

## Caracterización de una actividad lipasa termoestable alcalina excretada por *Anoxybacillus* sp.

Angela Daniele<sup>1</sup>, María Tapizquent<sup>1</sup>, Oscar Valbuena<sup>2</sup>, Lellys M. Contreras<sup>2</sup>  
y Jeff Wilkesman<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Química, Apartado 3433. <sup>2</sup>Departamento de Biología, Apartado 3336. Facultad de Ciencias y Tecnología, Universidad de Carabobo. Valencia (2005), Venezuela.

Recibido: 12-06-10 Aceptado 22-03-10

### Resumen

Se analizó el efecto del pH, temperatura y surfactante sobre la actividad enzimática de una exo-lipasa producida por la bacteria *Anoxybacillus* sp. La cepa fue cultivada en medio mínimo salino complementado con aceite de oliva comercial 1% (v/v) a pH 6,5 y 55°C. Se detectó actividad lipasa-lecitinasa en placas de agar-yema de huevo. La actividad lipasa se determinó por titulación potenciométrica, variando el pH entre 6,5 y 11,0; la temperatura entre 40 y 65°C, y empleando distintos surfactantes (taurocolato de sodio, bilis bovina, SDS o Tween 80). Se cuantificó una actividad enzimática de 0,23  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$  en sobrenadantes libres de células, recolectados a 96 h de crecimiento. La actividad fue máxima a pH 10,5-11,0 y 55°C. La actividad enzimática no fue afectada después de un calentamiento a 55°C, pH 10,5 por 50 min. Se presentaron dos zonas en SDS-PAGE y zimografía, correspondientes a la actividad lipasa, con pesos moleculares de ~25 y ~50 kDa. Estos resultados sugieren que esta actividad lipasa pudiera ser incorporada en detergentes a escala industrial por su resistencia térmica y alcalina.

**Palabras clave:** termófilas, lipasas, surfactantes.

## Characterization of a thermostable alkaline lipase activity secreted by *Anoxybacillus* sp.

### Abstract

The effect of pH, temperature, and surfactants over an exo-lipase activity produced by *Anoxybacillus* sp. was analyzed. The strain was cultured in mineral medium supplemented with 1% (v/v) olive oil, pH 6.5 at 55°C. Lipase activity was visualized in hen egg yolk emulsion agar plates. Lipase activity was determined by potentiometric titration, varying pH between 6.5 and 11.0; temperature between 40 and 65°C; and employing different surfactants (sodium taurocholate, bovine bile, SDS or Tween-80). A mean enzymatic activity of 0.23  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$  was quantified in cell-free extracts recollected after 96 h growth. Maximal activity was reached at pH 10.5-11.0 and 55°C. Enzymatic activity was not affected after 50 min at 55°C and pH 10.5. Two areas, corresponding to the lipase activity, were detected in SDS-PAGE and zymography, with molecular weights of ~25 and ~50 kDa. These results suggest that this lipase activity might be incorporated in commercial detergents at industrial scale due to its thermal and alkaline resistance.

**Key words:** thermophiles, lipases, surfactants.

\* Autor para la correspondencia: jwilkesm@uc.edu.ve

## Introducción

Las industrias productoras de aceites y grasas generan residuos con un alto contenido graso, los cuales deben ser tratados antes de ser vertidos al ambiente. Una técnica empleada para esto es el biotratamiento de los efluentes. Los microorganismos termófilos son capaces de degradar fuentes lipídicas gracias a la excreción de lipasas (1, 2). Estas enzimas pertenecen al grupo de las hidrolasas y se encargan de hidrolizar los triglicéridos para dar ácidos grasos libres y glicerol. Las lipasas actúan tanto en medio acuosos como no acuosos y se encuentran básicamente en el citosol y asociadas a membranas (1, 2).

La síntesis y secreción de lipasas por bacterias depende de varios factores, incluyendo la presencia de iones, la fuente de carbono y tipos de polisacáridos no metabolizables presentes en el medio de cultivo. Las lipasas son altamente estereoselectivas, y catalizan reacciones de transesterificación e interesterificación (2). Este tipo de enzima posee un enorme potencial en las áreas de tecnología de alimentos, detergentes, en la industria química y petroquímica y en las ciencias biomédicas (1, 2).

