



**DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO DE *Stenotrophomonas rhizophila*  
USBA GBX-843A PARA LA PRODUCCIÓN DE ENZIMAS LIPOLÍTICAS**

**CAMILO ANTONIO MOYA VALDERRAMA  
DIANA CAROLINA REDONDO TRUJILLO**

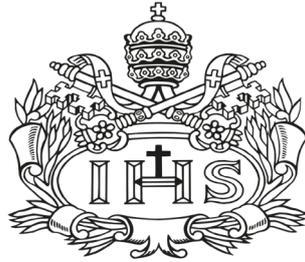
**TRABAJO DE GRADO**

Presentado como requisito parcial para optar por el título de  
**MICROBIOLOGO INDUSTRIAL**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
CARRERA DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL**

**Bogotá, D.C**

**Diciembre del 2022**



Pontificia Universidad  
**JAVERIANA**  
Colombia

**DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO DE *Stenotrophomonas rhizophila***

**USBA GBX-843A PARA LA PRODUCCIÓN DE ENZIMAS LIPOLÍTICAS**

**CAMILO ANTONIO MOYA VALDERRAMA**

**DIANA CAROLINA REDONDO TRUJILLO**

**JOSÉ SALVADOR MONTANA LARA PhD**

**DIRECTOR**

**GINA PILAR LÓPEZ RAMÍREZ PhD**

**CODIRECTORA**

Natalia Beatriz Comba G

**NATALIA BEATRIZ COMBA GONZÁLEZ PhD**

**PAR EVALUADOR**

## **NOTA DE ADVERTENCIA**

### **Artículo 23 de la resolución N° 13 de julio de 1946**

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus tesis de grado. Sólo velará porque no se publique nada contrario al dogma y la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

## **AGRADECIMIENTOS**

### **Camilo y Diana:**

Agradecemos principalmente al profesor José Salvador Montaña por motivarnos a trabajar en este fascinante tema y apoyarnos a fortalecer nuestras aptitudes investigativas, profesionales y de trabajo en equipo. Así mismo, gracias a la profesora Gina López por brindarnos acompañamiento y apoyo en las diferentes situaciones presentadas durante el desarrollo del trabajo.

A los miembros de la Unidad de Saneamiento y Biotecnología Ambiental (USBA) y al equipo del laboratorio de microbiología ambiental de la profesora Aura Marina Pedroza que nos apoyarnos en la realización de las diferentes etapas experimentales.

A la profesora Ivonne Gutiérrez por su asesoría y experiencia en el entendimiento de los análisis estadísticos. Finalmente, agradecer a los estudiantes y profesores de los laboratorios de bioensayos y calidad de aguas, Instituto de Errores Innatos del Metabolismo (EIM) y bioquímica por compartimos recursos y espacios para la realización del trabajo.

A la Universidad Javeriana y al programa de Microbiología Industrial por todo el aprendizaje en el camino.

A la profesora Natalia Comba por participar en la evaluación de este documento y la sustentación.

### **Camilo:**

A mis padres por acompañarme durante todo este proceso con su motivación, amor y sabiduría. A mi hermana Yidie Estrada y a mis sobrinas Alejandra y Valentina por apoyarme en momentos difíciles y a mis amigos Laura Diaz, Natalia Corredor, Joshua Rúa y Yeris Junco, por su amistad y apoyarme en los momentos más importantes.

### **Diana:**

A mis padres por creer en mí y enseñarme a través del amor sobre los valores que me condujeron a ser persona. A mis hermanos Juli, Nono y Carlos por inspirarme y ser motivo para crecer día a día. A mi tía Martha (mi lugar de catarsis) por darme ánimo en los momentos que lo necesité.

A Perla por ser la mejor compañera de estudio aportando a mi aprendizaje a través de sus ronroneos. A Nico por ser mi ángel y cuidar de mí dónde quiera que se encuentre. A Julito por su apoyo incondicional en cada momento y a mis grandes amigas Jacky, Amanda, Eliza y Sophia por acompañarme en etapas difíciles de la vida y hacerlas llevaderas.

## Tabla de contenido

<b>RESUMEN</b> .....	<b>6</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>8</b>
<b>2. MARCO TEÓRICO Y REFERENTES CONCEPTUALES</b> .....	<b>8</b>
2.1. MICROORGANISMOS DE AMBIENTES FRÍOS .....	8
2.2. ENZIMAS ADAPTADAS AL FRÍO .....	9
2.3. ENZIMAS LIPOLÍTICAS.....	9
2.4. CLASIFICACIÓN DE LAS ENZIMAS LIPOLÍTICAS .....	10
2.5. ESTRUCTURA DE ENZIMAS LIPOLÍTICAS.....	10
2.6. REACCIÓN Y CATÁLISIS .....	11
2.7. TÉCNICAS DE ESTUDIO DE ENZIMAS LIPOLÍTICAS.....	11
2.8. MÉTODOS DE SCREENING EN MEDIOS SÓLIDOS .....	11
2.9. MÉTODOS VOLUMÉTRICOS.....	12
2.10. MÉTODOS COLORIMÉTRICOS .....	12
2.11. APLICACIONES .....	13
2.12. BIOPROSPECCIÓN DE MICROORGANISMOS DE AMBIENTES FRÍOS PRODUCTORES DE ENZIMAS LIPOLÍTICAS .....	13
2.13. <i>STENOTROPHOMONAS RHIZOPHILA</i> .....	14
2.14. CONDICIONES DE CULTIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE ENZIMAS LIPOLÍTICAS.....	15
2.15. ESTRATEGIAS DE OPTIMIZACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE ENZIMAS LIPOLÍTICAS .....	15
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>16</b>
3.1. OBJETIVO GENERAL.....	16
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	16
<b>4. METODOLOGÍA</b> .....	<b>16</b>
4.1. <i>S. RHIZOPHILA</i> USBA GBX-843A.....	16
4.2. REACTIVACIÓN DE LA CEPA Y PREPARACIÓN BANCO PRIMARIO Y DE TRABAJO .....	17
4.3. CONFIRMACIÓN DE LA ACTIVIDAD LIPOLÍTICA DE LA CEPA <i>S.RHIZOPHILA</i> .....	17
4.4. DETERMINACIÓN DE LA TEMPERATURA DE CRECIMIENTO DE <i>S. RHIZOPHILA</i> PARA LA PRODUCCIÓN DE ENZIMAS LIPOLÍTICAS .....	18
4.5. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD LIPOLÍTICA, DURANTE EL CRECIMIENTO DE <i>S. RHIZOPHILA</i> BAJO LAS DOS TEMPERATURAS .....	18
4.6. ANÁLISIS DE LOS FACTORES DE CULTIVO DE <i>S.RHIZOPHILA</i> USBA GBX-843A PARA LA PRODUCCIÓN DE ENZIMAS LIPOLÍTICAS .....	18
4.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	19
4.8. DETERMINACIÓN DE PREFERENCIA DE SUSTRATO.....	19
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>20</b>
5.1. REACTIVACIÓN DE LA CEPA Y PREPARACIÓN DE BANCOS.....	20
5.2. CONFIRMACIÓN DE LA ACTIVIDAD LIPOLÍTICA <i>S.RHIZOPHILA</i> USBA GBX-843A .....	20
5.3. DETERMINACIÓN DE LA TEMPERATURA DE CRECIMIENTO DE <i>S.RHIZOPHILA</i> USBA GBX-843A PARA LA PRODUCCIÓN DE ENZIMAS LIPOLÍTICAS.....	21
5.4. ANÁLISIS DE LOS FACTORES DE CULTIVO DE <i>S.RHIZOPHILA</i> USBAGBX-843A PARA LA PRODUCCIÓN DE ENZIMAS LIPOLÍTICAS .....	23
<b>6. DISCUSIÓN</b> .....	<b>27</b>

6.1.	ACTIVIDAD LIPOLÍTICA CONFIRMATIVA.....	27
6.2.	CINÉTICA DE CRECIMIENTO Y ACTIVIDAD LIPOLÍTICA .....	27
6.3.	ANÁLISIS DE LOS FACTORES DE CULTIVO DE <i>S.RHIZOPHILA</i> USBA GBX-843A PARA LA PRODUCCIÓN DE ENZIMAS LIPOLÍTICAS .....	28
6.4.	PREFERENCIA DE SUSTRATO .....	30
<b>7.</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>30</b>
<b>8.</b>	<b>RECOMENDACIONES .....</b>	<b>31</b>
<b>9.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>31</b>
<b>10.</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>42</b>

## RESUMEN

Las enzimas lipolíticas, adaptadas al frío, se caracterizan por llevar a cabo reacciones de hidrólisis en sistemas acuosos o de síntesis en presencia de solventes orgánicos sobre enlaces tipo ésteres carboxílicos de los lípidos a bajas temperaturas. Aunque estas enzimas son producidas por los organismos psicrófilos, las enzimas bacterianas extracelulares, presentan características especiales, que pueden ser aprovechadas para su aplicación en procesos industriales. Lo anterior ha despertado el interés por estudiar microorganismos de ambientes fríos, productores de enzimas lipolíticas y determinar las condiciones de cultivo adecuadas para su producción.

En este trabajo se evaluaron las condiciones de cultivo, para la producción de enzimas lipolíticas por la cepa *S. rhizophila* USB A GBX-843A aislada de suelo glaciar del parque Nacional Natural los Nevados (PNN). Para tal fin, inicialmente se determinó la temperatura óptima de crecimiento y producción de enzimas. Posteriormente, se evaluó la influencia de los componentes del medio de cultivo, sobre la producción de enzimas lipolíticas (fuentes de carbono fuente de nitrógeno, sales) mediante dos diseños Plackett-Burman, el primero con 11 factores y el segundo con 9 y finalmente se determinó la preferencia por sustrato para la/las enzimas lipolíticas producidas.

En cuanto a la cinética de crecimiento, se presentaron tendencias similares en la productividad de biomasa a ambas temperaturas con 0,630 y 0,632 U.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> y la mayor productividad se presentó a 15°C con 2,797 U.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. Respecto a la influencia de los componentes en el medio de cultivo, aunque los resultados del diseño Plackett-Burman, no permitieron validar el modelo, se pudo determinar que algunos factores como el K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, FeSO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub> y fuentes de nitrógeno como: cloruro de amonio y peptona, mostraron valores significativos y posiblemente influyen la producción de enzimas lipolíticas. Finalmente, las enzimas lipolíticas presentaron preferencia por sustratos lipídicos de cadena corta y mediana (*p*NP4-*p*NP10). En Conclusión, la cepa de *Stenotrophomonas rhizophila* USB A GBX-843A, presenta un mayor crecimiento y producción de enzimas lipolíticas a 15°C, preferencia por sustratos de cadena corta y mediana. Los componentes del medio de cultivo (fuentes de nitrógeno y sales), que posiblemente tienen mayor influencia en la producción de enzimas lipolíticas, deben ser evaluados con mayor profundidad.

**Palabras claves:** *S. rhizophila*, enzimas lipolíticas, cinética de crecimiento, Plackett-Burman.

## ABSTRACT

Lipolytic enzymes, adapted to cold, are characterized by carrying out hydrolysis reactions in aqueous or synthetic systems in the presence of organic solvents on carboxylic ester-like bonds of lipids at low temperatures. Although these enzymes are produced by psychrophilic organisms, extracellular bacterial enzymes present special features that can be used for their application in industrial processes. This has awakened the interest to study microorganisms from cold environments, producers of lipolytic enzymes and to determine the appropriate culture conditions for their production.

In this work, the culture conditions for the production of lipolytic enzymes by the strain *S. rhizophila* USBA GBX-843A isolated from glacial soil of the Los Nevados National Natural Park (PNN) were evaluated. For this purpose, the optimum temperature for growth and enzyme production was initially determined. Subsequently, the influence of the components of the culture medium on the production of lipolytic enzymes (carbon sources, nitrogen source, salts) was evaluated by means of two Plackett-Burman designs, the first with 11 factors and the second with 9, and finally the preference for substrate for the lipolytic enzymes produced was determined.

Regarding growth kinetics, similar trends in biomass productivity were presented at both temperatures with 0.630 and 0.632 U.L-1.h-1 and the highest productivity was presented at 15°C with 2.797 U.L-1h-1. Regarding the influence of the components in the culture medium, although the results of the Plackett-Burman design did not allow validation of the model, it was possible to determine that some factors such as K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, FeSO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub> and nitrogen sources such as ammonium chloride and peptone, showed significant values and possibly influence the production of lipolytic enzymes. Finally, lipolytic enzymes showed preference for short and medium chain lipid substrates (*p*NP4-*p*NP10). In conclusion, the *Stenotrophomonas rhizophila* strain USBA GBX-843A showed a higher growth and production of lipolytic enzymes at 15°C, with a preference for short- and medium-chain substrates. The components of the culture medium (nitrogen sources and salts), which possibly have a greater influence on lipolytic enzyme production, should be further evaluated.

**Keywords:** *S. rhizophila*, lipolytic enzymes, growth kinetics, Plackett-Burman.

## 1. Introducción

El mercado global de las enzimas en la industria está valorado en 10,69 billones de dólares y se estima una tasa de crecimiento anual (CAGR) de 6,5% entre 2021-2028. En este mercado, las enzimas lipolíticas (EC 3.1.1), representan el tercer grupo de biocatalizadores de alta demanda, siendo las de origen microbiano, las que concentran el 90% del mercado mundial de hidrolasas. Las enzimas lipolíticas microbianas, se emplean como biocatalizadores en industrias como: biodiesel, nutracéutica, alimentos, detergentes y cosmética, debido a su capacidad para catalizar reacciones de biotransformación de compuestos que contienen enlaces éster [1-3]. En este contexto, las enzimas lipolíticas adaptadas al frío han tomado especial interés, puesto que, a diferencia de las mesófilas, presentan altas tasas catalíticas a bajas temperaturas y mantienen su actividad en un amplio rango de temperaturas. Estas características permiten que las enzimas lipolíticas producidas por microorganismos psicrófilos, sean empleadas en procesos industriales que se desarrollan bajo condiciones extremas [4,5]. Lo anterior, ha promovido estudios de bioprospección para la obtención de enzimas lipolíticas en ambientes fríos, a través de aproximaciones que requieren o no del cultivo de microorganismos. En los últimos 15 años, los métodos independientes de cultivo basados en la construcción de librerías metagenómicas o secuenciación del ADN metagenómico han permitido la identificación de genes codificantes de enzimas lipolíticas adaptadas al frío y su posterior clonación y expresión en sistemas heterólogos. Sin embargo, algunas limitaciones relacionadas con la expresión heteróloga de enzimas activas han concentrado de nuevo la investigación en métodos dependientes de cultivo para la obtención de enzimas lipolíticas de forma nativa [6,7].

Estudios realizados por la Unidad de Saneamiento y Biotecnología Ambiental (USBA) de la Pontificia Universidad Javeriana, han permitido el aislamiento de microorganismos con actividad lipolítica en suelos de páramo y glaciar del Parque Nacional Natural los Nevados (PNN). Uno de los aislamientos, identificado como *Stenotrophomonas rhizophila* cepa USBA GBX-843A, mostró una actividad lipolítica cualitativa importante, lo que permite inferir sobre su potencial biotecnológico e industrial. Por tratarse de la primera cepa de esta especie, reportada con actividad lipolítica, no se conocen las condiciones de cultivo adecuadas, que permitan obtener biomasa suficiente para la producción de la enzima activa. Por lo anterior, en este estudio se determinaron las condiciones de cultivo de *S. rhizophila* USBA GBX-843A para la producción de enzimas lipolíticas [8]. La determinación de estas condiciones permitirá a futuro hacer estudios para evaluar el escalamiento del proceso, así como determinar el verdadero potencial biotecnológico y/o industrial de estas enzimas.

## 2. MARCO TEÓRICO Y REFERENTES CONCEPTUALES

### 2.1. Microorganismos de ambientes fríos

Corresponden a un grupo de microorganismos extremófilos los cuales se caracterizan por crecer a bajas temperaturas y según el rango de la temperatura de crecimiento pueden clasificarse como microorganismos psicrófilos, los cuales crecen entre 0-20°C y su temperatura

óptima de crecimiento generalmente es inferior a 15°C o también pueden clasificarse como microorganismos psicrótrofos, que crecen entre 5-25°C y su temperatura óptima de crecimiento puede ser mayor a 20°C [9]. Estos microorganismos representan una amplia biodiversidad al estar distribuidos en diferentes tipos de ambientes fríos como polares, periglaciares o ambientes de alta montaña [10-12]. Para esto, han desarrollado diferentes tipos de adaptaciones entre las cuales se encuentran: *i.* Modificaciones a nivel de membrana al producir ácidos grasos de cadena corta insaturados, ácidos grasos metil ramificados, cíclicos y poliinsaturados (PUFAs) que permiten aumentar la fluidez de la membrana a bajas temperaturas [13,14]. *ii.* producción de solutos compatibles como glicerol, trehalosa y manitol que mantienen la homeostasis de la célula durante el congelamiento, *iii.* Producción de agentes crioprotectantes para proteger la integridad de la célula frente a los cristales de hielo, *iv.* producción de compuestos antioxidantes, que forman una interfase hidrofóbica a nivel de la membrana que evita la entrada de especies reactivas de oxígeno (ROS) [14]; además pueden producir proteínas para la protección contra cristales de hielo como proteínas nucleantes del hielo (INPs) que provocan la formación de cristales a nivel extracelular y las proteínas de unión al hielo (IBPs) que se unen a los cristales y evitan su nucleación para mantener la estructura inicial y proteger la membrana [15,16] *v.* Producción de chaperonas intracelulares de unión a ARN/ADN para contrarrestar el mal plegamiento de las moléculas y mantener los procesos de replicación, transcripción y traducción. *vi* producción de enzimas adaptadas al frío que mantienen el metabolismo celular a bajas temperaturas [17].

