sp. has lipase activity in presence of n-alkenes and diesel. The enzymatic activity was different depending on the carbon source (kerosene> diesel> petroleum> n-alkenes), the gasoline was not degraded by strains because any of them presented growth. The hydrocarbon

concentration was another factor for the expression of the enzyme, showing that *Pseudomonas* sp. presented a best lipase activity at 90 0000 mg kerosene/L that in the solution of 10 000 mg kerosene/L.

INTRODUCCIÓN

Los lípidos se definen como sustancias de origen biológico que son solubles en solventes orgánicos, pero que son insolubles o levemente solubles en agua. Por tanto, en ambientes acuosos tienden a asociarse mediante fuerzas no covalentes dando lugar a gotas oleosas en el caso de los lípidos hidrofóbicos, o dando lugar a monocapas, bicapas o micelas, en el caso de los lípidos anfipáticos. Los lípidos se clasifican de forma general en tres tipos: 1) simples, que son los que contienen uno o dos tipos de moléculas diferentes, 2) lípidos complejos, los que contienen glúcidos en su estructura, y 3) los que están formados por tres o más tipos de moléculas diferentes.

Estos compuestos pueden ser hidrolizados mediante soluciones alcalinas (saponificación), o mediante la actividad de las enzimas llamadas lipasas, las cuales catalizan la hidrólisis de cadenas largas de acilglicéridos ($\geq C_{10}$) (Verger 1997).

Las lipasas bacterianas han sido motivo de gran interés debido a su potencial biotecnológico, pues son activas en un amplio intervalo de sustratos en los que realizan diferentes reacciones de hidrólisis, de síntesis o de intercambio de grupos; numerosas veces de forma altamente quimio, regio o estereoespecífica. Así mismo, llevan a cabo reacciones laterales o generan subproductos, lo que las hace muy atractivas en las industrias agroquímica, farmacéutica, alimentaria y en la industria dedicada a la producción de detergentes. También han sido aisladas en la degradación de hidrocarburos del petróleo (Margesin *et al.* 2003), pero no se conocen los mecanismos involucrados a pesar de que los hidrocarburos están considerados como lípidos simples.

Las lipasas son éster hidrolasas carboxílicas que rompen los enlaces éster de los acilglicéridos mediante la adición de una molécula de agua, dando lugar a ácidos grasos libres y glicerol (Gupta *et al.* 2004). Su función biológica es incierta en muchos casos, aunque parece que están relacionadas con la bioconversión de lípidos entre diferentes organismos y dentro del mismo organismo, en relación con diferentes procesos como el aprovechamiento de fuentes de carbono y la modificación o el reciclaje de las membranas celulares (Schmid *et al.* 2001),

así como en la destoxificación de biocidas y agentes contaminantes (Margesin *et al.* 2003).

Las lipasas, se han estudiado ampliamente debido al interés biotecnológico, llevando a la clonación y caracterización de muchas de estas enzimas, así como al estudio de los mecanismos moleculares que controlan la expresión, el plegamiento y la secreción de las mismas enzimas (Rosenau y Jaeger 2000). Se conocen más 70 lipasas que han sido secuenciadas (Jaeger *et al.* 1999). Así también, se han elucidado ciertas estructuras, la mayoría de ellas pertenecientes a la familia de las α/β hidrolasas (Jaeger *et al.* 1999). Se ha reconocido que son enzimas altamente estables en un amplio rango de temperaturas, pH y solventes orgánicos. Las lipasas bacterianas son también estables frente a diferentes detergentes, iones (aunque algunos pueden activar o inhibir la actividad de estas enzimas) y agentes químicos y, en general, no requieren cofactores (Gupta *et al.* 2004).