El estudio de microorganismos termófilos capaces de crecer usando grasas y aceites ha recibido atención, ya que desde el punto de vista ambiental, pueden desempeñar un papel importante en el tratamiento de desechos acuosos ricos en lípidos, y desde el punto de vista bioquímico, las lipasas pueden representar un factor importante en la optimización de procesos fermentativos (3).

Actualmente, muchas lipasas aisladas de bacterias están siendo utilizadas en la industria de detergentes. La importancia de su uso se debe a que estas enzimas poseen una mayor estabilidad térmica y una elevada resistencia a detergentes, valores extremos de pH y a la desnaturalización química frente a solventes orgánicos (1, 2, 4).

La actividad enzimática de las lipasas puede ser evaluada analizando la liberación de ácidos grasos o glicerol producido a partir de triglicéridos o ésteres de ácidos grasos. Un método comúnmente usado es la cuantificación por titulación potenciométrica, usando como sustrato aceite de oliva (1, 5). El objetivo del presente trabajo fue emplear esta técnica para cuantificar la actividad lipasa contenida en sobrenadantes libres de células provenientes de cultivos de *Anoxybacillus* sp. luego de 96 h de cultivo, para luego determinar las condiciones óptimas de actividad, variando el pH, la temperatura y el tipo de surfactante, y finalmente analizar el perfil polipeptídico del sobrenadante para identificar las posibles proteínas responsables de la actividad lipasa.

## Materiales y métodos

### Materiales y reactivos

Agar (Hi-Media, India), bilis bovina en polvo, pancreatina porcina en polvo, taurocolato de sodio (BIOFARMO, Edo. Carabobo, Venezuela), Rhodamina B (SIGMA, USA) y aceite de oliva (La Pedriza, Venezuela). Todos los demás reactivos usados fueron de alta pureza.

### Cepa bacteriana y condiciones de cultivo

Se utilizó una cepa previamente aislada de las aguas termales Las Trincheras, Venezuela y caracterizada parcialmente como *Anoxybacillus* sp. (DSMZ-ID 05-1132) (6). La cepa fue crecida en 100 mL de caldo nutritivo Hi-Media, a 55°C hasta la aparición de turbidez. Un inóculo de este medio fue sembrado en medio selectivo [0,028 g MgCl<sub>2</sub>, 0,06 g CaCl<sub>2</sub>, 0,5 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g NaCl, 1 g NH<sub>4</sub>Cl, en 1 L de agua] suplementado con 1 mL de aceite de oliva por cada 100 mL de medio. El pH final del medio fue ajustado a 6,5. Los cultivos se incubaron a 55°C con agitación constante y el crecimiento se observó mediante siembras en placas de agar cuenta estándar.

### **Determinación cualitativa de la actividad lipasa**

Alicuotas de la suspensión bacteriana fueron sembradas en placas de agar suplementadas con yema de huevo de gallina (10 mL de yema por cada 100 mL de agar). Después de 48 h de incubación a 55°C, en condiciones de aerobiosis, la presencia de un brillo iridiscente, aperlado sobre la superficie del agar era indicativo de crecimiento bacteriano (6).

### **Determinación cuantitativa de la actividad lipasa**

Los cultivos bacterianos de diferentes tiempos de crecimiento se centrifugaron a 5000 × g por 15 min, y al sobrenadante, correspondiente a la fracción libre de células, se le determinó la actividad enzimática, según el método de Ruysen y Lauwers (7), con las siguientes modificaciones. La preparación del sustrato se realizó emulsionando 15 mL de aceite de oliva, 129 mL de tampón fosfato 0,01 M, pH 7,0, y 6 mL de bilis bovina 0,1 g/mL [0,37% (p/v) concentración final en ensayo]. La mezcla de reacción para la determinación de la actividad estaba constituida por 29,50 mL de la emulsión (a una temperatura fija y con un pH ajustado a 9,5 por adición de NaOH 0,1 M), y 2 mL del sobrenadante libre de células. La titulación se llevó a cabo con NaOH 0,01 M, manteniendo el pH en 9,5, con agitación constante por 20 min (8). La actividad enzimática se expresó como 1 μmol de ácido graso liberado del aceite de oliva por min, bajo las condiciones experimentales de pH y temperatura. Como control negativo se usó agua en lugar del sobrenadante libre de células, bajo condiciones experimentales idénticas. Se emplearon 0,2 mg de pancreatina porcina como fuente de lipasa para el control positivo, ensayado a 37°C.