## 2.2. Enzimas adaptadas al frío

Las enzimas adaptadas al frío pueden mantener altas tasas catalíticas ( $K_{cat}$ ) a bajas temperaturas, como consecuencia de la disminución de la energía de activación e incremento de la entropía ( $\Delta H$ ) y la disminución de la entalpía ( $\Delta S$ ), así como el incremento de la afinidad del sustrato ( $K_m$ ) por el sitio activo. Para mantener la actividad a bajas temperaturas las enzimas, producto de mutaciones puntuales, desarrollaron adaptaciones estructurales que les permiten incrementar la flexibilidad estructural, entre las que se encuentran: La disminución del *core* de hidrofobicidad, por sustituciones de aminoácidos aromáticos por apolares, el incremento de aminoácidos apolares como la alanina (Ala) y la asparagina (Asn) en las alfa hélices y la disminución de puentes disulfuro, enlaces iónicos y puentes de hidrógeno [5,6,18,19]. Debido al potencial que presentan estas enzimas, se han identificado en microorganismos de diferentes ambientes, generalmente en bacterias (72%) y hongos (23%) siendo las hidrolasas (EC 3) la clase más reportada (91%), en la que se destacan las enzimas lipolíticas, que se han estudiado tanto por métodos dependientes de cultivo (18% lipasas y 20% carboxilesterasas), como por métodos no dependientes de cultivo (30% lipasas y 30% carboxilesterasas) [19].

## 2.3. Enzimas lipolíticas

Las enzimas lipolíticas (EC 3.1.1) son enzimas tipo esterasas, las cuales se caracterizan por hidrolizar enlaces tipo ésteres carboxílicos de los lípidos. Estas enzimas pueden ser intracelulares, extracelulares o transmembranales; ser solubles en agua e insolubles en

solventes orgánicos y no requerir cofactores para su catálisis [20]. Con respecto a su distribución, se pueden encontrar en todos los organismos; sin embargo, las enzimas lipolíticas bacterianas han tomado mayor interés debido a que a nivel biotecnológico e industrial son más fáciles de obtener, presentan bajos costos de producción, son generalmente extracelulares, lo que facilita los procesos de separación y purificación, con altos rendimientos [4,20]. La primera clasificación de las enzimas lipolíticas fue realizada por Arpigny y Jaeger, quienes las clasificaron en ocho familias (I-VIII) según diferentes características como: microorganismo de origen, actividad biológica, modificaciones estructurales en dominios y motivos y la localización celular [21].

#### **2.4. Clasificación de las enzimas lipolíticas**

Las enzimas lipolíticas se pueden clasificar en dos grupos que se conocen como las carboxilesterasas (EC 3.1.1.1) y las lipasas (EC 3.1.1.3), los cuales se diferencian principalmente por la preferencia del sustrato a hidrolizar. Las carboxilesterasas, por ejemplo, prefieren hidrolizar lípidos de cadenas cortas o medianas (C2-C8) solubles en agua, mientras que las lipasas verdaderas, hidrolizan lípidos de cadenas largas (EC 3.1.1.1) insolubles en agua [22,23]. Debido a la hidrofobicidad de los sustratos, las lipasas verdaderas se diferencian también de las carboxilesterasas por llevar a cabo el fenómeno conocido como activación interfacial, que consiste en llevar a cabo la catálisis en una interfase lípido-agua. Por otra parte, a nivel estructural, las lipasas verdaderas, se caracterizan por presentar una gran proporción de aminoácidos hidrofóbicos a diferencia de las carboxilesterasas que presentan una mayor proporción de aminoácidos hidrofílicos [23,24]. Así mismo, se diferencian por presentar dominios funcionales de acceso al sitio activo diferentes, ya que las lipasas verdaderas, para poder realizar la activación interfacial, poseen una especie de tapa o cubierta del sitio activo (dominio “lid”), que se abre en presencia del sustrato. Mientras que las carboxilesterasas poseen un dominio “cap” que cumple la misma función, pero en sistemas acuosos [25]. Finalmente, los dos grupos de enzimas también se pueden diferenciar con base en algunas propiedades químicas como la enantioselectividad y la regioselectividad, que son más frecuentes en las lipasas que en las carboxilesterasas [26].

#### **2.5. Estructura de enzimas lipolíticas**

Las enzimas lipolíticas pertenecen a la familia de las  $\alpha/\beta$  hidrolasas que se caracterizan por presentar un dominio de tipo  $\alpha/\beta$  que está organizado a partir de 8 cadenas  $\beta$  paralelas y antiparalelas conectadas por una hélice  $\alpha$ . Sin embargo, las modificaciones del dominio pueden variar según la cantidad de láminas  $\beta$  y hélices  $\alpha$ . Así mismo, en este dominio se localiza un motivo conservado consistente en un pentapéptido de GX SXG (glicina-aminoácido-serina-aminoácido-glicina) y el sitio activo constituido por una triada catalítica compuesta por un ácido como el aspartato (Asp), una base como la histidina (His) y un nucleófilo como la serina (Ser). La conformación de la triada permite la formación de un agujero de oxanión, el cual está constituido por residuos de aminoácidos hidrofóbicos que pueden ser la glicina (Gly), la tirosina (Tyr) u otros. También pueden presentar dominios complementarios amino y carbono

terminales o dominios para el recubrimiento del sitio activo dependiendo del tipo de enzima [23, 25-29].

## **2.6. Reacción y catálisis**

Las enzimas lipolíticas bacterianas se producen y liberan al medio extracelular a partir de diferentes mecanismos de secreción como lo pueden ser: la vía tipo I a nivel transmembranal, mediada por transportadores ABC; la vía tipo II a nivel de la membrana interna mediada por dominios N-terminales y la vía por auto transportadores a nivel de la membrana externa mediada por dominios C-terminales [29-31], Para llevar a cabo la hidrólisis en sistemas acuosos, es necesaria la presencia de lípidos de cadena corta, mediana o larga que puedan ser usados como sustratos, de tal forma que después de la catálisis se liberaran ácidos grasos como productos.

En las reacciones de hidrólisis, el mecanismo de catálisis inicia cuando en el sitio activo la serina es activada por la histidina, haciendo un ataque nucleofílico que permite la acilación del sustrato lipídico, debido a la transferencia de un protón al grupo carboxilo y así generar un intermediario tetraédrico estabilizado por átomos de nitrógeno pertenecientes al agujero de oxanión. Posterior a esta primera fase, se libera un alcohol y se forma un grupo intermediario, luego la histidina presente en la tríada catalítica activa una molécula de agua, que a través de un segundo ataque nucleofílico en el grupo carbonilo, se lleva a cabo una hidrólisis que conduce a la formación del segundo intermediario tetraédrico. Finalmente, por transferencia de un protón a la serina del sitio activo, se libera el ácido graso de la enzima [22,32-34]. De otra parte, en las reacciones de síntesis, que se llevan cabo en sistemas orgánicos o en condiciones micro acuosas que, gracias a la estereoselectividad de la enzima frente al sustrato, se pueden llevar a cabo reacciones de esterificación, amidación, tío-esterificación, acidólisis, aminólisis, alcoholólisis e inter-esterificación [23].

## **2.7. Técnicas de estudio de enzimas lipolíticas**

Se han desarrollado varios métodos para determinar la actividad de enzimas lipolíticas a partir de extractos crudos o purificados, que se basan tanto en la cuantificación del sustrato hidrolizado como en el producto liberado [35-37]. Entre los métodos comunes que se utilizan para evaluar la actividad lipolítica de forma general se destacan los métodos de “screening” en medios sólidos, los métodos volumétricos y los métodos colorimétricos.

## **2.8. Métodos de “screening” en medios sólidos**

Corresponden a métodos cualitativos que se emplean generalmente para aislar e identificar microorganismos lipolíticos, a partir de medios de cultivo emulsificados con sustratos lipídicos, que al ser hidrolizados llevan a la liberación de ácidos grasos que se precipitan y forman un halo translúcido alrededor de las colonias, de tal modo que el diámetro de la zona de hidrólisis es proporcional a la concentración de enzimas lipolíticas producidas por los microorganismos. Generalmente, los medios se emulsifican con tributirina, que corresponde a un sustrato soluble

en agua, fácil de homogeneizar y que permite visualizar fácilmente los halos. Sin embargo, también se utilizan sustratos insolubles en agua, como el aceite de oliva, que permiten una mayor visualización de halos de hidrólisis, esto especialmente para microorganismos productores de lipasas [37]. De otra parte, se han implementado variaciones de esta técnica, como los ensayos de difusión en disco, para detectar microorganismos lipolíticos en sobrenadantes de medios líquidos, o métodos alternos añadiendo indicadores de pH como azul victoria, azul Nilo, azul noche y azul sulfato que cambian de color por la acidificación del medio, permitiendo así una visualización más precisa de la zona de hidrólisis [37,38]. No obstante, la adición de estos indicadores también puede llevar a interpretar falsos positivos, puesto que la acidificación puede ser derivada de la producción de ácidos orgánicos en lugar de ácidos grasos, además que pueden resultar tóxicos para las células. Por lo anterior, se prefiere añadir colorantes fluorescentes como la rodamina B, en medios emulsificados con aceite de oliva, que forman un complejo fluorescente color naranja con los ácidos grasos liberados que en presencia de luz ultravioleta (UV) [38].

## **2.9. Métodos volumétricos**

La cuantificación de la actividad lipolítica se realiza a partir de la titulación de los ácidos grasos liberados con NaOH 0.1M en una emulsión con triacilglicerol. Estos métodos se emplean comúnmente para la evaluación de lipasas y de la activación interfacial, por lo que requieren que la emulsión permanezca homogénea para la formación de la interfase. Es por esto, que comúnmente se homogeniza la emulsión por sonicación periódica y se emplean compuestos como la goma arábiga que permiten mejorar la estabilidad y sensibilidad del ensayo. A pesar de que son técnicas sensibles y económicas son demandantes y complejas de reproducir, ya que los ácidos grasos deben pasar un estado de ionización después de liberarse [35,39].

## **2.10. Métodos colorimétricos**

En estos métodos, la actividad lipolítica se determina a partir de un sustrato, el cual al ser hidrolizado libera un producto cromógeno que se cuantifica por espectrofotometría, de tal manera que el incremento en la absorbancia es proporcional a la cantidad de producto liberado. Generalmente, para la evaluación de enzimas lipolíticas de extractos bacterianos se utiliza la técnica de *p*-nitrofenil ésteres, utilizando sustratos con cadenas carbonadas de diferentes longitudes, que al hidrolizarse liberan *p*-nitrofenol, el cual emite un color amarillo que se puede monitorear por la lectura de la absorbancia a 405nm o 410nm. La actividad enzimática se expresa como la cantidad de  $\mu\text{mol}$  de *p*-nitrofenol liberados por minuto. Aunque esta técnica presenta ventajas como su rapidez y sensibilidad, existe un inconveniente, relacionado con la auto hidrólisis de sustrato por cambios de temperatura o exposición de la luz [35,40-41].

Debido a esto, es necesario ajustar las condiciones de ensayo que incluyen: empleo de soluciones stock de sustratos de cadenas de diferentes longitudes en concentraciones de 100 a 250 mM, que generalmente se disuelven en solventes orgánicos como el cloruro de metileno, acetonitrilo o isopropanol que se mezclaran con diferentes tipos de buffers como Tris-HCl o fosfatos a pH neutro o alcalino. Esto es especialmente importante para el caso de las lipasas bacterianas. Así mismo, se pueden incluir emulsificantes como Triton X-100 para solubilizar sustratos de cadenas largas entre otros [40, 42-43].

### **2.11. Aplicaciones de las enzimas lipolíticas de microorganismos psicrófilos**

El impacto de los microorganismos psicrófilos ha despertado un interés particular en la industria, debido a la diversidad de metabolitos y enzimas producidas y a sus propiedades distintivas. Algunas de las aplicaciones de las enzimas y metabolitos producidos por microorganismos psicrófilos se encuentran en el área de la biorremediación de suelos y aguas frías contaminadas, la producción de probióticos y el diseño de detergentes entre otras [32].

Es por estas razones, que las enzimas lipolíticas de microorganismos psicrófilos se han destacado en el mercado global por tener estabilidad en presencia de solventes orgánicos, selectividad de sustratos e hidrolizar lípidos sin adición de cofactores costosos. Debido a propiedades como la regioselectividad, se usan en tecnología de alimentos para producir lácteos, modificar grasas como lípidos con propiedades distintivas ya sean grasas altas o bajas en calorías y aditivos alimentarios [26, 32, 44-45]. Por otra parte, en la industria de detergentes las carboxilesterasas se destacan por ser estables a bajas temperaturas y pH alcalino [44, 46-47].

Con base en la propiedad de enantioselectividad, las lipasas son empleadas en la industria farmacéutica para producir enantiómeros específicos en mezclas racémicas. También se destaca su uso en la industria cosmética y de perfumes y para la producción de tensioactivos [26,45-47]. Recientemente, han tenido un gran impacto en la producción de biodiesel ya que en su composición incluyen ésteres metílicos, los cuales se producen por esterificación enzimática a bajas temperaturas [46].

### **2.12. Bioprospección de microorganismos de ambientes fríos productores de enzimas lipolíticas**

Para la búsqueda de enzimas lipolíticas microbianas en ambientes fríos, se han empleado dos tipos de aproximaciones, que son las no dependientes de cultivo y dependientes de cultivo. La primera consiste en la creación de librerías metagenómicas de comunidades microbianas y secuenciación del ADN, para la selección de genes codificantes de enzimas lipolíticas y su posterior expresión por sistemas heterólogos. A partir de esta estrategia se han caracterizado diferentes tipos de enzimas lipolíticas microbianas de diversos ambientes como: esterasas provenientes de esponjas marinas en aguas costeras, lodos de biogás y suelo de permafrost [48,49,50]. Así como fosfolipasas aisladas de sedimentos marinos del ártico, suelos de páramo, super páramos y bosques altoandinos [51,52,11,53].

Por otro lado, la aproximación por métodos dependientes de cultivo consiste en el aislamiento y selección de microorganismos lipolíticos por técnicas de microbiología clásica. Por medio de esta estrategia se han caracterizado enzimas lipolíticas adaptadas al frío de microorganismos provenientes de diferentes ambientes como: *Pseudomonas*, *Pseudoalteromonas* y *Rhodococcus* aislados del suelo y mar antártico; *Glaciozyma antarctica* aislada de hielo marino [54-75]; *Psychrobacter celer* y *Halocynthobacter articus* en sedimentos marinos [58,59]. Sin embargo, también se han caracterizado enzimas producidas por el microorganismo nativo como: *Pseudomonas fluorescens* y *Aeromonas* aisladas de sedimentos marinos o *Bacillus licheniformis* y *Stenotrophomonas* aisladas de ambientes contaminados con aceites [60-63]. Generalmente, estas enzimas se han caracterizado por presentar mayor actividad a bajas temperaturas, termoestabilidad entre 40 y 50°C y estabilidad a pH básicos.

### 2.13. *Stenotrophomonas rhizophila*

*Stenotrophomonas rhizophila* es una bacteria aeróbica con morfología de bacilos cortos Gram negativos que hace parte del género *Stenotrophomonas* y de la familia *Xanthomonadaceae* que generalmente están asociadas como bacterias endófitas en la rizosfera del suelo. Entre sus principales características fisiológicas, se distingue por crecer en rangos de temperatura entre 4-30°C y en altas concentraciones de sal, debido a la producción de osmolitos como trehalosa, glucosil glicerol y prolina que le permiten mantener el balance osmótico intracelular; bioquímicamente se caracteriza por utilizar la xilosa como fuente de carbono, hidrolizar la esculina, reducir el nitrito y por presentar resistencia antimicrobiana contra eritromicina, gentamicina y novobiocina [64,65]

A nivel biotecnológico se han caracterizado cepas de esta especie como bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR) que se han utilizado para mejorar el crecimiento en cultivos de tomate, pepino y pino en altas concentraciones de NaCl [65,66,67]. Así mismo, se han caracterizado especies como parte del control biológico contra hongos fitopatógenos como: *Sclerotinia* y *Phoma* en *colza oleaginosa*; también contra *Fusarium acuminatum*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* y *Scutellariae botrytis* en *Glycyrrhiza uralensis* [68,69].