Los hidrocarburos están clasificados dentro del grupo de los lípidos simples, por lo que teóricamente pueden ser hidrolizados por enzimas lipolíticas. Sin embargo, se cuenta con escasa información al respecto. Colette *et al.* (1978) son los primeros en relacionar a las lipasas con hidrocarburos del tipo alcanos, posteriormente Margesin *et al.* (1999) relacionan a las lipasas con los hidrocarburos del petróleo, publicando que la actividad de la lipasa evaluada en suelo puede ser utilizada como una herramienta indicadora de la biodegradación de hidrocarburos. Sin embargo, no queda claro si la expresión ocurre en toda la biota capaz de degradar hidrocarburos o si la expresión se verifica en la degradación de cualquier tipo de hidrocarburo. Incluso se ha evaluado la actividad enzimática en bacterias y levaduras extremófilas capaces de degradar alcanos y fenol, únicamente como biomarcador de la degradación (Margesin *et al.* 2003). Geraldine-Sandana *et al.* (2001) publican el incremento en la producción de lipasas de *Aspergillus niger* expresadas en medio con parafinas, diésel y queroseno debido a una mutación por radiación ultravioleta, pero no se destaca el papel de las lipasas en el proceso de degradación.

De tal manera, que es de sumo interés conocer el efecto de diversos tipos de hidrocarburos sobre la expresión de la enzima para determinar su función dentro los procesos de biorremediación de hidrocar-

buros. Por lo que el objetivo del presente trabajo fue evaluar la actividad de lipasa en tres bacterias hidrocarbonoclastas utilizando una mezcla de n-alcenos, diésel, queroseno, gasolina y petróleo como únicas fuentes de carbono.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sustrato y microorganismos

Los hidrocarburos (diésel, queroseno, gasolina y petróleo) utilizados como fuente de carbono fueron proporcionados por el Instituto Mexicano del Petróleo, la mezcla de n-alcenos (C_{10} - C_{28}) es un estándar UST rango diésel (Supelco). Las bacterias hidrocarbonoclastas (*Bacillus* sp., *Stenotrophomonas* sp. y *Pseudomonas* sp.) fueron previamente aisladas e identificadas (Cervantes *et al.* 2008). La cepa *Serratia marsecens* fue proporcionada por el Laboratorio de Enzimas Microbianas de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional y fue utilizada como testigo para confirmar que las cepas utilizadas fueran lipasa positivas.

Preparación del inóculo

El inóculo se preparó en matraces Erlenmeyer de 125 mL, utilizando 25 mL de medio mineral, (g/L): 1 KNO_3 , 0.02 $FeCl_3$, 0.2 $MgSO_4$, 0.1 $CaCl_2$ y 1 K_2HPO_4 , pH 6.8. Los hidrocarburos previamente esterilizados por tindalización se adicionaron al medio de cultivo a una concentración de 24 000 mg/L, Finalmente el medio de cultivo se inoculó con una asada del microorganismo a evaluar y los cultivos se incubaron a 28 °C y 180 rpm realizando un pase cada 24 h durante tres días, tomando 0.1 mL del cultivo y sembrándolo en medio fresco con el objetivo de contar con células jóvenes.

Efecto de la fuente de carbono en la expresión de lipasas

En matraces Erlenmeyer de 125 mL conteniendo 25 mL de medio mineral líquido, se adicionaron n-alcenos, diésel, queroseno, gasolina o petróleo a una concentración de 24 000 mg/L como única fuente de carbono y energía y fueron inoculados con 0.1 mL de cultivo fresco de *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp. o *Stenotrophomonas* sp. Los matraces se incubaron a 28 °C y 180 rpm, durante 21 días. En promedio cada cuatro días, dos matraces de cada experimento se retiraron para cuantificar la expresión de la enzima, evaluar el crecimiento de la bacteria mediante cuenta viable y realizar el análisis de hidrocarburos residuales utilizando cromatografía de gases acoplada

a un espectrómetro de masas. Para evaluar la pérdida abiótica, se incluyeron testigos sin inocular.