### **Efecto de surfactantes sintéticos y comerciales sobre la actividad lipasa**

El ensayo para la determinación de la actividad lipasa, descrito anteriormente, fue

modificado para evaluar el efecto de otros surfactantes. En lugar de bilis bovina [0,37% (p/v)], se adicionaron SDS y Tween 80 [0,22% (p/v) y 0,37% (p/v) como concentración final en el ensayo, respectivamente]. Adicionalmente, se ensayaron detergentes comerciales comunes en el mercado venezolano. Seis mL de soluciones de 0,2 g/mL de las marcas RINDEX™, Leader Price™ y ACE™ (marcas registradas) fueron incorporados al sistema en ensayo a 55°C y el pH final ajustado a 10,5.

### **Efecto del pH y la temperatura sobre la actividad lipasa**

Se adicionó HCl a las emulsiones lipídicas hasta obtener valores de pH de interés (6,5; 7,5; 8,5; 9,5; 10,0; 10,5 y 11,0). La actividad lipasa se determinó a 55°C usando sobrenadantes libres de células de 96 h de cultivo. La cuantificación del pH se realizó usando un pH-metro OAKTON (intervalo confiable de medición pH 2-11). Se determinó la actividad lipasa en sobrenadantes de distintas horas de cultivo adicionando la alícuota del cultivo a la emulsión lipídica, previamente estabilizada a diferentes temperaturas (40, 50, 55, 60 y 65°C).

### **Electroforesis**

Los perfiles polipeptídicos de las muestras con actividad lipasa fueron analizados por SDS-PAGE al 10% (9). La corrida se llevó a cabo por ~90 min a 100 V. Se utilizó un marcador de peso molecular de amplio espectro (10-215 kDa, SIGMA). El revelado de los geles se efectuó por tinción con plata (10). La detección de la actividad enzimática por gel se hizo por zimografía usando el método de tinción con Rhodamina B (11, 12). Al finalizar la corrida, el gel se lavó con agua destilada repetidas veces durante 2 h y luego se le colocó sobre una placa de agar (agar 1%; NaCl 0,4%; Rhodamina B 1% y aceite de oliva 2%). La actividad lipolítica se observó como manchas rosadas pálidas en un fondo fucsia opaco, bajo radiación UV.

## Resultados y Discusión

### Crecimiento bacteriano

Las placas con agar cuenta estándar fueron inoculadas con la cepa *Anoxybacillus* sp., Gram (+), con presencia de colonias de forma alargada, bordes lisos, y de color blanco-amarillento tras 48 h de cultivo a 55°C. La curva de crecimiento en medio líquido no pudo llevarse a cabo de manera idónea por la aparición de una turbidez blanquecina, causada principalmente por los productos de reacción (sales de ácidos grasos y acil glicéridos) que emulsionan el aceite remanente del medio.

### Determinación cualitativa de la actividad lipasa

Alícuotas del cultivo bacteriano fueron crecidas en placas de agar con yema de huevo de gallina, detectándose actividades enzimáticas tipo lipasa/lecitinasas y mediante la formación de halos con brillo aceitoso e iridiscente alrededor de las colonias bacterianas (6).