Con respecto a su potencial enzimático se han caracterizado cepas productoras de fosfato sintasas (EC 2.5.1.B41), fosfatasas (EC 3.1.3.23), quitinasas (EC 3.2.1.14), oxidasas (EC 1.12.1.1), D-manosa isomerasas (EC 5.3.1.7) y proteasas (EC 3.4) [70-75]. Sin embargo, solo existe un reporte sobre la producción de enzimas lipolíticas (EC 3.1.1.1). Estudios realizados por la Unidad de Saneamiento y Biotecnología Ambiental (USBA) permitieron el aislamiento de la cepa de *S. rhizophila* USBA GBX-843A a partir de suelo de glaciar que se caracterizó por producir enzimas lipolíticas que presentaron temperatura óptima a 50°C y pH óptimo a 8.0 y crecimiento en medios con sustratos lipídicos de cadena corta (*p*NP-4) [8].

#### **2.14. Condiciones de cultivo para la producción de enzimas lipolíticas**

La producción de enzimas lipolíticas microbianas está influenciada principalmente por diferentes factores nutricionales como: fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno y iones metálicos [76,47,77]. Con respecto a la fuente de Carbono, la adición de fuentes lipídicas como aceites, triacilgliceroles, ésteres y tween, son los factores más influyentes para la producción, puesto que al ser enzimas inducibles requieren de estos compuestos como inductores [78,79]. Sin embargo, son necesarias otras fuentes para el crecimiento como azúcares, alcoholes o polisacáridos [80]. Por otro lado, fuentes de nitrógeno orgánicas como el extracto de levadura y la peptona, solas o en combinación, han incrementado la producción de las enzimas, así como fuentes inorgánicas como cloruro de amonio, molibdato de amonio y fosfato diamónico [80-83]. De otra parte, cationes divalentes como  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{Mg}^{+2}$  pueden estimular o disminuir la secreción y producción de las enzimas y otros tipos de sales inorgánicas o minerales pueden influir en la asimilación de las fuentes de nitrógeno para la producción [83,84].

Factores fisicoquímicos como: la temperatura, pH, velocidad de agitación también influyen el crecimiento de los microorganismos para la producción de enzimas lipolíticas. La temperatura de crecimiento y el pH son factores claves para la producción y secreción de las enzimas. En el caso de las bacterias, la mayor producción se obtiene en valores de pH neutro o alcalino [85,86]. Finalmente, la velocidad de agitación en el medio permite aumentar la transferencia de oxígeno disuelto y dispersar las micelas de los inductores lipídicos para facilitar su contacto con los microorganismos [87,88].

#### **2.15. Estrategias de optimización de medios de cultivo para la producción de enzimas lipolíticas**

Para determinar los factores de cultivo que favorecen la producción de enzimas lipolíticas por los microorganismos, se han llevado a cabo diferentes estrategias experimentales, como diseños factoriales, diseños factoriales recortados (Plackett-Burman) y “One Variable at Time”. Posteriormente, los efectos que influyen en la producción de enzimas lipolíticas son optimizados a la concentración que permita la máxima producción enzimática implementando metodologías como diseño central compuesto o superficie de respuesta [89-102]. Estudios realizados en *Moritella* sp., determinaron por ejemplo que la producción de enzimas lipolíticas se vio influenciada por factores como el tween 80, harina de soya y temperaturas bajas [89].

Por otra parte, en estudios de optimización para *Pseudomonas* Lip 35, se determinó que la producción de enzima lipolítica fue influenciada por factores como: NaCl, Tween 80 e iones  $\text{Ca}^{2+}$ . Del mismo modo, en estudios realizados en *Pseudomonas* spp. MG687270 los factores influyentes para la producción estuvieron relacionados con la glucosa, nitrato de amonio, triptona, extracto de levadura y tween 80. Así mismo, las fuentes de nitrógeno orgánico influyeron negativamente inhibiendo la secreción de lipasas [90,91]. Cabe señalar que en estudios realizados para *Psychrobacter* sp., se demostró efecto significativo en factores como glucosa, extracto de levadura, citrato férrico, NaCl,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{NaHCO}_3$ , KBr y oligoelementos [92].

Otros estudios de optimización han permitido identificar los factores que tienen un efecto significativo en la producción de enzimas lipolíticas, entre los que se encuentran las sales minerales ( $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), fuentes de nitrógeno como  $\text{NH}_4$ , caseína, extracto de levadura y peptona. En cuanto a las fuentes de carbono, se ha reportado que fuente como maltosa, almidón, lactosa, manosa y galactosa han presentado efecto negativo en la producción al causar represión catabólica en diferentes microorganismos como *Halomonas* sp., *Bacillus* sp., *Pseudomonas gessardii*, *B. licheniformis*, *S. maltophilia*, *B. subtilis*, *Burkholderia* sp., entre otros [93-100].

Los escasos estudios de optimización para la producción de enzimas lipolíticas en *Stenotrophomonas* sp, han determinado como factores influyentes: fuentes de carbono e inductores como la glucosa y el aceite de oliva, fuentes de nitrógeno orgánico como la peptona y el extracto de levadura, sales de iones divalentes como el  $\text{Fe}^{+2}$  y el  $\text{Ca}^{+2}$  y la velocidad de agitación (RPM) [101,102]. En el caso de *S. rhizophila*, no se han realizado estudios de optimización de las condiciones de cultivo para la producción de enzimas lipolíticas, siendo este el primer estudio para esta especie.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo general

Determinar las condiciones de cultivo de *Stenotrophomonas rhizophila* USBA GBX-843A para la producción de enzimas lipolíticas.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Determinar la cinética de crecimiento de *S. rhizophila* USBA GBX-843A en dos condiciones de temperatura.
- Determinar la actividad lipolítica extracelular de *S. rhizophila* USBA GBX-843A en dos condiciones de temperatura
- Identificar las variables de cultivo de *S. rhizophila* USBA GBX-843A que permitan una mayor producción de enzimas lipolíticas por medio de un diseño “Plackett-Burman”.

### 4. METODOLOGÍA

#### 4.1. *Stenotrophomonas rhizophila* USBA GBX-843A

Es una bacteria psicrófila aerobia aislada de suelo del glaciar Nevado de Ruiz, del Parque Nacional Natural los Nevados (PNN), El suelo del que fue aislada la cepa, se encontraba a una temperatura promedio de  $4.4^\circ\text{C}$  y pH de 4.0. La identidad taxonómica de la cepa, basada en el análisis de la secuencia 16S rDNA, fue realizada en un trabajo previo [8].

## **4.2. Reactivación de la cepa y preparación banco primario y de trabajo**

La reactivación de la cepa se realizó a partir de un vial conservado en glicerol al 30% a  $-80^{\circ}\text{C}$  que fue descongelado lentamente en una cubeta con hielo en escarcha. Posteriormente, se realizó una siembra por aislamiento en agar nutritivo, que fue incubada durante 72 horas a  $25^{\circ}\text{C}$ . Una vez se observó crecimiento, se evaluó la pureza del microorganismo mediante coloración de Gram [103]. Una vez verificada la pureza, se tomaron colonias aisladas en el agar nutritivo, para realizar nuevamente un aislamiento en cajas de agar Luria Bertani (LBA), agar nutritivo (NA) y agar Tripticasa Soya (TSA), que se incubaron durante 48 horas a  $25^{\circ}\text{C}$ , con el fin de determinar el medio en el que se observa una mejor formación de las colonias, para los ensayos posteriores.

Para la preparación de los bancos de células, se tomaron colonias aisladas en agar LB en un tubo con 4 mL de NaCl al 0,85% hasta alcanzar el patrón 1 de Mcfarland ( $3 \times 10^8$  células /mL). Luego, se tomaron los 4 mL de la suspensión para inocular al 10% un frasco schott de 250 mL con 36 mL de caldo Luria Bertani incubado a  $25^{\circ}\text{C}$  en agitación a 150 rpm hasta alcanzar una DO de 0.6 a 600 nm. Tras alcanzar la DO esperada, aproximadamente 12 horas de incubación, se tomaron 32 mL del cultivo que se mezclaron con 8 mL de glicerol al 50% para servir alícuotas de 1 mL en tubos eppendorf, con lo cual se obtuvo un total de 36 viales, que fueron distribuidos de la siguiente manera: 20 tubos para la conformación del banco de células de trabajo (BCT) conservado a  $-20^{\circ}\text{C}$  y 16 viales para la conformación del banco de células primario (BCP) que fueron almacenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  [104].

## **4.3. Confirmación de la actividad lipolítica de la cepa *S. rhizophila***

La determinación de la actividad lipolítica confirmativa del microorganismo se realizó por el ensayo difusión en discos de papel filtro por triplicado, empleando cajas de agar LB emulsificadas con 1% de tributirina, 1% de gliceril trioctanoato, 1% de trioleina y 1% de aceite de oliva [105]. Para esto, en primer lugar se realizó la reactivación de la cepa tomando un vial del BCT a  $-20^{\circ}\text{C}$  que se descongeló a temperatura ambiente y se realizó un aislamiento en una caja de agar LB que se incubó durante 24 horas a  $25^{\circ}\text{C}$ . Completado este tiempo, se tomaron colonias aisladas en un tubo con 5mL de NaCl al 0,85% hasta alcanzar el patrón 1 de Mcfarland ( $3 \times 10^8$  células/mL); posteriormente, se tomaron 5 mL del tubo para inocular al 10% un schott de 250 mL con 45 mL de caldo LB que se incubó en agitación a 150 rpm a  $25^{\circ}\text{C}$  hasta alcanzar una DO de 0.6 . Posteriormente, se inocularon 10 uL del cultivo sobre discos de papel filtro, se colocaron tres discos por cada caja y se incubaron durante 72 horas a  $25^{\circ}\text{C}$ . Segudamente, se incubaron a  $4^{\circ}\text{C}$  hasta obtener la mayor zona de hidrólisis [106]. Adicionalmente, se determinó la actividad lipolítica semicuantitativa empleando el programa ImageJ, a partir de la medición de la zona de hidrólisis. Para esto, se midió de forma axial el crecimiento microbiano el cual se restó a la medición axial correspondiente al halo de hidrólisis, el valor obtenido, corresponde a la actividad lipolítica semicuantitativa.

#### **4.4. Determinación de la temperatura adecuada para el crecimiento de *S. rhizophila* y producción de enzimas lipolíticas**

Para determinar la temperatura que favorece la generación de biomasa y la producción de enzimas lipolíticas, se evaluó la cinética del crecimiento de *S.rhizophila* a 15°C y 25°C respectivamente y se determinó la actividad lipolítica en el tiempo.

En primer lugar, se realizó la reactivación de *S. rhizophila* y se preparó la suspensión celular como se explicó en el apartado anterior. Posteriormente, para la preparación del inóculo se tomaron 5 mL de la suspensión para inocular 95 mL de caldo LB y se incubó a 25°C en agitación a 150 rpm hasta alcanzar DO de 0.6. Después, se inocularon al 5% los medios de producción de biomasa (95mL caldo LB) y los medios para determinación de actividad lipolítica (94 mL caldo LB +1% tributirina) en cada temperatura. Posteriormente, se incubaron los cultivos a 15°C y 25°C en agitación a 150 rpm y se tomaron muestras cada 4 horas durante 48 horas para los cultivos a 25°C y 160 horas para los cultivos a 15°C [92,96].

Para la determinación de la biomasa, se tomó 1 mL en cada tiempo de muestreo por cada réplica y se registró la DO a 600 nm. Para cuantificar la producción de biomasa total se realizó una curva patrón de peso seco (**Anexo 1**).

#### **4.5. Determinación de la actividad lipolítica, durante el crecimiento de *S. rhizophila* en las dos temperaturas**

La determinación de la actividad lipolítica se realizó por la técnica *p*-nitrofenil éster (*p*NP-éster) [106,107]. Para esto, inicialmente se obtuvieron las fracciones extracelulares de cada tiempo de muestreo, tomando 1mL de cada réplica y centrifugando a 10.000g durante 10 minutos para recuperar el sobrenadante en donde se encuentra la enzima activa. Posteriormente, se tomaron 10 µL de cada fracción en 240 µL de buffer de reacción (0,5 mM *p*NP-butirato y 50 mM buffer Tris-HCl pH 8.0) para un volumen final de 250 µL. El ensayo enzimático cuantitativo, se realizó en microplacas de ELISA incubando las mezclas de reacción a 60°C durante 30 minutos y la lectura se realizó en un lector de microplaca a 405 nm [107]. La unidad enzimática se definió como la cantidad de enzima para liberar 1 µmol de *p*NP por minuto en las condiciones del ensayo. Para la cuantificación de *p*NP liberado, se realizó una curva de calibración de *p*-nitrofenol (**Anexo 2**).

#### **4.6. Análisis de los factores de cultivo de *S. rhizophila* USBA-GBX 843A para la producción de enzimas lipolíticas**

##### **Diseño experimental**

En la determinación de los factores que influyeron en el crecimiento y en la producción de enzimas lipolíticas de *S. rhizophila*, se realizó un diseño Plackett-Burman [108]. En el cual se

evaluó la influencia de 11 componentes a un nivel bajo (-1) y alto (+1), los cuales fueron : Glucosa (X1; -1:2.5, +1:10 g/L), tributirina (X2; -1: 1, +1:2 v/v), Tween 80 (X3: -1:0.2, +1:0.6 g/L), extracto de levadura (X4; -1:3, +1:6 g/L), peptona (X5; -1:2, +1:6 g/L), NH<sub>4</sub>Cl (X6; -1:0.5, +1:2.5 g/L), NaCl (X7; -1:1, +1:10 g/L), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (X8; -1:0.3, +1:2 g/L), FeSO<sub>4</sub> (X9; -1:0.3, +1:0.8 g/L), MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (X10; -1:0.3, +1:0.8 g/L) y velocidad de agitación (X11; -1: 0, +1: 150 rpm) [108-111]. El número de diseños experimentales se determinó por el paquete de software estadístico design-expert (Stat Ease., Minneapolis, MN, USA).

Debido a que el modelo obtenido no fue significativo, con los factores evaluados, se realizó un segundo diseño Plackett-Burman evaluando el efecto de 9 componentes a 3 niveles, que corresponden a: Glucosa (X1; -1:2.5, 0:6.25 ,+1:10 g/L), tributirina (X2; -1: 1, 0:1.5 ,+1:2 v/v), Tween 80 (X3: -1:0.2, 0:0.4 ,+1:0.6 g/L), peptona (X5; -1:2, 0:4 ,+1:6 g/L), NH<sub>4</sub>Cl (X6; -1:0.5, 0:1.5 ,+1:2.5 g/L), NaCl (X7; -1:1, 0:5.5 , +1:10 g/L), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (X8; -1:0.3, 0:1.15 ,+1:2 g/L), FeSO<sub>4</sub> (X9; -1:0.3, 0:0.55, +1:0.8 g/L), MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (X10; -1:0.3, 0:0.55, +1:0.8 g/L).

Para el desarrollo del Plackett-Burman, inicialmente se preparó una suspensión, tal y como se indicó anteriormente, de la cual se inoculó 5 mL en un frasco schott de 1L con 125mL de caldo Luria Bertani que se incubó a 25°C en agitación a 150 rpm, hasta alcanzar una DO de 0.6. Posteriormente se procedió a inocular 5 mL del inóculo en 95mL de los medios de producción que fueron incubados a 15°C. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y la actividad lipolítica se midió a las 40 horas por las técnicas *p*-nitrofenil ésteres siguiendo las condiciones de ensayo, anteriormente mencionadas.

#### **4.7. Análisis estadístico**

En cuanto a la evaluación de las variables de cultivo para producción de lipasas se realizó un ANOVA y una regresión multivariados estableciendo el efecto por separado y el efecto de interacción de las variables en el programa Design Expert [109,110, 111].

#### **4.8. Determinación de preferencia de sustrato**

A partir de las fracciones enzimáticas obtenidas a las 40 horas en la cinética de 15°C se evaluó la preferencia por sustrato, mediante la técnica de *p*-nitrofenil ésteres, empleando un panel de sustratos de diferentes longitudes de cadenas carbonadas: *p*-nitrofenil butirato (C4), *p*-nitrofenil octanoato (C8), *p*-nitrofenil decanoato (C10) y *p*-nitrofenil palmitato (C16) a 0.5mM. Para esto se mezclaron 10 µL de cada extracto con 215 µL de cada sustrato y 25 µL de buffer Tris-HCl (8.0) 50mM. Los ensayos se incubaron a 50°C durante 30 minutos y la lectura se realizó en un lector de microplacas a 405 nm [107].

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Reactivación de la cepa y preparación de bancos

Después de evaluar los diferentes medios de cultivo, se pudo determinar que la cepa de *S. rhizophila*, presentó el mejor crecimiento en medio LBA (Agar Luria Bertani) a 25 C y 72 horas de incubación. Bajo esas condiciones, se presentó la formación de colonias puntiformes cremosas, características de esta especie. Microscópicamente, corresponde a bacilos cortos Gram negativos, consistente con la morfología descrita para *S. rhizophila*. Por lo anterior, se seleccionó el medio LB para la reactivación de la cepa y ensayos posteriores.