Evaluación de la actividad lipasa

La evaluación de lipasa se realizó de acuerdo con la técnica reportada por Margesin *et al.* (2002) con algunas modificaciones. Para la cuantificación de la enzima, 3 mL del medio de cultivo se centrifugaron en tubos de polipropileno a 8000 rpm, se tomó 1.0 mL de extracto libre de células y se colocó en un tubo de vidrio al que se le adicionó 1.0 mL de solución reguladora de pH conteniendo 100 mM $KH_2PO_4/NaOH$ a pH 7.2, el tubo se dejó en preincubación en un baño de agua durante 10 min a 37 °C. Posteriormente se adicionaron 20 μ L del sustrato [100 mM p-nitrofenol butirato (pNPB) diluido en 2-propanol y almacenado a -20 °C], el contenido se mezcló perfectamente y el tubo fue incubado en un baño de agua a 37 °C durante 15 minutos exactos. La reacción se detuvo introduciendo el tubo en un baño de hielo durante 10 min, posteriormente la liberación del p-nitrofenol (pNP) fue medido espectrofotométricamente a 400 nm. Cuando los valores de absorbancia fueron mayores a 1.8, la muestra fue diluida utilizando el regulador.

Para la preparación de la curva de calibración de pNP se utilizaron concentraciones de 0 (lanco), 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 y 50 μ g pNP/ mL, obtenidas a partir de una solución patrón de 50 μ g pNP/mL ajustando volúmenes con solución reguladora 100 mM $KH_2PO_4/NaOH$, pH 7.2. La actividad de lipasa fue expresada como μ g pNP/ mL cultivo durante 15 min.

Extracción y análisis de hidrocarburos residuales

La extracción de los hidrocarburos residuales del queroseno se realizó utilizando el total del medio de cultivo, mediante una extracción líquido-líquido con diclorometano. La fase orgánica se colectó y se evaporó a sequedad, el residuo obtenido se resuspendió en 5 mL de diclorometano (Burdick y Jackson) y 1 μ L se inyectó en un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas marca HP 6890/5973 utilizando una columna capilar HP-5 ms. Se utilizó helio como gas acarreador a un flujo de 0.9 mL/min. La temperatura del inyector fue de 280 °C, el horno se programó a 80 °C durante 1 min, 80-240 °C a 15 °C/min, 240-280 °C a 7 °C/min, y 3 min a 280 °C.

Efecto de la concentración de queroseno en la expresión de las lipasas de *Pseudomonas* sp.

Se prepararon matraces Erlenmeyer de 125 mL conteniendo 25 mL de medio mineral adicionados

de queroseno a diferentes concentraciones (10 000, 30 000, 50 000, 70 000 y 90 000 mg/L) e inoculados con 0.1 mL de un cultivo fresco de *Pseudomonas* sp., el cual fue preparado como se ya se mencionó. Los cultivos fueron incubados a 28 °C y 180 rpm durante 276 h, entre cada 12 y 24 h se retiraron dos matraces para evaluar la actividad enzimática (de lipasa) utilizando la técnica antes descrita.

RESULTADOS

La primera bacteria en la que se probó la capacidad de expresar lipasa fue *Bacillus* sp., que mostró ser lipolítica al utilizar mantequilla como sustrato (datos no mostrados), y aunque creció utilizando n-alcenos, diésel, queroseno y petróleo como únicas fuentes de carbono, no expresó la actividad de lipasa. Por otro lado, *Stenotrophomonas* sp., que también fue lipolítica al utilizar la mantequilla, no presentó capacidad para utilizar diésel o gasolina como fuente de carbono por lo que no creció en esos medios y por lo tanto tampoco indujo a la enzima. El grupo de n-alcenos permitió el crecimiento de *Stenotrophomonas* sp., pero el sustrato no indujo la expresión de la enzima. El queroseno y el petróleo fueron las únicas dos fuentes de carbono que indujeron la expresión de la enzima en esta bacteria. Los resultados se muestran en la **figura 1**, en donde puede verificarse el crecimiento de *Stenotrophomonas* sp. al utilizar estos dos hidrocarburos. La fase exponencial se presentó durante las primeras 36 h al utilizar ambas fuentes de carbono; en petróleo, el crecimiento se incrementó de 3.5×10^5 unidades (UFC formadoras de colonias)/mL a 1.5×10^9 UFC/mL, mientras que al utilizar queroseno, el crecimiento fue de 3.1×10^5 a 3.6×10^8 UFC/mL (**Fig. 1a**). La actividad de lipasa alcanzada durante este período fue de 2.6 y 4.5 $\mu\text{g pNP/mL} \times 15 \text{ min}$ para petróleo y queroseno, respectivamente (**Fig. 1b**).