### Determinación cuantitativa de la actividad lipasa

La actividad enzimática fue detectada por titulación potenciométrica de ácidos grasos, usando NaOH 0,01 M como agente titulante. Para la estandarización del método, se llevaron a cabo ensayos preliminares a 37°C usando aceite de oliva como sustrato, taurocolato de sodio como agente surfactante y pancreatina bovina como fuente de lipasas. La emulsión del sustrato se logró tras someter el sistema a agitación mecánica. El pH fue ajustado a 9,5 para favorecer la forma disociada de los ácidos grasos. La hidrólisis del aceite de oliva se midió por triplicado en función de los miliequivalentes de NaOH consumidos en la titulación por acción de la actividad lipasa en función del tiempo (7, 8). Se obtuvo una ecuación de la recta de  $y = 0,0044 x + 0,0057$ , con un  $R^2 = 0,9689$ , y una ecuación polinómica de

$y = -0,0002 x^2 + 0,0072 x - 0,0023$ , con un  $R^2 = 0,9986$ ; donde  $y$  = meq de NaOH consumidos, y  $x$  = tiempo en min.

Al trabajar con la actividad lipasa presente en los sobrenadantes libres de células, se fijaron las condiciones a 50°C, pH 9,5 y 20 min de incubación, utilizando bilis bovina como agente emulsionante.

Para evaluar la cantidad máxima de enzima excretada por las bacterias, se determinó la actividad lipasa respecto al tiempo, en alícuotas tomadas a diferentes tiempos de cultivo (figura 1), obteniéndose una actividad máxima a las 96 h de cultivo.

### Efecto de surfactantes sintéticos y comerciales sobre la actividad lipasa

Con la finalidad de optimizar la actividad lipasa secretada al medio de cultivo, se ensayaron distintos agentes emulsionantes, como SDS o Tween 80. El efecto de SDS o Tween 80 sobre la actividad lipasa, se refleja en la figura 1. Estos agentes produjeron emulsiones estables y arrojaron valores máximos a las 96 (Tween-80) y 120 h (SDS). No obstante, los valores de actividad registrados fueron similares a los obtenidos usando bilis bovina. Estos resultados parecen indicar que no existe una preferencia por parte de la enzima en usar un tipo determinado de surfactante. Esto pudiera ser una ventaja al momento de utilizar estas lipasas bacterianas como aditivos para jabones comerciales y agentes descontaminantes de efluentes acuosos con polutos lipídicos (13, 14). Se determinó una actividad volumétrica de 0,25; 0,18 y 0,22 ( $\pm 0,02$ )  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$  en presencia de Tween-80, SDS y bilis bovina, respectivamente; usando alícuotas de sobrenadantes de 96 h de cultivo. Curiosamente, todas las curvas registraron un comportamiento similar, observándose una disminución de la actividad lipasa a las 72 h. Por alguna razón, pareciera haber un comportamiento regulatorio en la expresión de esta enzima, la cual pudiera estar relacionada con la cantidad de sustrato disponible en

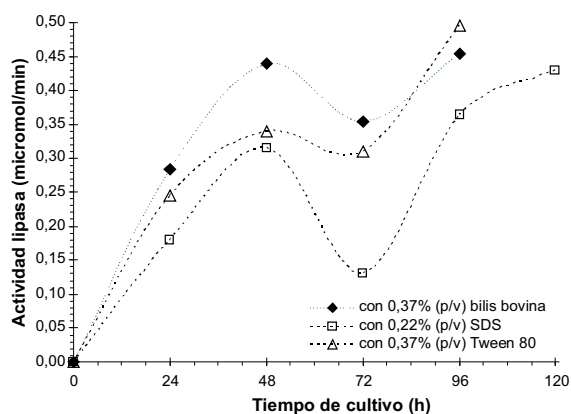


Figura 1. Hidrólisis de aceite de oliva en función del tiempo por acción de lipasas bacterianas presentes en sobrenadantes libres de células, en presencia de diversos agentes surfactantes.

ese momento, o por algún mecanismo regulador aún no definido en este sistema en estudio. Se ha reportado un mecanismo de modulación alostérica presente en lipasas, que pudiera estar directamente involucrado con el metabolismo de ácidos grasos en las bacterias, como ha sido propuesto por Köhler y Wünsch (15), al analizar lipasas provenientes de *Mucor miehei*. Por otra parte, se ha reportado una inhibición del crecimiento bacteriano y de la producción de la actividad lipasa en *Thermus thermophilus* HB27 (16) a determinadas concentraciones de surfactantes, hecho que también pudiera estar involucrado con la disminución de la actividad observada a las 72 h.