### 5.2. Confirmación de la actividad lipolítica *S. rhizophila* USBA GBX-843A

Después de 72 horas de incubación a 25°C y 96 horas a 4°C, se observó que en los medios suplementados con tributirina al 1%, los halos de hidrólisis presentaron el mayor tamaño con  $11.33 \pm 0.13$  mm de diámetro, seguido de los medios con gliceril trioctanoato al 1%, con halos de hidrólisis de  $7.48 \pm 0.30$  mm de diámetro (**Tabla 1**). En los medios suplementados con aceite de oliva y trioleína al 1% no se formaron halos de hidrólisis. Con relación al crecimiento microbiano, curiosamente se observó que fue mayor, superando inclusive el diámetro del disco, en los medios suplementados con trioleína, seguido de los medios con gliceril trioctanoato, los medios suplementados con tributirina y finalmente los medios suplementados con aceite de oliva. De otra parte, después de pasar las cajas de 25°C a 4°C, se presentó un aumento en el tamaño de los halos de hidrólisis.

**Tabla 1.** Actividad lipolítica confirmativa de *S. rhizophila* USBA GBX-843A

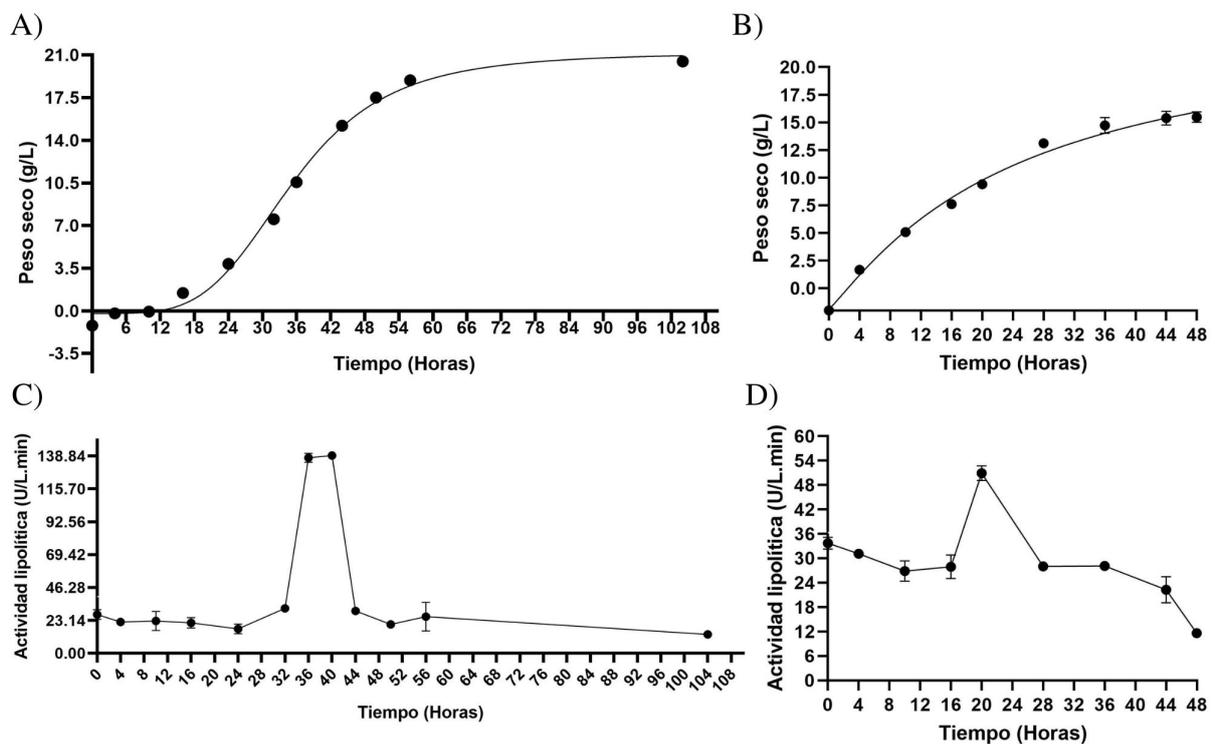
	Gráfico	Hidrólisis (mm)	SD	CV (%)
Agar LB + tributirina 1%		11.33	0.13	1.15%
Agar LB + aceite de oliva 1%		0	No aplica	No aplica
Agar LB + trioctanoato 1%		7.48	0.30	4.01%
Agar LB + trioleína 1%		0	No aplica	No aplica

### 5.3. Determinación de la temperatura de crecimiento de *S. rhizophila* USBA GBX-843A para la producción de enzimas lipolíticas

En cuanto a la cinética de crecimiento, evaluada a 15°C, se evidenció una fase de adaptación durante las primeras 16 horas; mientras que la fase exponencial se observó entre las 16 y las 56 horas aproximadamente, seguida de la fase estacionaria (**Figura 1A**). Por otra parte, en la cinética de crecimiento a 25°C, no se evidenció la fase de adaptación, de tal modo que la fase exponencial se desarrolló hasta las 44 horas (**Figura 1B**). Comparando el crecimiento de *S. rhizophila* en las dos temperaturas, a 25°C la producción de biomasa total fue más rápida que a 15°C. Sin embargo, a 15°C se obtuvo una mayor producción.

Con respecto a la evaluación de la actividad lipolítica en el tiempo, a 15 °C la actividad se mantuvo en un rango entre 20-27 U/L.min durante las primeras 24 horas. Posteriormente, a las

32 horas la actividad incrementó hasta 32 U/L.min. Después, entre las 36 y 40 horas se presentó la mayor actividad lipolítica con 137,5 y 139,09 U/L.min respectivamente (**Figura 1C**). La actividad lipolítica inicial a 25 °C se determinó en 33 U/L.min y disminuyó en 6.83 U/L.min durante a las 10 horas. La mayor actividad se determinó a las 20 horas con 50,92 U/L.min a las 20 horas (**Figura 1D**). Estos resultados permitieron concluir que la mayor actividad se presenta cerca del final de la fase exponencial a 15°C y cerca de la mitad de la fase exponencial a 25 °C, soportando la hipótesis que la producción y secreción de las enzimas lipolíticas de *S. rhizophila* están asociadas al crecimiento. Comparando la actividad lipolítica entre las dos temperaturas, se observó que, a 15 °C, la actividad lipolítica es más del doble en comparación con la actividad a 25 °C, aunque en el doble del tiempo. La actividad enzimática posterior a los tiempos donde se registró la máxima actividad tiene un comportamiento similar en las dos condiciones, aun cuando los valores fueron ligeramente superiores en la cinética a 25 °C (**Figura 1C y D**).



**Figura 1.** (A) Cinética de crecimiento a 15 °C. (B) Cinética de crecimiento a 25 °C. (C) Actividad lipolítica a 15 °C. (D) Actividad lipolítica a 25 °C.

La productividad máxima de la biomasa ( $Q_x$ ) producida a 15°C fue de  $0,360 \text{ g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$ , mientras que a 25 °C fue de  $0,362 \text{ g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$ , indicando una producción similar en ambos casos. Por otro lado, la productividad máxima de la actividad lipolítica ( $Q_p$ ) para la cinética de 15 °C fue de  $2,797 \text{ U.L}^{-1}\text{h}^{-1}$ , mientras que para 25 °C fue de  $0,861 \text{ U.L}^{-1}\text{h}^{-1}$ , indicando que a 15 °C se obtuvo tres veces más actividad que a 25 °C, en el doble de tiempo (**Tabla 2**).

**Tabla 2.** Productividad máxima de biomasa ( $Q_x$ ) y actividad lipolítica ( $Q_p$ ) a 15 °C y 25 °C

Temperatura	Productividad biomasa	Productividad actividad lipolítica
	$Q_x$ (g.L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	$Q_p$ (U.L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )
15 °C	0,360	2,797
25 °C	0,362	0,861

#### 5.4. Análisis de los factores de cultivo de *S. rhizophila* USBA-GBX 843A para la producción de enzimas lipolíticas

El análisis estadístico que incluyó los 11 factores del primer diseño denominado como Plackett-Burman A (**Anexo 3**), mostró que no se cumplió el modelo. Los factores que no permitieron que el modelo se ajustara a la regresión, fueron la agitación y el extracto de levadura. El análisis estadístico, eliminando estos dos factores, mostró que el modelo se cumplía, razón por la cual, se realizó un segundo diseño, denominado Plackett-Burman B (**Anexo 4**) eliminando los factores que pudieran presentar alguna fuente de variación adicional, con el fin de determinar las condiciones de optimización. En un segundo análisis estadístico, se obtuvo un  $R^2$  del 0.49, indicando nuevamente que el modelo no se cumplía (**Tabla 3**). Sin embargo, factores como el  $NH_4Cl$  y la peptona fueron factores significativos.

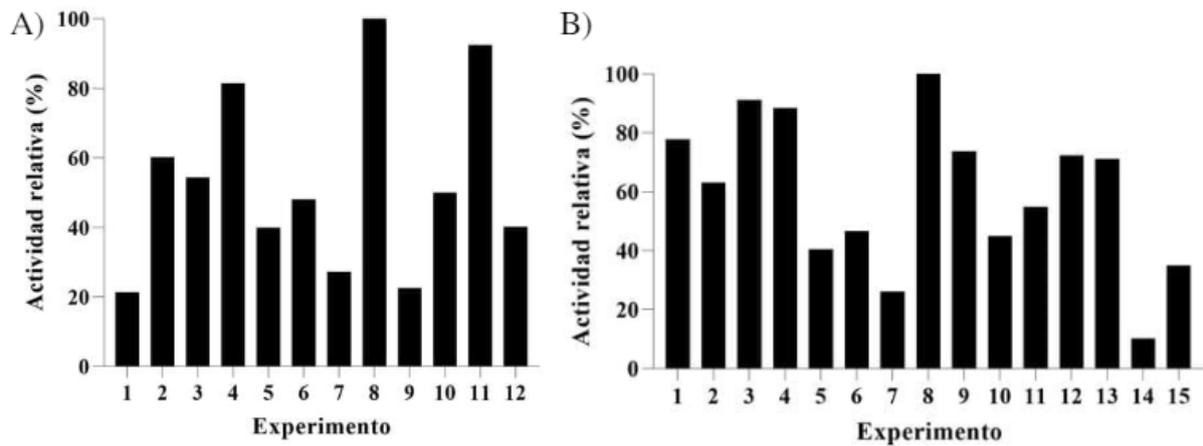
**Tabla 3.** Determinación de significancia de los modelos de los diseños experimentales. Plackett-Burman A (11 factores). Plackett-Burman B (9 factores).

<sup>a</sup> Significancia del 95%.

	Plackett-Burman A	Plackett-Burman B
<b>P-value</b>	No se ajustó a un modelo.	0.16 <sup>a</sup>
<b>F-value</b>	No se ajustó a un modelo.	2.82
<b>R<sup>2</sup> ajustado</b>	No se ajustó a un modelo.	0.49

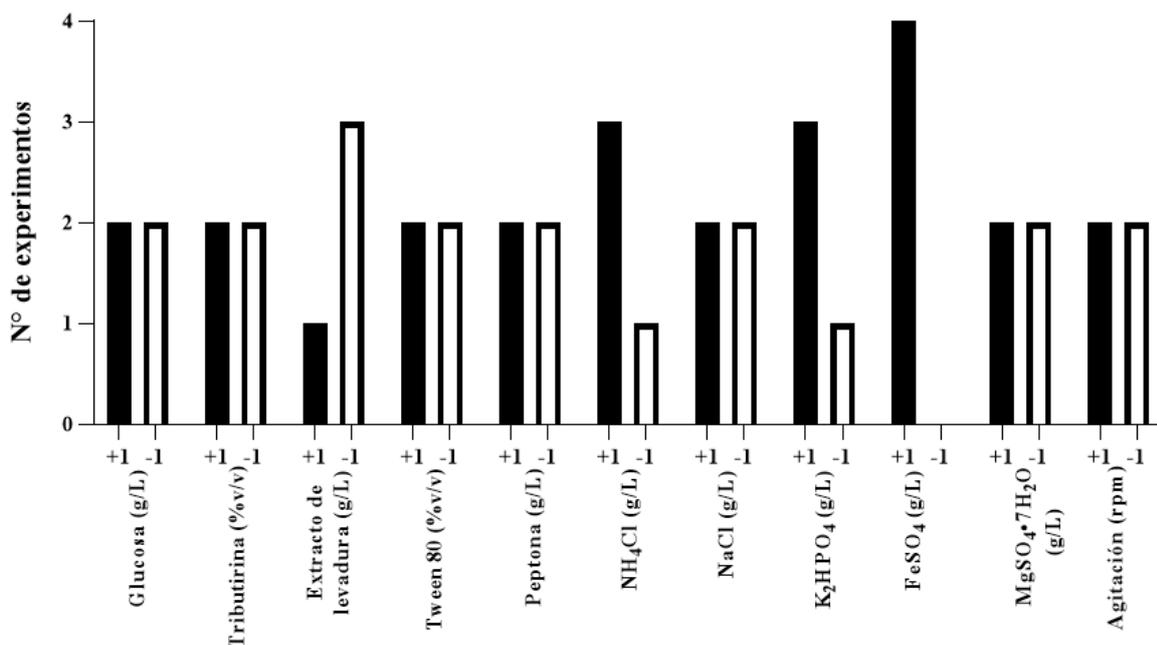
Con relación a las actividades relativas del primer diseño experimental, se observó que 4 experimentos presentaron un rango de actividad relativa entre el 100-60%, mientras que 4 experimentos presentaron rangos de actividad entre el 55-40% y los 4 experimentos restantes en rangos entre 39 y 20% (**Figura 2A**). Por otro lado, en el segundo diseño experimental 3

experimentos presentaron rangos de actividad mayores al 80%, mientras que 2 experimentos presentaron rangos entre el 80-45% y 4 experimentos entre el 40-10% (Figura 2B).



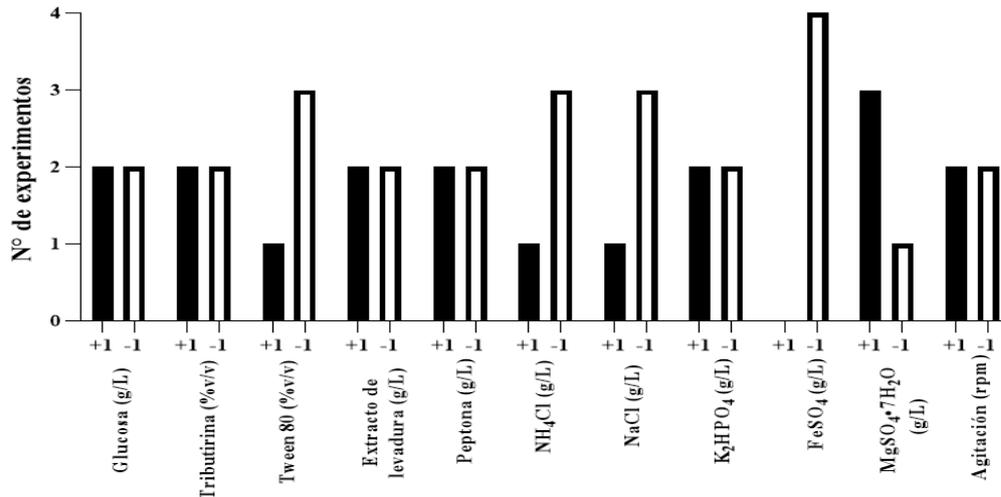
**Figura 2.** Actividad relativa lipolítica del Plackett-Burman. (A) Actividad lipolítica relativa Plackett-Burman A. (B) Actividad lipolítica relativa Plackett-Burman B.

Teniendo en cuenta los experimentos entre el 100-60% de actividad enzimática relativa, se observaron las tendencias para cada componente, con lo cual se identificó que ninguno de los experimentos presentó alguna tendencia en la selección de un nivel para las fuentes de carbono e inductores, tampoco para la peptona o sales como el NaCl y el MgSO<sub>4</sub> y la agitación. Mientras que con fuentes de nitrógeno como el extracto de levadura los experimentos presentaron tendencia por el nivel más bajo y tendencia por el nivel más alto en sales como el NH<sub>4</sub>Cl, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y FeSO<sub>4</sub> (Figura 3).