Pseudomonas sp., creció en cuatro de los cinco hidrocarburos utilizados (queroseno, diésel, n-alcenos y petróleo) y además en los cuatro se expresó la lipasa. La **figura 2a**, muestra la cinética de crecimiento con las diferentes fuentes de carbono, en ella puede observarse que en todos los casos el crecimiento exponencial se presentó durante los primeros tres días de incubación y posteriormente la población comenzó a disminuir. El crecimiento no presentó diferencia significativa al utilizar queroseno, diésel y petróleo como fuentes de carbono. Sin embargo, el crecimiento con base en la utilización de alcenos se vio considerablemente disminuido.

La expresión de lipasa al utilizar las diferentes

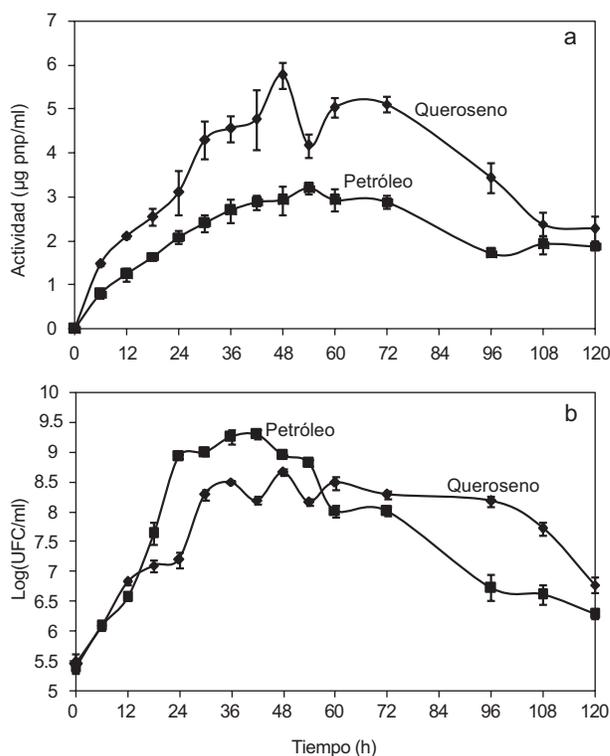


Fig. 1. Curvas de crecimiento y actividad de lipasa de *Stenotrophomonas* sp. cultivada en queroseno y petróleo a 24 000 mg/L, 28 °C y 180 rpm durante 120 h de incubación

fuentes de carbono se encuentra descrita en la **figura 2b**, allí se observa que la actividad enzimática dependió del tipo de hidrocarburo utilizado. La mayor actividad de lipasa se obtuvo al utilizar queroseno como fuente de carbono (60 $\mu\text{g pNP/mL}$ a los nueve días de incubación); en segundo lugar, se encontró la actividad expresada en el medio con diésel (19 $\mu\text{g pNP/mL}$ a los quince días de incubación); en tercer lugar, se encontró la expresión en el medio conteniendo petróleo (11 $\mu\text{g pNP/mL}$ a los tres días de incubación); y por último, la mezcla de n-alcenos provocó una actividad de 3.7 $\mu\text{g pNP/mL}$ a los nueve días de incubación.