El uso de detergentes comerciales fue analizado. Soluciones de 0,2 g/mL de las marcas RINDEX™, Leader Price™ y ACE™ (marcas registradas) fueron incorporadas al sistema en ensayo a 55°C y pH 10,5. No obstante, la estabilidad de la emulsión con el aceite de oliva sólo se alcanzó con la marca ACE™. Se determinó una actividad volumétrica de  $0,23 (\pm 0,02) \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$  en presencia de este detergente. Este valor resultó semejante a las actividades obtenidas con los surfactantes SDS, Tween-80 y bilis

bovina. Esto demuestra que la lipasa presente en los sobrenadantes pudiera ser efectivamente incorporada en detergentes comerciales de este tipo.

### Efecto del pH y la temperatura sobre la actividad lipasa

El estudio del pH se realizó a 55°C usando bilis bovina como surfactante y una alícuota del sobrenadante libre de células de 96 h de cultivo. Valores de pH superiores a 11 no fueron evaluados por exceder la capacidad de medición del electrodo usado. En la figura 2 se muestra una actividad máxima a pH 10,5. Este valor es superior a los registrados para otras especies (17-19), los cuales oscilan entre 6,0 y 9,5. La actividad volumétrica calculada para pH 10,5 y 55°C fue  $1,6 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$  usando el sobrenadante libre de células de 96 h de cultivo. Esto representa un incremento de entre 6,4 y 8,9, en comparación con los resultados obtenidos en el estudio de surfactantes, llevados a cabo a pH 9,5.

La figura 2 B muestra el efecto ejercido por la temperatura sobre la actividad lipasa, registrándose una actividad máxima a 55°C. Este valor concuerda con resultados reportados previamente (1, 19).

Adicionalmente, se evaluó la estabilidad térmica de la actividad enzimática. Una fracción del sobrenadante libre de células de 96 h de cultivo fue preincubado a 50°C y pH 10,5. La actividad enzimática calculada fue de  $1,17 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$ , a pH 10,5 y 50°C. Esto representa un 73,6% de la actividad enzimática original en un total de 50 min (30 min de preincubación más 20 min de tiempo de ensayo). Estos resultados implican que la actividad enzimática muestra una gran estabilidad térmica a pH alcalino, proponiéndola como candidata para ser usada como aditivo en detergentes domésticos, tomando en consideración que el uso de detergentes en procesos de lavado se lleva a cabo entre 40 y 60°C, y no sobrepasan generalmente los 50 min (20).

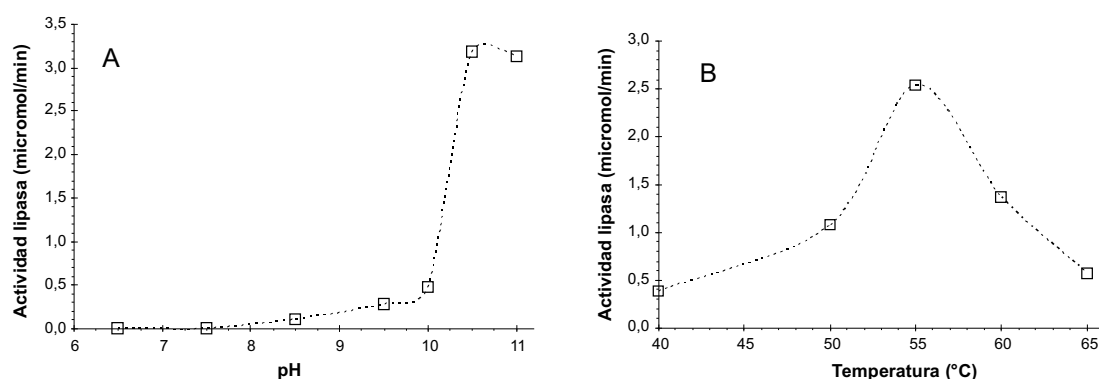


Figura 2. Efecto del pH y la temperatura sobre la actividad enzimática del sobrenadante libre de células luego de 96 h de cultivo. (A) La variación del pH se hizo a 55°C. (B) La temperatura se varió fijando el pH a 9,5.