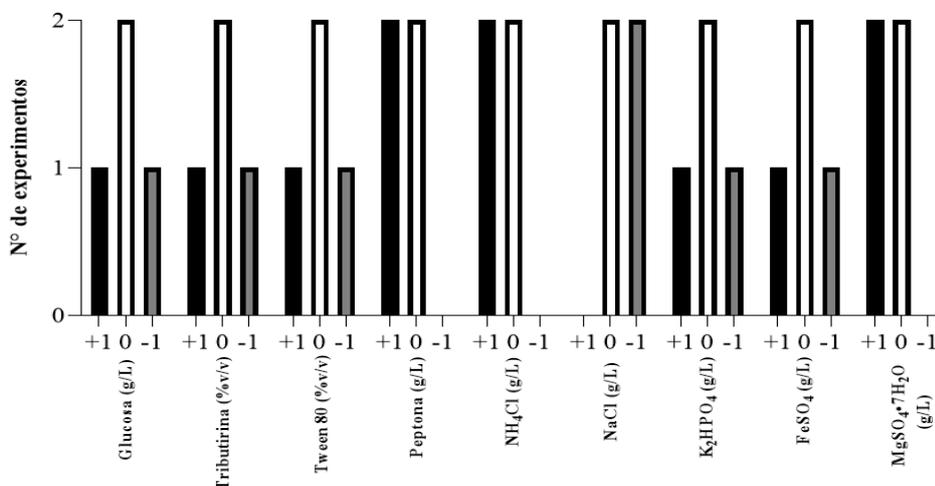
**Figura 3.** Número de experimentos por factores para actividades lipolíticas mayores respecto al Plackett-Burman A.

Con respecto a los experimentos que presentaron actividad enzimática relativa entre el 39-20%, no se presentaron tendencias en la glucosa, tributirina, extracto de levadura, peptona,  $K_2HPO_4$  y agitación. Sin embargo, se observaron tendencias para los niveles más bajos de Tween 80,  $NH_4Cl$ ,  $NaCl$  y  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  (Figura 4).



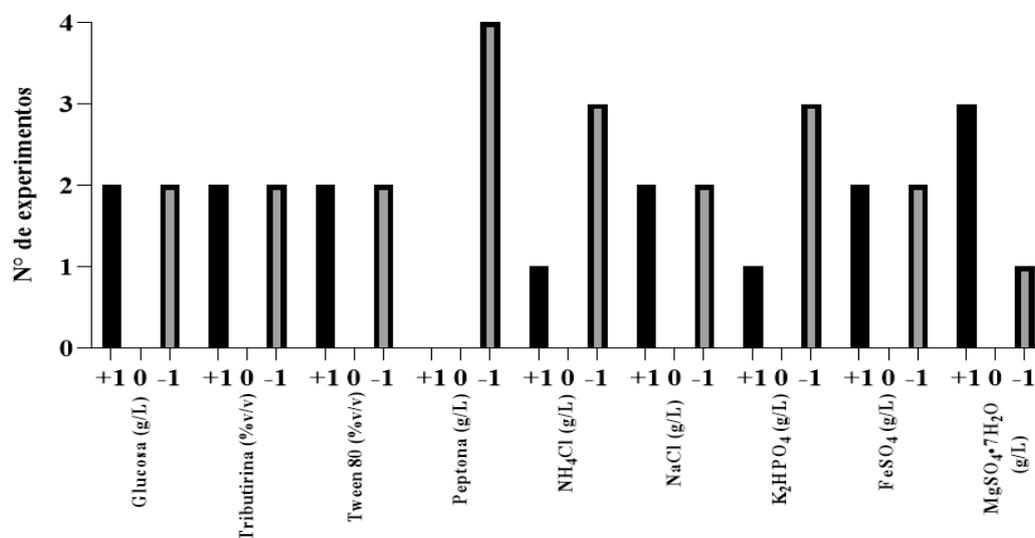
**Figura 4.** Número de experimentos por factores para actividades lipolíticas menores respecto al Plackett-Burman A.

Tal como se describió anteriormente, los experimentos con actividad enzimática relativa entre 100-60% referente al Plackett-Burman B, mostraron una tendencia en el nivel alto-intermedio para factores como peptona,  $NH_4Cl$  y  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , a diferencia del  $NaCl$  el cual mantuvo una tendencia baja-intermedia. Sin embargo, no se observó inclinación de la actividad hacia alguno en factores como glucosa, tributirina, tween 80,  $K_2HPO_4$  y  $FeSO_4$  manteniéndose en el nivel intermedio (Figura 5).



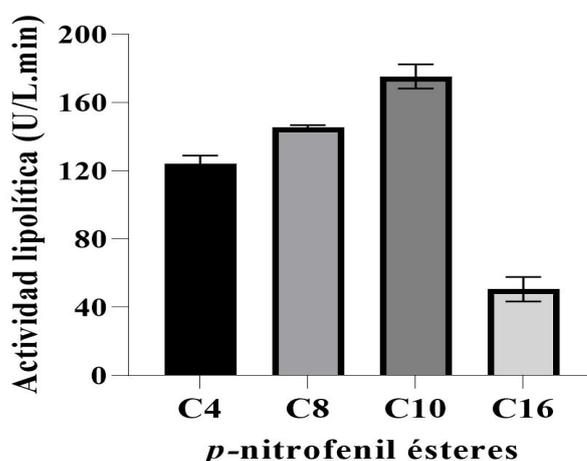
**Figura 5.** Número de experimentos por factores para actividades mayores respecto al Plackett-Burman B.

En cuanto a los experimentos que mostraron actividades enzimáticas relativas entre 40-10% en el Plackett-Burman B, se observó una tendencia por el nivel más bajo en las fuentes de nitrógeno como peptona y  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , y en sales como  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ . Aunque, se notó una tendencia para el nivel más alto en  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y no se evidenció una tendencia respecto a las fuentes de carbono como glucosa, tributirina y tween 80, ni en sales como  $\text{NaCl}$  y  $\text{FeSO}_4$  (Figura 6)



**Figura 6.** Número de experimentos por factores para actividades menores respecto al Plackett-Burman B.

El ensayo de preferencia de sustrato mostró que las enzimas lipolíticas de *S. rhizophila* presentaron preferencia por sustratos lipídicos de cadenas cortas y medianas, al presentarse la mayor actividad con *p*-nitrofenil palmitato (C10) con 175.322 U/L.min, seguido de *p*-nitrofenil octanoato (C8) con 145,478 U/L.min y *p*-nitrofenil butirato (C4) con 124.096 U/L.min. Por otra parte, la menor actividad se presentó empleando *p*-nitrofenil palmitato (C16) con 50.644 U/L.min (Figura 7).



**Figura 7.** Preferencia de sustrato de enzimas lipolíticas de *S. rhizophila* USBA GBX-843A

## 6. DISCUSIÓN

### 6.1. Actividad lipolítica confirmativa

La diferencia en los tamaños de los halos de hidrólisis de los medios suplementados con los diferentes sustratos (**Tabla 1**), se debió a la preferencia de las enzimas lipolíticas de *S. rhizophila* por sustratos lipídicos de cadenas cortas como la tributirina. Este resultado es consistente con lo reportado en trabajo previo, en el que se reporta el mayor tamaño de halos de hidrólisis en los medios suplementados con tributirina [8]. Por otra parte, el incremento de la actividad lipolítica a 4°C pudo deberse, a que un mayor tiempo de incubación a esta temperatura, permite que las adaptaciones propias del microorganismo favorezcan su crecimiento y secreción de las enzimas, mantenido sus tasas catalíticas. Lo anterior ha sido demostrado en ensayos similares, realizados con *Pseudomonas* sp, en los que la mayor hidrólisis se presentó en agar tributirina tras 72 horas de incubación a 4°C [87].

### 6.2. Cinética de crecimiento y actividad lipolítica

Las diferencias en el crecimiento de *S. rhizophila* a las diferentes temperaturas evaluadas se deben posiblemente a la respuesta fisiológica en cada condición. Observando los resultados de la cinética de crecimiento a 15°C y 25°C, se puede explicar, de forma preliminar, la respuesta a las diferentes adaptaciones y el contexto evolutivo del microorganismo en su ambiente natural y como podrían hacerse evidentes en condiciones de crecimiento más controladas. Esto se explica por la presencia de una fase de adaptación, durante las primeras 16 horas de crecimiento a 15°C, indicando el efecto, en esta etapa inicial, del cambio de temperatura tanto a nivel intracelular como a nivel de membrana. A nivel intracelular, la baja temperatura a la que se sometió el microorganismo pudo provocar la reducción de la transcripción y la traducción por el incremento de la estabilidad de la estructura secundaria del ADN/ARN, pero también la disminución de la cinética de plegamiento de proteínas [112]. Mientras que, a nivel de membrana, la respuesta pudo provocar un cambio de la fase fluida a la fase sólida en la composición inicial de los lípidos de membrana, disminuyendo así su fluidez y por ende la funcionalidad a diferencia de 25°C, donde la viabilidad celular, permitió, iniciar con el desarrollo de la fase exponencial [113]. Como respuesta a la baja temperatura, en las primeras horas de la fase de adaptación, la bacteria disminuyó la inducción de diferentes genes, para sobre expresar proteínas de aclimatación al hielo (CAPs) y proteínas de choque frío (CSP) que le permiten regular nuevamente los procesos celulares, para así poder poner de manifiesto otras adaptaciones, especialmente, aumentar la producción de ácidos grasos insaturados y poliinsaturados (PUFAs) para recuperar la fluidez de membrana y así poder ser metabólicamente activa [114,115]. El aumento en la proporción de ácidos grasos insaturados por saturados se ha reportado también en microorganismos como *Rhizobium leguminosarum*, *Vibrio*, *E.coli* y *Rhodococcus* a diferentes temperaturas [116-118].

Posteriormente, durante la fase exponencial, la bacteria presentó un crecimiento más rápido y producción de biomasa a 15°C que a 25°C, (**Figura 1**). Esto pudo deberse, a que en esta temperatura aumentó la actividad de las proteínas transportadoras de membrana, producidas

como parte de las adaptaciones, las cuales presentan una mayor afinidad por los sustratos en el ambiente debido a la falta de nutrientes. De esta forma, la baja temperatura y la alta disponibilidad de nutrientes en el medio de cultivo fueron más eficientes para la asimilación de los sustratos [113,118]. Por otra parte, los cálculos de la productividad máxima de biomasa ( $Q_x$ ) llevaron a entender el comportamiento del crecimiento en función de la producción de biomasa, de tal modo que a 25°C la  $Q_x$  se obtuvo en un menor tiempo, indicando que en esta temperatura se promovió el crecimiento más rápido, mientras que a 15°C la productividad se obtuvo en un mayor tiempo, y en una cantidad similar 2g/L respecto a 25°C, señalando que 15°C fue la temperatura óptima de crecimiento. Así mismo, las  $Q_x$  demostraron que los cambios de temperatura no afectaron el crecimiento, como se ha presentado en otros microorganismos psicrófilos, en los cuales el calor producido por el aumento de la temperatura afectó el crecimiento [119]. También, las  $Q_x$  demostraron que a 25°C se debe llevar a cabo la producción para la biomasa, puesto que se obtienen cantidades similares reduciendo costos de refrigeración y tiempo.

Con respecto a la actividad lipolítica, las diferencias entre las actividades máximas en las dos temperaturas se debieron a que el microorganismo presentó una mayor dependencia hacia la temperatura de 15°C para la producción de las enzimas lipolíticas extracelulares, indicando que, en rangos de temperatura mayores, la actividad puede ser reducida, como ocurrió a 25°C [120]. Las diferencias de actividad en estas temperaturas, también se ha reportado en microorganismos psicrófilos como *Psychrobacter* en tiempos similares [92]. Por otra parte, la productividad máxima del producto ( $Q_p$ ), permite suponer que, para la producción de esta enzima, en el contexto industrial, requiere considerar los costos del proceso, en términos de necesidades de refrigeración y tiempo.

### **6.3. Análisis de los factores de cultivo de *S. rhizophila* USBA GBX-843A para la producción de enzimas lipolíticas**

Los experimentos en los que se alcanzó la mayor actividad lipolítica para para ambos diseños (**Figura 3 y 5**), presentaron una mayor tendencia en su preparación por los niveles altos de fuentes de nitrógeno inorgánicas como el  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , indicando un posible efecto positivo que fue significativo en el incremento de la actividad lipolítica, esto pudo deberse a que este tipo de sales al componerse de cationes monovalentes hidratados débiles como el  $\text{NH}_4^+$  forman interacciones débiles con los aniones de  $\text{Cl}^-$  que al ser fáciles de romper, pudieron ser asimilables más fácilmente por el microorganismo para favorecer su crecimiento y por ende la inducción de las enzimas [122]. El efecto de las fuentes de nitrógeno inorgánico ha sido reportado anteriormente en otros estudios en los que se promovió una mayor actividad lipolítica, por adición de estas fuentes [91,94,95,123].

En relación con las fuentes de nitrógeno orgánicas, los diseños en los que se obtuvo mayor actividad lipolítica del Plackett-Burman A, se prepararon en mayor medida con los niveles más bajos de extracto de levadura, mientras que en lo experimentos con actividades más bajas con los niveles más altos (**Figura 3 y 4**). Esto podría explicarse desde la composición del extracto de levadura, puesto que su composición es más compleja y pudo haber requerido un mayor

gasto energético para la asimilación por el microorganismo, lo cual pudo haber afectado la producción enzimática [124]. Un efecto contrario se observó en fuentes como la peptona en el Plackett-Burman B, que se añadió en los niveles intermedios o altos para los experimentos que presentaron mayor actividad y además fue uno de los factores significativos del modelo (**Figura 5**). Esto pudo deberse a que la peptona, al ser una fuente de nitrógeno menos compleja, pudo facilitar su asimilación por parte del microorganismo, favoreciendo su crecimiento y la producción de enzimas lipolíticas [125]. Cabe señalar, que *S. Rhizophila*, en su ambiente natural, puede obtener aminoácidos similares a los de la peptona, que facilitan su asimilación. La influencia positiva de la peptona en la actividad lipolítica se ha reportado en estudios con *S. maltophilia*, *Bacillus* sp., y *Staphylococcus* sp. [102].

Con respecto a sales como el NaCl, en los experimentos que produjeron menores actividades lipolíticas en Plackett-Burman A, este componente se añadió en los menores niveles, mientras que en los experimentos con mayores actividades del Plackett-Burman B, se añadió en niveles intermedios o bajos (**Figura 4 y 5**). Estos resultados indican que el aumentar el nivel para este factor, puede provocar interacciones electrostáticas con las micelas del sustrato evitando la unión enzima-sustrato. Seguramente, altas concentraciones de NaCl en el medio de cultivo pueden afectar la secreción de la enzima al medio extracelular, tal y como se ha reportado para lipasas de *Pseudomonas* [90]. Respecto a este factor, es necesario evaluar de forma más precisa, su influencia en niveles intermedios a bajos.

Por otra parte, el  $K_2HPO_4$  se añadió en nivel alto o intermedio en los experimentos que presentaron mayores actividades enzimáticas tanto del Plackett-Burman A como del B (**Figura y 5**), indicando que este componente pudo haber influido particularmente en el crecimiento para favorecer la actividad. Lo anterior puede ser explicado por el hecho de que se trata de una fuente de fósforo esencial, necesario en procesos celulares como: la síntesis de cAMP, ácidos nucleicos y fosfolípidos, además de ser una fuente de potasio, necesaria para la osmorregulación y crecimiento microbiano [127,128]. Este resultado es consistente con las altas concentraciones de fósforo (94 ppm) y potasio (58 ppm) reportadas para el suelo de glaciar de donde fue aislada la cepa de *S. rhizophila* [8]. La concentración equivalente de estos elementos en el ambiente, sumado a las altas concentración de  $Fe^{3+}$  (385 ppm) se relaciona con los mayores valores de actividad obtenidos en los dos diseños.

En cuanto a las tendencias en los niveles más altos de  $MgSO_4$  para los experimentos más bajos del Plackett-Burman A y B, pudieron influenciar un efecto negativo en la producción de lipasas. Esto puede ser atribuido a una represión catabólica, que afecta la actividad enzimática o también, puede deberse a que los aniones afectan la disponibilidad de otras sales como  $FeSO_4$ , NaCl o  $NH_4Cl$  que pueden estar queladas, limitando la cantidad de enzima producida, de tal modo el  $MgSO_4$  ya no estaría disponible para funciones celulares reguladoras asociadas a la síntesis de ácidos nucleicos. (**Figura 4 y 6**) [90,128,129].

Por otra parte, en componentes como Tween 80 se observó que en los experimentos con las actividades más altas se añadió en un nivel intermedio para el caso del Plackett-Burman B y en los niveles más bajos de los experimentos con las concentraciones más altas para el Plackett-

Burman A, indicando un posible efecto positivo en concentraciones moderadas, esto se pudo atribuir a que facilitó la entrada de moléculas de agua y a que favorece la permeabilidad de la membrana a bajas temperaturas. La influencia positiva de este componente se ha presentado en estudios de optimización de otros microorganismos como en *Moritella* sp., *A. nidulans* y *P. stutzeri* (Figura 4 y 5) [89,130,131].

Finalmente, para el segundo Plackett-Burman, se fijó la velocidad de agitación a 150 rpm tal como se ha reportado para *S. Maltophilia*, por considerarse un factor de alta significancia, relacionado con la transferencia de oxígeno, masa y energía a las células, de este modo se descarta la posibilidad de que altos flujos en el cultivo pudieron causar ruptura o daño celular por la fuerza de cizalla [132]. Aun fijando este factor, el experimento no se ajustó a un modelo, lo que se atribuye a las concentraciones utilizadas de algunos componentes o que la cantidad de factores, causaron una sobreestimulación en el microorganismo, que no permitió evaluar la interacción de los componentes.