El perfil cromatográfico del queroseno se muestra en la **figura 3**, en donde se observa su composición de hidrocarburos. La **figura 3a** corresponde al contenido de hidrocarburos tanto de bajo como de alto peso molecular presentes antes del tratamiento (C_{13} - C_{30}) y la **figura 3b** muestra los hidrocarburos residuales del queroseno, donde se observa la remoción de hidrocarburos de elevado peso molecular (C_{20} - C_{25}) así como de bajo peso molecular (C_{13} - C_{16}). Cabe mencionar que existió preferencia de degradación de algunos compuestos de mayor peso molecular. Al respecto, se obtuvo que el contenido residual de C_{18} (tiempo de retención 19.5 min) fue de 22.30%; en

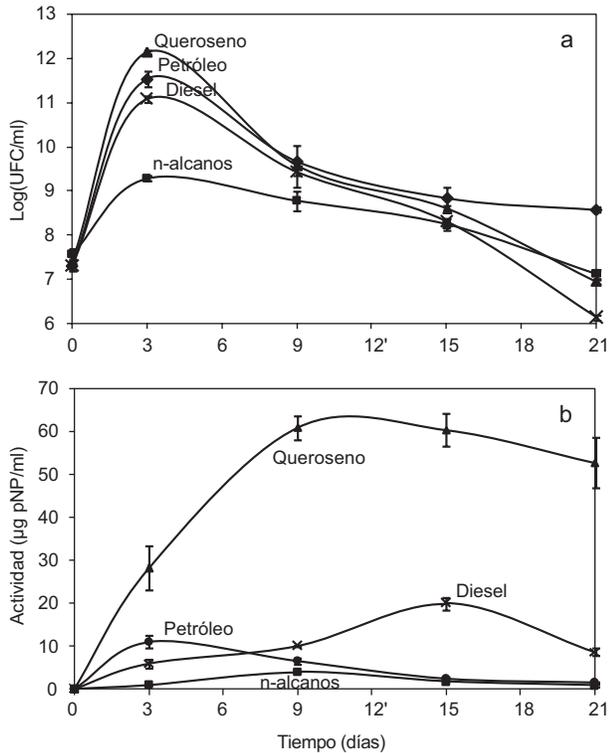


Fig. 2. Curvas de crecimiento y actividad de lipasa de *Pseudomonas* sp. cultivada en queroseno, diesel, n- alcanos y petróleo a 24 000 mg/L, 28 °C y 180 rpm durante 120 h de incubación

tanto para C₁₇ el porcentaje remanente fue un poco menos del 20%, mientras que los hidrocarburos con 19 átomos de carbono (tiempo de retención 20.6 min) se encontraron solamente en un 10% en el remanente.

El queroseno fue el mejor inductor de las lipasas de *Pseudomonas* sp., y se utilizó a diferentes concentraciones para evaluar su efecto sobre la enzima. En la **figura 4** se muestran los resultados, el análisis estadístico mostró que hubo diferencia significativa entre la expresión de la enzima y las diferentes concentraciones de queroseno utilizadas con excepción de las concentraciones de 70 000 y 90 000 µg pNP/mL.

DISCUSIÓN

Las lipasas son enzimas extracelulares inducibles, es decir que se expresan únicamente cuando el sustrato se encuentra presente y la célula las requiere para poder utilizar dicho sustrato. De tal forma que el caso de *Bacillus* sp. que creció en los medios conteniendo petróleo, diésel, queroseno y n- alcanos y no expresó actividad lipasa, indica que la bacteria tiene la maquinaria necesaria para utilizar estos hidrocarburos como fuente de carbono, pero no requiere a las lipasas para realizarlo. Lo mismo ocurrió con *Stenotrophomonas* sp. al utilizar la mezcla de n- alcanos. Sin embargo,