### Análisis electroforético

Los sobrenadantes libres de células de 96 h de cultivo fueron analizados en geles de poliacrilamida al 10% bajo condiciones desnaturalizantes. El patrón polipeptídico teñido con plata reveló varias bandas entre 15 y 100 kDa (figura 3). La asignación de algunas de estas bandas como responsables de la actividad lipasa fue parcialmente factible a través de la técnica de zimografía, revelando con Rhodamina B. Resultados preliminares muestran que la actividad enzimática se presenta como dos áreas, correspondientes a los pesos moleculares de 25 y 50 ( $\pm 10$ ) kDa (figura 3). Estos resultados son similares a los obtenidos por Salameh y Wiegel (21), donde logran aislar, purificar y caracterizar dos lipasas de 50 y 57 kDa provenientes de la cepa termófila *Thermosyntropha lipolytica*. Por otra parte, se ha reportado una lipasa de 60 kDa de una cepa termófila *Bacillus* sp. (22). Igualmente, se ha reportado una lipasa de ~26 kDa presente en *B. stearothermophilus* (23). Actualmente, se ejecutan ensayos para el perfeccionamiento de la visualización de la actividad lipasa en geles de poliacrilamida usando diversos métodos zimográficos (24, 25).

### Conclusiones

La cepa de *Anoxybacillus* sp. fue capaz de excretar, bajo condiciones selectivas, una

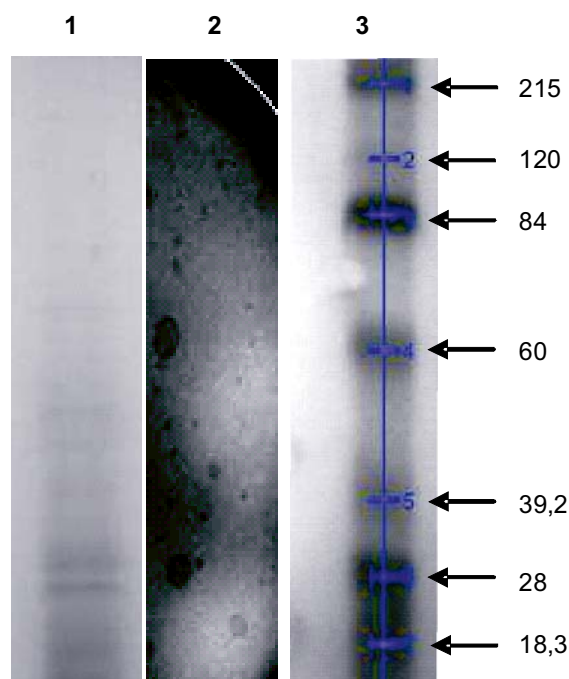


Figura 3. Electroferograma del sobrenadante libre de células por SDS-PAGE (10%) en condiciones no reductoras. Carriles: (1) fracción extracelular proveniente del caldo nutritivo. (2) Zimografía revelada con Rhodamina B luego de 48h de incubación a 55°C proveniente del carril 1; (3) Marcador de pesos moleculares (en kDa).

actividad lipasa, la cual resultó máxima a 96 h de cultivo, a pH 10,5 y 55°C. Se demostró que la actividad enzimática era termoestable, perdiendo 26,4% de la actividad original, tras 50 min de incubación a 50°C. La enzima pudo ser estimulada en presencia de varios surfactantes como SDS, Tween-80, bilis bovina o la marca comercial ACE™. Se visualizó un perfil polipeptídico en SDS-PAGE y se mostró, por zimografía, la existencia de dos áreas correspondientes a actividad lipasa de 25 y 50 ( $\pm$  10) kDa. Estos resultados conducen a postular a esta enzima como una potencial candidata a ser usada por la industria como ingrediente en detergentes comerciales dada su resistencia térmica y alcalina.