#### 6.4. Preferencia de sustrato

Las tendencias de actividades por la preferencia de sustratos entre (C4-C10) y las bajas actividades por sustratos de cadenas largas (C16), demostraron que las enzimas lipolíticas producidas por *S. rhizophila corresponden* posiblemente a carboxilesterasas (EC 3.1.1.1). También, se han presentado tendencias similares en carboxilesterasas de *S. maltophilia* y *Aeromonas* [8]. Igualmente, esta preferencia se puede explicar a la luz de los resultados del análisis genómico, que indica presencia de un mayor número de carboxilesterasas (25) frente al de lipasas (8), sugiriendo una mayor probabilidad de inducción de este tipo de enzimas [8].

Estas tendencias fueron mayores en comparación a los ensayos previos realizados a la misma temperatura por Palacio et al. [8], en los cuales, la mayor actividad lipolítica cualitativa se obtuvo sobre *p*-nitrofenil butirato (C4), siendo 15 veces mayor a la actividad obtenida en *p*-nitrofenil decanoato (C10). Estas diferencias se pudieron deber al pH de los buffers utilizados en cada trabajo, En este estudio, se evaluó la preferencia por sustrato en buffer Tris-HCl 50 mM a pH 8.0, reportado en otros trabajos como óptimo para determinar la actividad lipolítica. mientras que, en el trabajo de Palacios y colaboradores, se utilizó buffer Tris-HCl 0.1M a pH 7.0. Estas diferencias sugirieron que el pH 8.0, favoreció la producción y actividad de las enzimas lipolíticas de *Stenotrophomonas rhizophila* USBA GBX-843A frente a los sustratos de cadena corta y mediana, empleadas en este trabajo.

### 7. CONCLUSIONES

Los análisis de crecimiento y cálculo de productividades a las dos temperaturas evaluadas demostraron que 15°C es la temperatura óptima para el crecimiento y la producción de enzimas lipolíticas por *S. rhizophila* USBA GBX-843A.

A pesar de que en los diseños experimentales “Plackett-Burman”, no se pudo determinar las condiciones de cultivo que influyen en la actividad lipolítica, las tendencias en la adición de

componentes en diferentes niveles permiten sugerir que las fuentes de nitrógeno, como la peptona y el cloruro de amonio, y el  $\text{FeSO}_4$  influyen positivamente en la producción de enzimas lipolíticas; mientras que factores como el extracto de levadura y  $\text{MgSO}_4$ , influyen negativamente.

La formación de halos de hidrólisis en los medios suplementados con gliceril tributirato (tributirina) y gliceril trioctanoato, así como las mayores actividades cuantitativas con *p*-nitrofenil ésteres entre C4-C10, permiten concluir que las enzimas lipolíticas de *S. rhizophila* USBA GBX-843A presentan preferencia por sustratos lipídicos de cadenas cortas y medianas, indicando que puede tratarse de carboxilesterasas.

## 8. RECOMENDACIONES

Se sugiere evaluar la cinética de crecimiento a 15°C empleando medios con inductores lipídicos, para así poder determinar rendimientos de biomasa y producto.

Se recomienda hacer un diseño factorial, evaluando la tributirina como inductor y fuente de carbono, fuentes de nitrógeno como la peptona y  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y sales como  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4$  y  $\text{CaCl}_2$  (5 factores) teniendo como variables de respuesta la actividad lipolítica y el crecimiento microbiano.

También se sugiere normalizar la técnica *p*-nitrofenil ésteres evaluando la preferencia de sustrato a diferentes temperaturas y así determinar las condiciones de incubación de la reacción.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Enzymes Market Size & Share Report. Grand View Research, 2021. <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/enzymes-industry/toc>
2. Guerrand D. Lipases industrial applications: Focus on food and agroindustries, *OCL - Oilseeds and fats, Crops and Lipids*, 24:1-, 2017. doi: 10.1051/ocl/2017031
3. Gurung N, Ray S, Bose S, Rai V. A broader view: Microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond, *BioMed Research International*, 2013: 1-18, 2013. doi: 10.1155/2013/329121
4. Tatta ER, Imchen M, Moopantakath J, Kumavath R. Bioprospecting of microbial enzymes: current trends in industry and healthcare, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106:1813–1835, 2022. doi: 10.1007/s00018-006-6172-x
5. Mhetras N, Mapare V, Gokhale D. Cold Active Lipases: Biocatalytic Tools for Greener Technology, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 193: 2245–2266, 2021. doi: 10.1007/s12010-021-03516-w
6. Joseph B, Ramteke PW, Thomas G. Cold active microbial lipases: Some hot issues and recent developments, *Biotechnology Advances*, 26:457–470, 2008. doi: 10.1016/j.biotechadv.2008.05.003

7. Siddiqui KS, Cavicchioli R. Cold-Adapted Enzymes, *Annual Review of Biochemistry*, 75:403–433, 2006. doi: 10.1146/annurev.biochem.75.103004.142723
8. Jaramillo PAP, Borda-Molina D, Montaña JS, Baena S. Isolation of lipolytic bacteria from Colombian Andean soils: A target for bioprospecting, *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences. Slovak University of Agriculture*, 6:1250–1256, 2017. doi: 10.15414/jmbfs.2017.6.6.1250-1256
9. Margesin R. Psychrophiles: From Biodiversity to Biotechnology, 2017. doi: 10.1007/978-3-319-57057-0
10. Balcazar W, Rondón J, Rengifo M et al. Bioprospecting glacial ice for plant growth promoting bacteria, *Microbiological Research*, 177:1–7, 2017. doi.org/10.1016/j.micres.2015.05.001
11. Borda-Molina D, Montaña JS, Zambrano MM, Baena S. Mining lipolytic enzymes in community DNA from high Andean soils using a targeted approach, *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 110: 1035–1051, 2017. doi:10.1007/s10482-017-0877-8
12. García V, Brizzio S, Libkind, D et al. Biodiversity of cold-adapted yeasts from glacial meltwater rivers in Patagonia, Argentina, *FEMS Microbiology Ecology*, 59:331–341, 2017. doi:10.1111/j.1574-6941.2006.00239.x
13. Shivaji S, Prakash, J SS. How do bacteria sense and respond to low temperature? In *Archives of Microbiology*, 92:85-95, 2010. doi:10.1007/s00203-009-0539
14. Nishida T, Morita N, Yano Y, Orikasa Y et al. The antioxidative function of eicosapentaenoic acid in a marine bacterium, *Shewanella marinintestina* IK-1, *FEBS Letters*, 581: 4212–4216, 2007. doi: 10.1016/j.febslet.2007.07.065
15. Lorv JS, Rose DR, Glick BR et al. Bacterial Ice Crystal Controlling Proteins. *Scientifica*, 7: 1–20, 2014. doi:10.1155/2014/976895
16. Pandey R, Usui K, Livingstone RA et al. (2016). Ice-nucleating bacteria control the order and dynamics of interfacial water. *Science Advances*, 2:4-6, 2016. doi.org/10.1126/sciadv.1501630
17. Keto-Timonen R, Hietala N, Palonen E et al. Cold Shock Proteins: A Minireview with Special Emphasis on Csp-family of Enteropathogenic *Yersinia*. *Frontiers in Microbiology*, 7:10-17, 2016. doi:10.3389/fmicb.2016.01151
18. Mangiagalli M, Brocca S, Orlando M, Lotti M. The “cold revolution”. Present and future applications of cold-active enzymes and ice-binding proteins, *New Biotechnology*, 55:5–11, 2020. doi: 10.1016/j.nbt.2019.09.003
19. Santiago M, Ramírez-Sarmiento CA, Zamora RA, Parra LP. Discovery, molecular mechanisms, and industrial applications of cold-active enzymes, *Frontiers in Microbiology. Frontiers Media S.A.*, 7:1408-1434, 2016. doi: 10.3389/fmicb.2016.01408

20. Gudiukaite R, Gricajeva A. Microbial lipolytic fusion enzymes: current state and future perspectives, *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 33: 216-8, 2017. doi: 10.1007/s11274-017-2381-8.
21. Arpigny J, Jaeger K. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties, *Biochemical journal*, 343:177-183, 1999. doi: 10.1042/0264-6021:3430177.
22. Ali Y, Verger R, Abousalham A. Lipases or Esterases: Does It Really Matter? Toward a New Bio-Physico-Chemical Classification, *Lipases and Phospholipases*, 861: 31-51, 2012. doi: 10.1007/978-1-61779-600-5\_2.
23. Romano, D, Bonomi, F, De Mattos, M, De Sousa, T, Da Conceição M, Molinari F. Esterases as stereoselective biocatalysts, *Biotechnology advances*, 33: 547-565, 2015. doi: 10.1016/j.biotechadv.2015.01.006.
24. Bornscheuer U. Microbial carboxylesterases: classification, properties and application in biocatalysis, *Fems Microbiology reviews*, 26: 73-81, 2002. doi:10.1016/S0168-6445(01)00075-4f
25. Bauer T, Buchholz P, Pleiss J. The modular structure of  $\alpha/\beta$ -hydrolases, *The FEBS Journal*, 287: 1035-1053, 2020. doi: 10.1111/febs.15071clasif
26. Ramnath L, Sithole B, Govinden R. Classification of lipolytic enzymes and their biotechnological applications in the pulping industry, *Canadian journal of microbiology*, 63:179-192, 2017. doi: 10.1139/cjm-2016-0447.
27. Koviac F, Babic N, Krauss U, Jaeger K. Classification of Lipolytic Enzymes from Bacteria, *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, 255-289, 2019. doi: 10.1007/978-3-319-50418-6\_39.
28. Hausmann S, Jaeger K. Lipolytic Enzymes from Bacteria, *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, 1099-1126, 2015. doi: 10.1007/978-3-540-77587-4\_77
29. Jaeger K, Dijkstra W, Reetz. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases, *Annual Review of Microbiology*, 53:315-351, 1999. DOI: 10.1146/annurev.micro.53.1.315
30. Rosenau F, Jaeger E. Bacterial lipases from Pseudomonas: Regulation of gene expression and mechanisms of secretion, *Biochimie*, 82:1023-1032, 2000. doi: 10.1016/S0300-9084(00)01182-2.
31. Jaeger K, Egger T. Lipases for biotechnology, *Current Opinion in Biotechnology*, 13:390-397, 2002. doi: 10.1016/S0958-1669(02)00341-5.
32. Casas L, Gasteazoro F, Duquesne S, Bordes F, Marty A, Sandoval G. Lipases: An Overview, *Lipases and Phospholipases*, 185:3-38, 2018. doi: 10.1007/978-1-4939-8672-9\_1.
33. Castillo E, Casas L, Sandoval G. Medium-engineering: a useful tool for modulating lipase activity and selectivity, *Biocatalysis (De Gruyter Open)*, 1:2353-1746, 2016. doi: 10.1515/boca-2015-0013.

34. Javed S, Azeem F, Hussain S, Rasul I, Siddique M, Riaz M, Afzal M, Kouser A, Nadeem H. Bacterial lipases: A review on purification and characterization, *Progress in biophysics and molecular biology*, 132:23-34, 2018. doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2017.07.014.
35. Hasan F, Shah A, Hameed A. Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review, *Biotechnology Advances*, 27:782-798, 2009. doi:10.1016/j.biotechadv.2009.06.001
36. Shelley W.A, Deeth H.C, MacRae I.C. Review of methods for enumeration, detection, and isolation of lipolytic microorganisms with special reference to dairy applications, *Journal of Microbiological Methods*, 6:123-137, 1987. doi: [10.1016/0167-7012\(87\)90008-X](https://doi.org/10.1016/0167-7012(87)90008-X)
37. Besoin F, Tiss A, Rivière C, Verger R. Methods for lipase detection and assay: a critical review, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 10: 133-153, 2000. doi: [10.1002/\(SICI\)1438-9312\(200002\)10:2<133::AID-EJLT133>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/(SICI)1438-9312(200002)10:2<133::AID-EJLT133>3.0.CO;2-X)
38. Carrasco J, Rivera B, Ramírez N, Manzanares, Nevárez G, Improved method for qualitative screening of lipolytic bacterial strains, 5: 68-74, 2021. doi:10.1016/j.mex.2018.01.004
39. Hoppe A, Theimer R, Titrimetric test for lipase activity using stabilized triolein emulsions, *Phytochemistry*, 42: 973-978, 1996. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(96\)00051-9](https://doi.org/10.1016/0031-9422(96)00051-9)
35. Hasan F, Shah A, Hameed A. Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review, *Biotechnology Advances*, 27:782-798, 2009. doi:10.1016/j.biotechadv.2009.06.001
40. Margesin R, Feller G, Hammerle M, Stegner U. A colorimetric method for determination of lipase activity in soil, *Biotechnology Letters*, 24: 27-33, 2003. doi: [10.1023/A:1013801131553](https://doi.org/10.1023/A:1013801131553)
41. Thomson CA, Delaquis PJ, Mazza G. Detection and Measurement of Microbial Lipase Activity: A review, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 39: 165-187, 1999. doi: 10.1080/10408399908500492
42. Stemler C, Scherf K. Comparative characterization of baking lipase substrate specificities using emulsions and the p-nitrophenyl assay, *LWT*, 168: 113914, 2022. doi: [10.1016/j.lwt.2022.113914](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113914)
43. Gilham D, Lehner R. Techniques to measure lipase and esterase activity in vitro, *Methods (San Diego, Calif.)*, 36:139-147, 2005. doi: 10.1016/j.ymeth.2004.11.003.
44. Collins T, Margesin R. Psychrophilic lifestyles: mechanisms of adaptation and biotechnological tools, *Applied microbiology and biotechnology*, 103:2857-2871, 2019. doi: 10.1007/s00253-019-09659-5.
45. Samoylova Y, Sorokina K, Piligaev A, Parmon V. Application of Bacterial Thermostable Lipolytic Enzymes in the Modern Biotechnological Processes: A Review, *Catalysis in industry*, 11:168-178, 2019. doi: 10.1134/S2070050419020107

46. Bornscheuner U. Microbial carboxyl esterases: classification, properties, and application in biocatalysis, *FEMS microbiology reviews*, 26:73-81, 2002. doi: 10.1016/S0168-6445(01)00075-4.
47. Gupta R, Gupta N, Rathi P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties, *Applied microbiology and biotechnology*, 64:763-781, 2004. doi: 10.1007/s00253-004-1568-8.
48. Borchert E, Selvin S, Kiran SG et al. A Novel Cold Active Esterase from a Deep-Sea Sponge *Stella normani* Metagenomic Library, *Frontiers In Marine Science*, 4: 287-302, 2017. doi: 10.3389/fmars.2017.00287
49. Cheng X, Wang X, Qiu T, Yuan M et al. Molecular Cloning and Characterization of a Novel Cold-Adapted Family VIII Esterase from a Biogas Slurry Metagenomic Library, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24: 1484-1489, 2014 .doi: 10.4014/jmb.1406.06071
50. Petrovskaya LE, Novototskaya KA, Gapizov SS et al. New member of the hormone-sensitive lipase family from the permafrost microbial community, *Bioengineered*, 8: 420-423, 2016. doi:10.1080/21655979.2016.1230571
51. Fu J, Leiros HK, Pascale D, Johnson KA, Blencke HM, Landfald B. Functional and structural studies of a novel cold-adapted esterase from an Arctic intertidal metagenomic library, *Applied Microbiology Biotechnology*, 97: 3965-3978, 2013. doi:10.1007/s00253-012-4276-9
52. Martinez M, Alcaide M, Tchignitsev A, Reva O, Polaina J et al. Biochemical Diversity of Carboxyl Esterases and Lipases from Lake Arreo (Spain): a Metagenomic Approach, *Applied and Environmental Biotechnology*, 79: 3553-3562, 2013. doi: [10.1128/AEM.00240-13](https://doi.org/10.1128/AEM.00240-13)
53. Jimenez DJ, Montaña JS, Álvarez D, Baena S. A novel cold active esterase derived from Colombian high Andean Forest soil metagenome, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28: 361-370, 2021. doi: 10.1007/s11274-011-0828-x
54. Hashim F, Mahadi M, Ritzal Feroz et al. Biochemical and structural characterization of a novel cold-active esterase-like protein from the psychrophilic yeast *Glaciozyma antarctica*, *Extremophiles*, 22: 607-616, 2018. <https://doi.org/10.1007/s00792-018-1021-z>
55. Liu X, Zhou M, S X et al. Identification and Biochemical Characterization of a Novel Hormone-Sensitive Lipase Family Esterase Est19 from the Antarctic Bacterium *Pseudomonas* sp. E2-15, *Biomolecules*, 11: 1552-1565, 2021. doi.org/10.3390/ biom11111552
56. Wang Q, Hou Y, Din Y. Purification, and biochemical characterization of a cold-active lipase from Antarctic Sea ice bacteria *Pseudoalteromonas* sp. NJ 70, *Molecular Biotechnology*, 39: 9233-9238, 2012. doi 10.1007/s11033-012-1796-4
57. de Santi C, Tedesco P, Ambrosino L, Altermark B, Willassen NP, de Pascale D. A new alkaliphilic cold-active esterase from the psychrophilic marine bacterium *Rhodococcus*

sp.: Functional and structural studies and biotechnological potential, *Applied Biochemistry and Biotechnology*. Humana Press Inc, 172:3054–3068, 2014. doi 10.1007/s12010-013-0713-1

58. Essakiraj P, Bharati C et al. Functional and molecular characterization of a cold-active lipase from *Psychrobacter celer* PU3 with potential antibiofilm property, *International Journal of Biological Macromolecules*, 211:741-753, 2022 .doi: [10.1016/j.ijbiomac.2022.04.17](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.04.17)

59. Luu Le, Yoo, Lee et al. Molecular Characterization of a Novel Cold-Active Hormone-Sensitive Lipase (HaHSL) from *Halocynthiibacter Arcticus*, 9: 704-715, 2019. doi:10.3390/biom9110704

60. Gökbulut AA, Arslanoglu. Purification and biochemical characterization of an extracellular lipase from psychrotolerant *Pseudomonas fluorescens* KE38, *Turkish Journal of Biology*, 37: 538-546, 2013. doi:10.3906/biy-1211-10

61. Lee HK, Ahn MJ, Kwak SH et al. Purification and Characterization of Cold Active Lipase from Psychrotrophic *Aeromonas* sp. LPB 4, *The Journal of Microbiology*, 41: 22-27, 2003. doi: [10.1011343-012](https://doi.org/10.1011343-012)

62. Sulong R, Hamid H, Sivam A, Abdullah H, Wee L. A novel organic solvent tolerant lipase from *Bacillus sphaericus* 205y Extracellular expression of a novel OST-lipase gene, *Protein expression and purification*, 49:190-195, 2006. doi:10.1016/j.pep.2006.04.015

63. Li M, Rong-Y, Xu G, Wu P. Screening, purification and characterization of a novel cold-active and organic solvent-tolerant lipase from *Stenotrophomonas maltophilia* CGMCC 4254, *Bioresource Technology*, 148: 114-120, 2013. doi:10.1016/j.biortech.2013.08.101

64. Wolf A, Fritze A, Hagemann M, Berg G. *Stenotrophomonas rhizophila*. nov., a novel plant-associated bacterium with antifungal properties, *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 52:1937-1944, 2002. doi: 10.1099/ijs.0.02135-0.