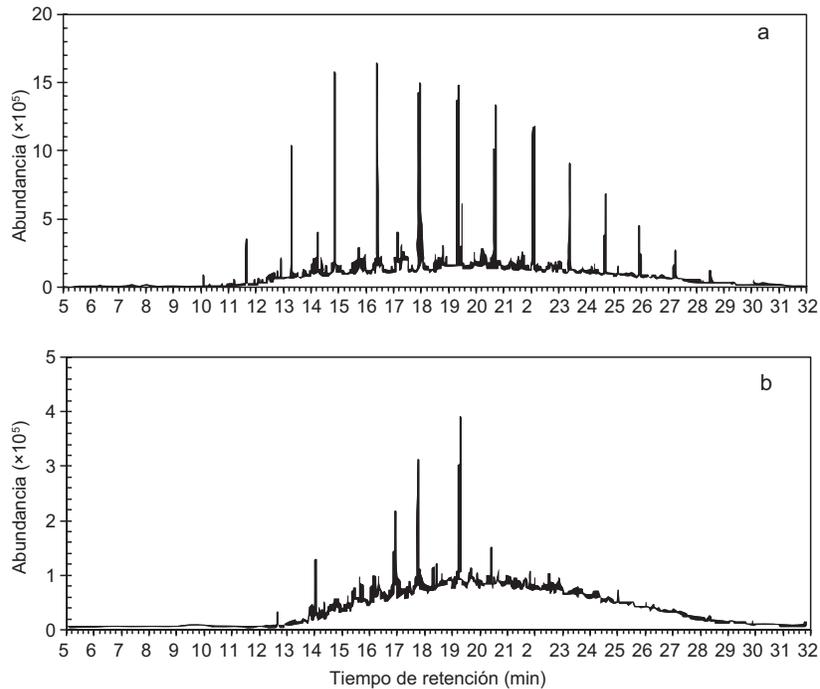


Fig. 3. Perfiles cromatográficos del queroseno utilizado como fuente de carbono por *Pseudomonas* sp. a 24 000 mg/L, 28 °C y 180 rpm. A) tiempo inicial. B) Después de 21 días de incubación

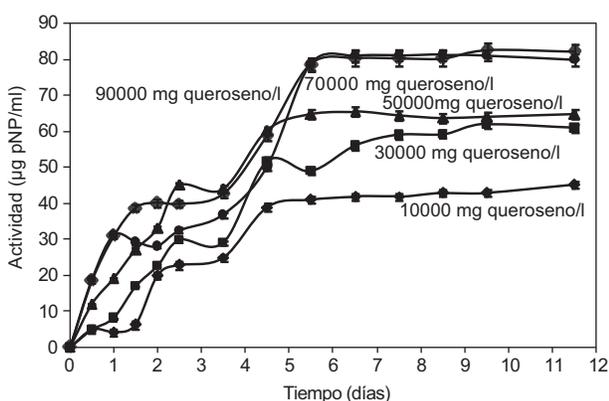


Fig. 4. Actividad de lipasa en *Pseudomonas* sp. cultivada a diferentes concentraciones de queroseno a 28 °C y 180 rpm durante 12 días de incubación

Stenotrophomonas sp. al contrario de *Bacillus* sp. sí expresó actividad de lipasa en presencia de queroseno y petróleo. Según los resultados la expresión de la enzima ocurre en el momento de la fase exponencial de crecimiento ($P=0.987$), lo que sugiere que la célula requiere a la enzima para hacer uso de la fuente de carbono y crecer. Margesin *et al.* (2007) mencionan que los productos liberados de la biodegradación de los hidrocarburos son los sustratos para enzimas del tipo hidrolasas, incluyendo esterases y lipasas y que por lo tanto la actividad de lipasa es una herramienta útil para monitorear la biodegradación de hidrocarburos del petróleo. Al respecto, en la presente investigación se observa que la enzima lipasa se expresa inmediatamente al comienzo de la degradación del sustrato, es decir la enzima participa sobre el sustrato intacto y no únicamente sobre metabolitos, pues de ser así la actividad enzimática tendría que comenzar desfasada con respecto a la degradación, es decir hasta que hubiese en el medio productos de degradación liberados. Por otro lado, no se puede hablar de que la lipasa sea la única herramienta para monitorear la biodegradación de hidrocarburos porque en los sistemas de degradación pueden existir microorganismos como *Bacillus* sp, que degrada hidrocarburos pero no expresa la enzima.