### Agradecimientos

Se agradece al CDCH-UC (1303-2006, 1066-2007) y al FONACIT (Pem20010022 68) por subvencionar parcialmente este trabajo. Agradecemos a los Departamentos de Química y Biología (FACYT- UC) por el apoyo brindado y al Prof. L. Medina (Unidad de Microbiología Ambiental, FCS-UC). Agradecemos a las Lic. F. Gómez, B. Moy y L. Martínez (Dpto. de Química-FACYT-UC) y M.Sc. V. Storaci (Dpto. Biología-FACYT-UC) por el apoyo en el desarrollo experimental. Esta investigación empleó recursos provenientes de la aplicación de la Ley Orgánica de Ciencias, Tecnología e Innovación (LOCTI-2007-2009).

### Referencias bibliográficas

1. BECKER P., ABU-REESH I., MARKOSSIAN S., ANTRANIKIAN G., MÄRKL H. *Appl Microbiol Biotechnol* 48(2): 184-190. 1997.
2. JAEGER K., RANSAC S., DIJKSTRA B., COLSON C., VAN HEUVEL M., MISSET O. *FEMS Microbiol Rev* 15(1): 29-63. 1994.
3. BECKER P., MÄRKL H. *Biotechnol Bioeng* 70(6): 630-637. 2000.
4. VIEILLE C., BURDETTE D., ZEIKUS J. *Biotechnol Annu Rev* 2: 1-83. 1996.
5. GUPTA R., RATHI P., GUPTA N., BRADDOO S. *Biotechnol Appl Biochem* 37(Pt 1): 63-71, 2003.
6. DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN. *Identification report N°05-1132*. 2005.
7. RUYSSSEN R., LAUWERS A. *Pharmaceutical enzymes: properties and assay methods*. Story-Scientia. Ghent (Belgium). 72-84. 1978.
8. MAC FADDIN J. *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. 3° Edic. Edit. Médica Panamericana. Buenos Aires (Argentina). 254-261, 267-273. 2003.
9. LAEMMLI U. *Nature* 227(5259): 680-685. 1970.
10. MERRIL C., PRATT M. *Anal Biochem* 156(1): 96-110. 1986.
11. MANCHENKO G. *Handbook of detection of enzymes on electrophoretic gels*. 2<sup>nd</sup> Edit. CRC PRESS. Boca Raton (USA). 20-23. 2003.
12. JAEGER G., KOUKER K. *Appl Environ Microbiol* 53(1): 211-213. 1987.
13. PRAMOD K. *US Patent* 5536436. 1996.
14. ALLIE Z., JACOBS E., MAARTES A., SWART P. *J Memb Sci* 218(1-2): 107-116. 2003.
15. KÖHLER J., WÜNSCH B. *Theor Biol Med Model* 4(34): 1-20. 2007.
16. DEIVE F., CARVALHO E., PASTRANA L., RÚA M., LONGO M., SANROMAN M. *Biore-sour Technol* 100(14): 3630-3637. 2009.
17. EL-SHAFFI H., REZKALLAH, L. *Microbiol Res* 152(2): 199-208. 1997.
18. LIANGHUA T., LIMING X. *Appl Biochem Biotechnol* 125(2): 139-146. 2005.
19. SNELLMAN E., SULLIVAN E., COLWELL R. *Eur J Biochem* 269(23): 5771-5779. 2002.
20. OBENDORF K., MEJLDAL R., VARANASI A., THELLEREN M. *J Surf Deterg* 4(1): 43-55. 2001.

- 
21. SALAMEH M., WIEGEL J. ***App Enviroment Microbiol*** 73(23): 7725-7731. 2007.
  22. NAWANI N., KHURANA J., KAUR J. ***Mol Cell Biochem*** 290(1-2): 17-22. 2006.
  23. JEONG S., KIM H., KIM S., CHI S., PAN J., OH T., RYU S. ***J Biol Chem*** 277(19): 17041-17047. 2002.
  24. TAPIZQUENT M. Análisis de actividad lipasa proveniente de termófilos mediante técnicas zimográficas (para obtener el título de Licenciado en Química) Facultad de Ciencias y Tecnología. Universidad de Carabobo. Valencia (Venezuela). 64 pp. 2009.
  25. CHOI N., KIM B., PARK C., HAN Y., LEE H., CHOI J., LEE S., SONG J. ***Anal Biochem*** 386(1): 121-122. 2009.