65. Egamberdieva D, Kucharova Z, Davranov et al. Bacteria able to control foot and root rot and to promote growth of cucumber in salinated soils, *Biology and Fertility of Soils*, 47: 197-205, 2011. doi: 10.1007/s00374-010-0523-3

66. Heredia-Acuña C, Almaraz-Suarez JJ, Arteaga-Garibay R et al. Isolation, characterization and effect of plant-growth-promoting rhizobacteria on pine seedlings (*Pinus pseudostrobus* Lindl.), *Journal of Forestry Research*, 30: 1727-1734, 2019. doi: 10.1007/s11676-018-0723-5

67. Dif G, Belaouni HA, Yekkour A et al. Performance of halotolerant bacteria associated with Sahara-inhabiting halophytes *Atriplex halimus* L. and *Lygeum spartum* L. ameliorate tomato plant growth and tolerance to saline stress: from selective isolation to genomic analysis of potential determinants, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 38: 16, 2022. doi:10.1007/s11274-021-03203-2

68. Schmidt C.S, Mrnka L, Lovecká P et al. Bacterial and fungal endophytecommunities in healthyand diseased oilseed rape and their potential for biocontrol of *Sclerotinia* and *Phoma* disease, *Scientific reports*, 11: 3810, 2021.doi:10.1038/s41598-021-81937-7

69. Wang L, Xi N, Lang D et al. Potential biocontrol and plant growth promotion of an endophytic bacteria isolated from *Glycyrrhiza uralensis* seeds, 32:55, 2022. doi:10.1186/s41938-022-00556-0
70. Hagemann M, Ribbeck-Busch K, Klähn S, Hasse D, Steinbruch R, Berg G. The Plant-Associated Bacterium *Stenotrophomonas rhizophila* Expresses a New Enzyme for the Synthesis of the Compatible Solute Glucosylglycerol, *Journal of Bacteriology*, 190:5898-5906, 2008. doi: 10.1128/JB.00643-08.
71. Jankiewicz U, Baranowski B, Swiontek M, Frąk M. Purification, characterization and cloning of a chitinase from *Stenotrophomonas rhizophila* G22, *3 Biotech*, 10:16, 2020. doi: 10.1007/s13205-019-2007-y.
72. Pinski A, Zur J, Hasterok R, Hupert K. Comparative Genomics of *Stenotrophomonas maltophilia* and *Stenotrophomonas rhizophila* Revealed Characteristic Features of Both Species, *International journal of molecular sciences*, 21:4922, 2020. doi: 10.3390/ijms21144922.
73. Wu Y, Huang Z, Zhang W, Guang C, Chen Q, Mu W. Characterization of a Novel Mannose Isomerase from *Stenotrophomonas rhizophila* and Identification of Its Possible Catalytic Residues, *Molecular biotechnology*, 64:650-659, 2022. doi: 10.1007/s12033-021-00437-1.
74. Ryan R, Monchy S, Cardinale M, Taghavi S, Crossman L, Avison M, Berg G, van der Leslie D, Dow J. The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*, *Nature reviews. Microbiology*, 7:514-525, 2009. doi: 10.1038/nrmicro2163.
75. Alavi P, Starcher M, Thallinger G, Zachow C, Müller H, Berg G. *Stenotrophomonas* comparative genomics reveals genes and functions that differentiate beneficial and pathogenic bacteria, *BMC Genomics*, 15:482, 2014. doi: 10.1186/1471-2164-15-482.
76. Sharma R, Chisti Y, Banerjee C. Production, purification, characterization and applications of lipases, *Biotechnology Advances*, 19:627-662,2001. doi: 10.1016/S0734-9750(01)00086-6
77. Adetunji AI, Olaniran AO. Production strategies and biotechnological relevance of microbial lipases: a review, *Brazilian Journal of Microbiology*, 52:1257-1269, 2021. doi: 10.1007/s42770-021-00503-5
78. Lotti M, Monticelli S, Montesinos JL et al. Physiological control on the expression and secretion of *Candida rugosa* lipase, *Chemistry and Physics of Lipids*, 93: 143-148, 1998. doi: [10.1016/s0009-3084\(98\)00038-3](https://doi.org/10.1016/s0009-3084(98)00038-3)
79. Martínez-Corona R, Banderas-Martinez FJ, Pérez-Castillo JN et al. Avocado oil as an inducer of the extracellular lipase activity of *Kluyveromyces marxianus* L-2029, *Food Science and Technology*, 40: 121-129, 2020. doi:[10.1590/fst.06519](https://doi.org/10.1590/fst.06519)
80. Nerurkar M, Joshi M, Adivarekar R. Application of Lipase from Marine Bacteria *Bacillus sonorensis* as an Additive in Detergent Formulation, *Journal of Surfactants and Detergents*, 16: 435-443,2013. doi:10.1007/s11743-012-1434-0

81. Cherif S, Mnif S, Hadrich F. A newly high alkaline lipase: an ideal choice for application in detergent formulations, *Lipids in Health and Disease*, 10:221, 2011. doi:10.1186/1476-511X-10-221
82. Brozzoli V, Crognale L, Sampedro I et al. Assessment of olive-mill wastewater as a growth medium for lipase production by *Candida cylindracea* in bench-top reactor, *Bioresource Technology*, 100: 3395-3402, 2009. doi.org/10.1016/j.biortech.2009.02.022
83. Rathi P, Saxena RK, Gupta R. A novel alkaline lipase from *Burkholderia cepacia* for detergent formulation, *Process Biochemistry*, 37: 187-192, 2001. doi: 10.1016/S0032-9592(01)00200-X
84. Niyonzima FN, More S. Biochemical properties of the alkaline lipase of *Bacillus flexus* XJU-1 and its detergent compatibility, *Biologia*, 69: 1108-1117, 2014. doi: 10.2478/s11756-014-0429-x
85. Hasan F, Shah AA, Hameed A. Influence of culture conditions on lipase production by *Bacillus* sp. FH5, *Annals of Microbiology*, 56:247-252, 2006. doi:10.1007/BF03175013
86. Bharathi D, Rajalakshmi G, Komathi S. Optimization and production of lipase enzyme from bacterial strains isolated from petrol spilled soil, *Journal of King Saud University-Science*, 31: 898-901, 2019. doi:10.1016/j.jksus.2017.12.018
87. Salwoom L, Abd Rahman RNZR, Salleh AB et al. Isolation, Characterisation, and Lipase Production of a Cold-Adapted Bacterial Strain *Pseudomonas* sp. LSK25 Isolated from Signy Island, Antarctica, *Molecules*, 24, 715, 2019. doi: 10.3390/molecules24040715
88. Geoffry K, Rajeshwara N, Achur N. Screening and production of lipase from fungal organisms, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 14: 241-253, 2018. doi.org:10.1016/j.bcab.2018.03.009
89. Wang Q, Zhang C, Hou Y, Lin X, Shen J, Guan X. Optimization of Cold-Active Lipase Production from Psychrophilic Bacterium *Moritella* sp. 2-5-10-1 by Statistical Experimental Methods, *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 77:17-21, 2013. doi: 10.1271/bbb.120104.
90. Yu H, Han J, Li N, Qie S, Jia M. Fermentation Performance and Characterization of Cold-Adapted Lipase Produced with *Pseudomonas* Lip35, *Agricultural sciences in China*, 8:956-962, 2009. doi: 10.1016/S1671-2927(08)60300-4
91. Ali Y, Ahmad B, Alghamdi K, Kamal T, Mohammed H, Anwar Y, Hussain A, Jomezai N. Characterization of Recombinant Cold Active Lipase from a Novel *Pseudomonas* spp. MG687270, *International Journal Of Agriculture & Biology*, 22:855-865, 2019. doi: 10.17957/IJAB/15.1141.
92. Kim S, Wi A, Park H, Kim D, Kim W, Yim J, Han S. Enhancing Extracellular Lipolytic Enzyme Production In An Arctic Bacterium, *Psychrobacter* sp. ArcL13, By Using Statistical Optimization And Fed-Batch Fermentation, *Preparative biochemistry & biotechnology*, 45:348-364 2015. doi: 10.1080/10826068.2014.940964.

93. Jadhav V, Pote S, Yadav A, Yogesh S. Extracellular cold active lipase from the psychrotrophic *Halomonas* sp. BRI 8 isolated from the Antarctic sea water, *Wārasān Songkhilā Nakharin*, 35:623-630, 2013.
94. Neethu C, Mujeeb R, Rosmine E, Saramma A, Mohamed H. Utilization of agro-industrial wastes for the production of lipase from *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from Arctic and optimization of physical parameters, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4:703-709, 2015. doi: 10.1016/j.bcab.2015.09.002.
95. Aachapa S, Veeranna S, Hombalimath, Kamarddi J, Shivalingsarj V, Shet A, Laxmikant R, Jagadish R. Statistical Optimization of Lipase Production from *Bacillus* species by Submerged Fermentation, *Bioscience Biotechnology Research Communications*, 14:264:269, 2021. doi: 10.21786/bbrc/14.1/37
96. Veerapaug M, Narayanan S, Ponmurgan K, Jeya K. Screening selection identification production and optimization of bacterial lipase from oil spilled soil, *Asian Journal Of Pharmaceutical And Clinical Research*, 6:62-67, 2013.
97. Sharma C, Sharma P, Kanwar S. Optimization of production conditions of lipase from *B. licheniformis* MTCC-10498, *Research Journal of Recent Sciences*, 7:25-32, 2012.
98. Moein E, Mahmoud Y, Ahmad S, Hamid G. A central composite design for the optimizing lipase and protease production from *Bacillus subtilis* PTCC 1720, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4:394-354, 2015. doi: 10.1016/j.bcab.2015.05.002
99. Chien L, Chien H, Wan Y, Chang J. Optimizing lipase production from isolated *Burkholderia* sp., *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 43:511-516, 2012. doi:10.1016/j.jtice.2012.02.004.
100. Ilesanmi O, Adekunle A, Omolaiye J, Olorode E, Ogunkanmi A. Isolation, optimization and molecular characterization of lipase producing bacteria from contaminated soil, *Scientific African*, 8: 56-72, 2020. doi:10.1016/j.sciaf.2020.e00279
101. Hasan B, Forootanfar H, Safiarian M, Ameri A, Ghahremani M, Khoshayand M, Faramarzi M. Optimization of culture conditions for production of lipase by a newly isolated bacterium *Stenotrophomonas maltophilia*, *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 43:1876-1070, 2021. doi:10.1016/j.jtice.2012.03.005.
102. Mazzucotelli C, Agüero M, del Rosario M, Ansorena M. Optimization of medium components and physicochemical parameters to simultaneously enhance microbial growth and production of lipolytic enzymes by *Stenotrophomonas* sp, *Biotechnology and applied biochemistry*, 63:407-418, 2016. doi:10.1002/bab.1378
103. Mahdi O, Eklund B, Fisher N. *Stenotrophomonas maltophilia*: Laboratory Culture and Maintenance, *Current protocols in microbiology*, 32: Unit-6F.1, 2014. doi: 10.1002/9780471729259.mc06f01s32
104. Singh S, Baghela A. Cryopreservation of Microorganisms, *Modern Tools and Techniques to Understand Microbes*, 10: 321-333, 2017. doi:10.1007/978-3-319-49197-4\_21.

105. Golani M, Hajela K, Pandey G. Screening, Identification, Characterization and Production of Bacterial Lipase from Oil Spilled Soil, *International journal of current microbiology and applied sciences*, 5: 745-763, 2016. doi:10.20546/ijcmas.2016.503.087
106. Beisson F, Tiss A, Riviere C, Verger R. Methods for lipase detection and assay: a critical review, *European journal of lipid science and technology*, 102: 133-153, 2000. doi: 10.1002/(SICI)1438-9312(200002)102:2<133::AID-EJLT133>3.3.CO;2-O
107. Yamashiro Y, Sakatoku A, Tanaka D, Nakamura S. A cold-adapted and organic solvent-tolerant lipase from a psychrotrophic bacterium *Pseudomonas* sp. Strain YY31: Identification, cloning, and characterization, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 171:989–1000, 2013. doi 10.1007/s12010-013-0406-9
108. Plackett, R, Burman J. The Design of Optimum Multifactorial Experiments, *Biometrika*, 33: 305, 1946. doi: 10.2307/2332195
109. Molina C, De la Rosa G, González J, Sánchez Y, Castillo H, Valdez I, Balcazar E, Salmerón I. Optimization of Culture Conditions for Production of Cellulase by *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bioresurces*, 13: 11-21, 2018. doi: 10.15376/biores.13.4.8358-8372.
110. Li S, Wang L, Yang J, Bao J, Liu J, Lin S, Hao J, Sun M. Affinity purification of metalloprotease from marine bacterium using immobilized metal affinity chromatography, *Journal of separation science*, 39: 2050-2056, 2016. doi: 10.1002/jssc.201600104.
111. Gutierrez I, Torrea A, Moreno N. Optimizing carbon and nitrogen sources for *Azotobacter chroococcum* growth, *African Journal of Biotechnology*, 10:2951-2958, 2011. doi: 10.5897/AJB10.1484
112. Abraham W, Raghunandan S, Gopinath V, Suryaaletha K, Sabu T. Deciphering the Cold Adaptive Mechanisms in *Pseudomonas psychrophila* MTCC12324 Isolated from the Arctic at 79° N, *Current microbiology*, 77:2345-2355, 2020. doi: 10.1007/s00284-020-02006-2.
113. Nedwell DB. Effect of low temperature on microbial growth: lowered affinity for substrates limits growth at low temperature, *FEMS Microbiology Ecology. Oxford University Press (OUP)*, 30:101–111, 2006. doi:10.1111/j.1574-6941.1999.tb00639.x
114. Kuhn E. Toward Understanding Life Under Subzero Conditions: The Significance of Exploring Psychrophilic “Cold-Shock” Proteins, *Astrobiology*, 12:178-1086, 2012. doi:10.1089/ast.2012.0858
115. D’Amico S, Collins T, Marx J, Feller G, Gerday C. Psychrophilic microorganisms: challenges for life, *EMBO reports*, 7:385-389, 2006. doi: 10.1038/sj.embor.7400662.
116. Marr A, Ingraham J. Effect of temperature on the composition of fatty acids in *Escherichia coli*, *Journal of Bacteriology*, 84:1260-1267, 1962. doi: 10.1128/JB.84.6.1260-1267.1962