También el tipo de hidrocarburo utilizado está relacionado con la actividad de la enzima. La **figura 2b** muestra la actividad de lipasa de *Pseudomonas* sp. expresada con diferentes hidrocarburos, donde puede verse claramente que la magnitud de la actividad de la enzima se presentó en el siguiente orden: queroseno > diésel > petróleo > n-alcanos. En este caso, también se encontró que la expresión de la enzima con la mayor actividad se correlacionó directamente ($P \approx 0.98$) durante los primeros tres días de incubación con la fase exponencial de crecimiento de la bacteria

(**Fig. 2b**), lo que sugiere el uso de la enzima en la biodegradación de la fuente de carbono. Posteriormente, la actividad de la enzima se mantuvo presente hasta los 21 días, sugiriendo su actuación en la degradación del hidrocarburo y sobre los compuestos liberados, que, conjuntamente mantuvieron la fase estacionaria de las células.

De acuerdo con los resultados, las lipasas de *Pseudomonas* sp. se expresaron con una mayor actividad al utilizar queroseno, que es una fracción obtenida de la refinación del petróleo a una temperatura aproximada de 200 °C, constituida en un 99% por parafinas e isoparafinas de elevado peso molecular. Es precipitado sugerir que las lipasas de esta bacteria tengan afinidad por este tipo de compuestos ya que intervienen un sin número de enzimas adicionales. Sin embargo, su alta actividad expresa una gran correspondencia con este tipo de compuestos.

El diésel, que fue el hidrocarburo que soportó el crecimiento de *Pseudomonas* sp. con la segunda más alta actividad de lipasa, es una fracción que destila a los 300 °C y está constituida por compuestos aromáticos, parafinas y éteres. La siguiente fuente de carbono fue el petróleo ligero constituido por compuestos del tipo alifáticos y algunos aromáticos. La mezcla de n-alcanos, que soportó el crecimiento de la bacteria con la más baja actividad de lipasa está constituida por C_{10} a C_{28} . Como puede observarse la más alta actividad de la enzima se obtuvo con los compuestos de alto peso molecular y no lineales (queroseno). Además, en la **figura 3** se muestra que los compuestos degradados del propio queroseno fueron preferentemente los de mayor peso molecular (C_{19} - C_{27}).

La relación entre lipasas e hidrocarburos no está bien definida y la información es escasa, Bouke *et al.* (2007) reportaron el incremento de hasta 10 veces la actividad de lipasa de *Burkholderia glumae* cuando se tiene hexadecano en el medio de cultivo a una concentración del 10%. Sin embargo, no se conoce lo que ocurriría con otro tipo de hidrocarburo o bien con otra concentración.

También se tiene referencia de que la cepa *Pseudomonas pseudomallei* 12Sm es productora de lipasa durante su crecimiento en n-hexadecano como única fuente de carbono (Kanwar y Goswami 2002) o bien que la lipasa de la cepa S5 de *Pseudomonas* sp. es estable en solventes como n-hexano, ciclohexano, tolueno y 1-octanol (Baharum *et al.* 2003). Lo cual indica alguna relación entre lipasas e hidrocarburos.

El efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad de una enzima es uno de los parámetros importantes a evaluar debido a la posible inhibición

de la enzima. En esta investigación la actividad enzimática de *Pseudomonas* sp. tuvo una relación directa con la concentración del queroseno (**Fig.4**), mostrando diferencia significativa entre las concentraciones de 10 000, 30 000 y 50 000; no así entre 70 000 y 90 000 mg queroseno/L. Con ello se puede especular que esta enzima es bastante estable y por lo menos hasta una concentración de 90 000 mg queroseno/L no presenta efecto de inhibición por concentración de sustrato, lo cual hace que pueda utilizarse a altas concentraciones.