117. Hamamoto T, Nobuhisa T, Kudo T, Horikoshi K. Effect of temperature and growth phase on fatty acid composition of the psychrophilic *Vibrio* sp. strain no. 5710, *FEMS microbiology letters*, 119:77-81, 1994. doi:10.1111/j.1574-6968.1994.tb06870.x
118. Théberge M, Prévost D, Chalifour F. The Effect of Different Temperatures on the Fatty Acid Composition of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* in the Faba Bean Symbiosis, *The New phytologist*, 134:657-664, 1996. doi:10.1111/j.1469-8137.1996.tb04931.x.
119. Margesin R. Effect of temperature on growth parameters of psychrophilic bacteria and yeasts, *Extremophiles*, 13:257–262, 2009. doi: 10.1007/s00792-008-0213-3
120. Buchon L, Laurent P, Gounot AM, Guespin-Michel JF. Temperature dependence of extracellular enzymes production by psychrotrophic and psychrophilic bacteria, *Biotechnology Letters*, 22: 1577-1581, 2000. doi: 10.1023/A:1005641119076
121. Xinwei G, Xiangzhao M, Lu P, Secundo F, Xue C, Jianan S. Cloning, Expression, and Characterization of a Novel Thermostable and Alkaline-stable Esterase from *Stenotrophomonas maltophilia* OUC\_Est10 Catalytically Active in Organic Solvents, *Catalysts*, 9:401, 2019. doi: 10.3390/catal9050401.
122. Verma S, Ghosh K, Verma R, Verma S. Influence of cationic surfactants and inorganic salts on the enzyme kinetic activity of *Mucor javanicus* lipase, *International journal of chemical kinetics*, 53:308-316, 2021. doi: 10.1002/kin.21444.
123. Kiran G, Shanmughapriya S, Jayalakshmi J, Selvin J, Gandhimathi R, Sivaramakrishnan S, Arunkumar M, Thangavelu T, Natarajaseenivasan K. Optimization of extracellular psychrophilic alkaline lipase produced by marine *Pseudomonas* sp. (MSI057), *Bioprocess and biosystems engineering*, 31:483-492, 2008. doi: 10.1007/s00449-007-0186-0
124. Zhang J, Reddy, Bucklan B, Greasham R. Toward consistent and productive complex media for industrial fermentations: Studies on yeast extract for a recombinant yeast fermentation process, *Biotechnology and bioengineering*, 82:640-652, 2003, doi:10.1002/bit.10608.
125. Benthin S, Villadsen J. Amino acid utilization by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FD1 during growth on yeast extract or casein peptone, *Journal of Applied Bacteriology*, 80:65-72, 1996. doi:10.1111/j.1365-2672.1996.tb03191.x
126. Bhavya S, Priyanka B, Rastogi N. Reverse micelles-mediated transport of lipase in liquid emulsion membrane for downstream processing, *Biotechnology progress*, 28:1542-1550, 2012. doi:10.1002/btpr.1637.
127. Kumar D, Parshad R, Gupta V. Application of a statistically enhanced, novel, organic solvent stable lipase from *Bacillus safensis* DVL-43, *International journal of biological macromolecules*, 66:97-107, 2014. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2014.02.015.
128. Salihu A, Zahangir A. Production and applications of microbial lipases: a review, *Scientific Research and Essays*, 7:2667-2677, 2012. doi:10.5897/SRE11.2023

129. Kathiravan T, Marykala J, Sundaramanickam S, Kumaresan S, Balasubramanian T. Studies on nutritional requirements of *Pseudomonas aeruginosa* for lipase production, *Pelagia Research*, 3:591-598, 2012.

130. Kumar A. *Aspergillus nidulans*: A Potential Resource of the Production of the Native and Heterologous Enzymes for Industrial Applications, *International Journal of Microbiology*, 2020:1-11, 2020. doi:10.1155/2020/8894215

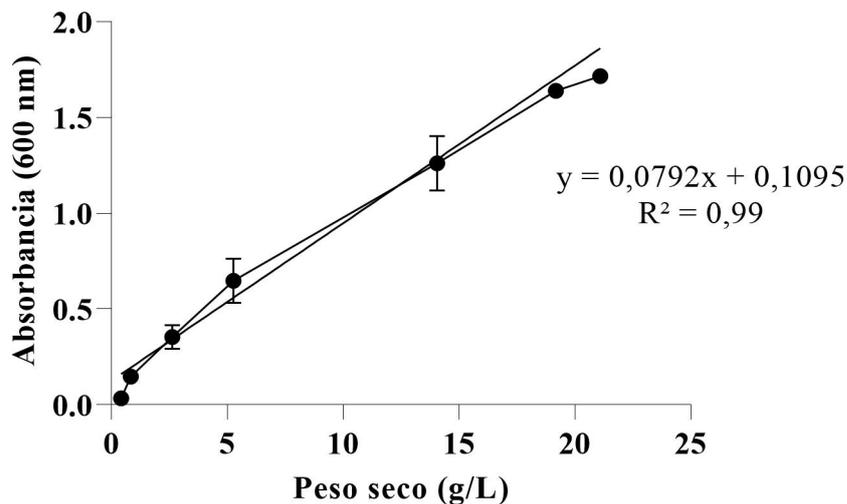
131. Thakur V, Tewari R, Sharma R. Evaluation of Production Parameters for Maximum Lipase Production by *P. stutzeri* MTCC 5618 and Scale-Up in Bioreactor, *Chinese Journal of Biology*, 2014:1-14, 2014. doi:10.1155/2014/208462

132. Degaleesan S, Dudukovic M, Pan Y. Experimental study of gas-induced liquid-flow structures in bubble columns, *Alche Journal*, 47:1913-1931, 2001. doi:10.1002/aic.690470904

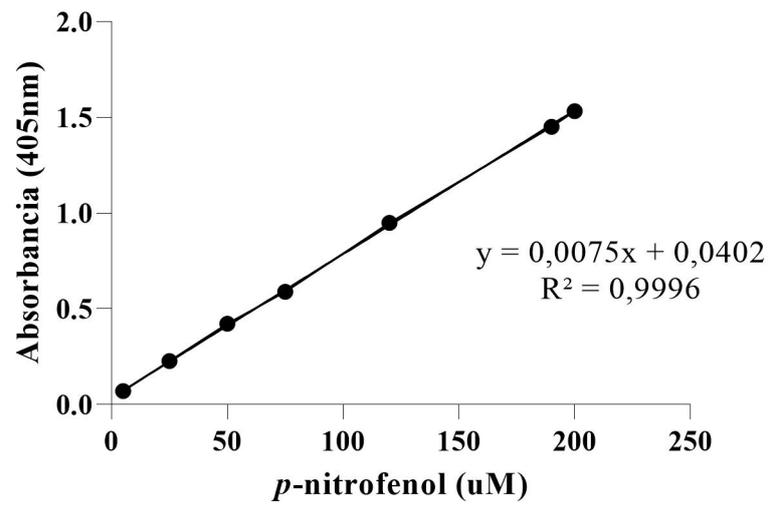
133. Lee H, Ahn M, Kwak S, Song W, Jeon B. Purification and Characterization of Cold Active Lipase from *Psychrotrophic Aeromonas* sp. LPB4, *The journal of microbiology*, 41:11-21, 2003.

## 10. ANEXOS

### ANEXO 1. Curva patrón de peso seco



## ANEXO 2. Curva patrón de *p*-nitrofenol



### ANEXO 3. Diseño Plackett-Burman A

Experimento	Glucosa (g/L)	Tributirina (%v/v)	Tween 80 (%v/v)	Extracto de levadura (g/L)	Peptona (g/L)	NH <sub>4</sub> Cl (g/L)	NaCl (g/L)	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g/L)	FeSO <sub>4</sub> (g/L)	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (g/L)	Agitación (rpm)	Actividad lipolítica (U/L·min)	SD	CV (%)
1	-1 (2,5)	-1 (1,0)	-1 (0,20)	-1 (3,0)	-1 (2,0)	-1 (0,5)	-1 (1,0)	-1 (0,3)	-1 (0,3)	-1 (0,3)	-1 (0,0)	37,811	7,019	18,564
2	-1 (2,5)	-1 (1,0)	+1 (2,0)	-1 (3,0)	+1 (6,0)	+1 (2,5)	-1 (1,0)	+1 (2,0)	+1 (0,8)	+1 (0,8)	-1 (0,0)	106,922	11,742	10,981
3	+1 (10)	+1 (2,0)	+1 (2,0)	-1 (3,0)	+1 (6,0)	+1 (2,5)	+1 (10,0)	-1 (0,3)	-1 (0,3)	-1 (0,3)	+1 (150,0)	96,848	15,460	15,963
4	+1 (10)	+1 (2,0)	-1 (0,20)	+1 (6,0)	-1 (2,0)	+1 (2,5)	+1 (10,0)	-1 (0,3)	+1 (0,8)	+1 (0,8)	+1 (150,0)	144,744	10,798	7,460
5	+1 (10)	+1 (2,0)	-1 (0,20)	-1 (3,0)	+1 (6,0)	-1 (0,5)	+1 (10,0)	+1 (2,0)	-1 (0,3)	+1 (0,8)	+1 (150,0)	70,978	9,224	12,995
6	-1 (2,5)	-1 (1,0)	+1 (2,0)	+1 (6,0)	-1 (2,0)	+1 (2,5)	+1 (10,0)	+1 (2,0)	-1 (0,3)	-1 (0,3)	-1 (0,0)	85,589	0,943	1,102
7	-1 (2,5)	-1 (1,0)	-1 (0,20)	+1 (6,0)	+1 (6,0)	+1 (2,5)	-1 (1,0)	-1 (0,3)	-1 (0,3)	+1 (0,8)	-1 (0,0)	48,404	2,554	5,256
8	-1 (2,5)	-1 (1,0)	-1 (0,20)	+1 (6,0)	+1 (6,0)	-1 (0,5)	+1 (10,0)	+1 (2,0)	+1 (0,8)	-1 (0,3)	-1 (0,0)	177,567	10,606	5,973
9	+1 (10)	+1 (2,0)	+1 (2,0)	+1 (6,0)	-1 (2,0)	-1 (0,5)	-1 (1,0)	+1 (2,0)	-1 (0,3)	+1 (0,8)	+1 (150,0)	40,033	9,114	22,766
10	-1 (2,5)	-1 (1,0)	+1 (2,0)	-1 (3,0)	-1 (2,0)	-1 (0,5)	+1 (10,0)	-1 (0,3)	+1 (0,8)	+1 (0,8)	-1 (0,0)	88,867	6,993	7,869

<b>11</b>	+1 (10)	+1 (2,0)	-1 (0,20)	-1 (3,0)	-1 (2,0)	+1 (2,5)	-1 (1,0)	+1 (2,0)	+1 (0,8)	-1 (0,3)	+1 (150,0)	164,233	13,502	8,221
<b>12</b>	+1 (10)	+1 (2,0)	+1 (2,0)	+1 (6,0)	+1 (6,0)	-1 (0,5)	-1 (1,0)	-1 (0,3)	+1 (0,8)	-1 (0,3)	+1 (150,0)	71,367	7,542	10,569

#### ANEXO 4. Diseño Plackett-Burman B

<b>Experimento</b>	<b>Glucosa (g/L)</b>	<b>Tributirina (%v/v)</b>	<b>Tween 80 (%v/v)</b>	<b>Peptona (g/L)</b>	<b>56NH<sub>4</sub> Cl (g/L)</b>	<b>NaCl (g/L)</b>	<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (g/L)</b>	<b>FeSO<sub>4</sub> (g/L)</b>	<b>MgSO<sub>4</sub> ·7H<sub>2</sub>O (g/L)</b>	<b>Actividad lipolítica (U/L·min)</b>	<b>SD</b>	<b>CV (%)</b>
<b>1</b>	0 (6,25)	0 (1,5)	0 (0,4)	0 (4,0)	0 (1,5)	0 (5,5)	0 (1,15)	0 (0,55)	0 (0,55)	79,348	6,340	7,990
<b>2</b>	+1 (10)	-1 (1,0)	+1 (0,6)	+1 (6,0)	-1 (0,5)	+1 (10)	+1 (2,0)	+1 (0,8)	-1 (0,3)	64,481	3,586	5,562
<b>3</b>	0 (6,25)	0 (1,5)	0 (0,4)	0 (4,0)	0 (1,5)	0 (5,5)	0 (1,15)	0 (0,55)	0 (0,55)	93,070	9,978	10,721
<b>4</b>	-1 (2,5)	+1 (2,0)	-1 (0,2)	+1 (6,0)	+1 (2,5)	-1 (1,0)	+1 (2,0)	+1 (0,8)	+1 (0,8)	90,126	5,275	5,853
<b>5</b>	-1 (2,5)	-1 (1,0)	-1 (0,2)	-1 (2,0)	-1 (0,5)	-1 (1,0)	-1 (0,3)	-1 (0,3)	-1 (0,3)	41,385	1,433	3,463
<b>6</b>	+1 (10)	-1 (1,0)	-1 (0,2)	-1 (2,0)	+1 (2,5)	-1 (1,0)	+1 (2,0)	+1 (0,8)	-1 (0,3)	47,681	4,233	8,857
<b>7</b>	+1 (10)	+1 (2,0)	-1 (0,2)	-1 (2,0)	-1 (0,5)	+1 (10)	-1 (0,3)	+1 (0,8)	+1 (0,8)	26,598	1,674	6,293
<b>8</b>	+1 (10)	-1 (1,0)	+1 (0,6)	+1 (6,0)	+1 (2,5)	-1 (1,0)	-1 (0,3)	-1 (0,3)	+1 (0,8)	101,978	6,022	5,905
<b>9</b>	-1 (2,5)	+1 (2,0)	+1 (0,6)	-1 (2,0)	+1 (2,5)	+1 (10)	+1 (2,0)	-1 (0,3)	-1 (0,3)	75,154	3,470	4,618

<b>Experimento</b>	<b>Glucosa (g/L)</b>	<b>Tributirina (%v/v)</b>	<b>Tween 80 (%v/v)</b>	<b>Peptona (g/L)</b>	<b>56NH<sub>4</sub> Cl (g/L)</b>	<b>NaCl (g/L)</b>	<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (g/L)</b>	<b>FeSO<sub>4</sub> (g/L)</b>	<b>MgSO<sub>4</sub> ·7H<sub>2</sub>O (g/L)</b>	<b>Actividad lipolítica (U/L·min)</b>	<b>SD</b>	<b>CV (%)</b>
<b>1</b>	0 (6,25)	0 (1,5)	0 (0,4)	0 (4,0)	0 (1,5)	0 (5,5)	0 (1,15)	0 (0,55)	0 (0,55)	79,348	6,340	7,990
<b>2</b>	+1 (10)	-1 (1,0)	+1 (0,6)	+1 (6,0)	-1 (0,5)	+1 (10)	+1 (2,0)	+1 (0,8)	-1 (0,3)	64,481	3,586	5,562
<b>3</b>	0 (6,25)	0 (1,5)	0 (0,4)	0 (4,0)	0 (1,5)	0 (5,5)	0 (1,15)	0 (0,55)	0 (0,55)	93,070	9,978	10,721
<b>4</b>	-1 (2,5)	+1 (2,0)	-1 (0,2)	+1 (6,0)	+1 (2,5)	-1 (1,0)	+1 (2,0)	+1 (0,8)	+1 (0,8)	90,126	5,275	5,853
<b>5</b>	-1 (2,5)	-1 (1,0)	-1 (0,2)	-1 (2,0)	-1 (0,5)	-1 (1,0)	-1 (0,3)	-1 (0,3)	-1 (0,3)	41,385	1,433	3,463
<b>6</b>	+1 (10)	-1 (1,0)	-1 (0,2)	-1 (2,0)	+1 (2,5)	-1 (1,0)	+1 (2,0)	+1 (0,8)	-1 (0,3)	47,681	4,233	8,857
<b>7</b>	+1 (10)	+1 (2,0)	-1 (0,2)	-1 (2,0)	-1 (0,5)	+1 (10)	-1 (0,3)	+1 (0,8)	+1 (0,8)	26,598	1,674	6,293
<b>10</b>	-1 (2,5)	+1 (2,0)	+1 (0,6)	+1 (6,0)	-1 (0,5)	-1 (1,0)	-1 (0,3)	+1 (0,8)	-1 (0,3)	45,876	3,456	7,534
<b>11</b>	0 (6,25)	0 (1,5)	0 (0,4)	0 (4,0)	0 (1,5)	0 (5,5)	0 (1,15)	0 (0,55)	0 (0,55)	56,015	3,761	6,715
<b>12</b>	+1 (10)	+1 (2,0)	-1 (0,2)	+1 (6,0)	+1 (2,5)	+1 (10)	-1 (0,3)	-1 (0,3)	-1 (0,3)	73,793	7,906	10,714
<b>13</b>	-1 (2,5)	-1 (1,0)	-1 (0,2)	+1 (6,0)	-1 (0,5)	+1 (10)	+1 (2,0)	-1 (0,3)	+1 (0,8)	72,672	2,617	3,602
<b>14</b>	+1 (10)	+1 (2,0)	+1 (0,6)	-1 (2,0)	-1 (0,5)	-1 (1,0)	+1 (2,0)	-1 (0,3)	+1 (0,8)	10,533	0,729	6,917
<b>15</b>	-1 (2,5)	-1 (1,0)	+1 (0,6)	-1 (2,0)	+1 (2,5)	+1 (10)	-1 (0,3)	+1 (0,8)	+1 (0,8)	35,719	1,509	4,233