CONCLUSIONES

La inducción o no inducción de las lipasas dependió de la bacteria y del tipo de hidrocarburo utilizado, de tal manera que no es recomendable utilizar únicamente la actividad de lipasa como biomarcador de biodegradación de hidrocarburos porque puede llegarse a conclusiones erróneas. Además, se sugiere que la lipasa tiene una participación directa en la biodegradación de los hidrocarburos, la cual está siendo estudiada.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue realizado gracias al financiamiento del Fondo de Apoyo a la Investigación (C08-FAI-04-13.17) de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

REFERENCIAS

- Baharum S.N., Salleh A.B., Razak C.N.A., Basri M., Rahman M.B.A. y Rahman R.N.Z.R.A. (2003). Organic solvent tolerant lipase by *Pseudomonas* sp. Strain S5: stability of enzyme in organic solvent and physical factors affecting its production. *Ann. Microbiol.* 53, 75-83.
- Bouke K.H.L., Anke B., Breuer M., Hauer B., Koster M., Rosenau F., Jaeger K.E. y Tommassen J. (2007). Hexadecane and ten 80 stimulate lipase production in *Burkholderia glumae* by different mechanism. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 3838-3844.
- Cervantes-González E., Rojas-Avelizapa N.G., Cruz-Camarillo R., García-Mena J. y Rojas Avelizapa-L.I. (2008). Oil-removal enhancement in media with keratinous or chitinous wastes by hydrocarbon-degrading bacteria isolated from oil-polluted soils. *Environ. Technol.* 29, 171-182.
- Colette B., Shindler D.B., Sijher J.S. y Kushner D.J. (1978). Stimulation of lipase production during bacterial growth on alkanes. *J. Bacteriol.* 133, 601-606.
- Geraldine-Sandana J.M., Numbi R.K. y Rengarajulu P. (2001). Strain improvement of *Aspergillus niger* for enhanced lipase production. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 47, 181-186.
- Gupta R.N., Gupta y Rathi O. (2004). Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64, 763-781.
- Jaeger K.E., Dijkstra B.W. y Reetz M.T. (1999). Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annu. Rev. Microbiol.* 53, 315-351.
- Kanwar L. y Goswami P. (2002). Isolation of a *Pseudomonas* lipase produced in pure hydrocarbon substrate and its application in the synthesis of isoamyl acetate using membrane-immobilised lipase. *Enz. Microbiol. Technol.* 31, 727-735.
- Margesin R.A., Zimmerbauer y Schinner F. (1999). Soil lipase activity—a useful indicator of oil biodegradation. *Biotechnol. Tech.* 13, 859-863.
- Margesin R., Feller G., Hammerle M., Stegner U. y Schinner F. (2002). A colorimetric method for the determination of lipase activity in soil. *Biotechnol. Lett.* 24, 27-33.
- Margesin R., Labbe' D., Schinner F., Greer C. W. y Whyte L.G. (2003). Characterization of hydrocarbon-degrading microbial populations in contaminated and pristine alpine soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 3085-3092.
- Margesin R., Hammerle M. y Tscherko D. (2007). Microbial activity and community composition during bioremediation of diesel-oil-contaminated soil: effects of hydrocarbon concentration, fertilizers, and incubation time. *Microb. Ecol.* 53, 259-269.
- Rosenau F. y Jaeger K.E. (2000). Bacterial lipases from *Pseudomonas*: regulation of gene expression and mechanisms of secretion. *Biochimie.* 82, 1023-1032.
- Schmid A.J.S., Dordick B., Hauer A., Kiener M., Wubbolts y Witholt B. (2001). Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature* 409, 258-268.
- Verger R. (1997). Interfacial activation of lipases: facts and artifacts. *Trends Biotechnol.* 15, 32-38.