

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA  
INSTITUTO DE INGENIERÍA**

**MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA**



**“MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA  
LIPASA”**

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRO EN INGENIERÍA**

**PRESENTA**

**José Angel León Valdez**

**DIRECTOR**

**Dra. Margarita Stilianova Stoytcheva**

**CODIRECTOR**

**Dra. Gisela Montero Alpírez**

**Mexicali, B. C., Abril de 2013**

## *Índice de contenido*

Agradecimientos	v
Resumen	1
1. Introducción	2
1.1 Planteamiento del problema	3
1.2 Justificación	3
1.3 Objetivo de la investigación	4
1.3.1 Objetivos específicos	4
1.4 Hipótesis	5
2. Marco teórico	6
2.1 Enzimas	7
2.1.1 Actividad enzimática	9
2.1.2 Aplicaciones de las lipasas como catalizadores	10
2.1.3 Mecanismo de reacción de la hidrólisis catalizada con lipasa.	12
2.1.4 Aceite de oliva como sustrato para la lipasa	15
2.2 Métodos de determinación de actividad enzimática de la lipasa	16
2.2.1 Método volumétrico	17
2.2.2 Métodos espectrofotométricos	18
2.2.2.1 Colorimetría	18
2.2.2.2 Espectrometría visible	18
2.2.2.3 Espectrometría de infrarrojo	20
2.2.2.4 Espectrometría por fluorimetría	20
2.2.2.5 Turbidimetría y nefelometría	22
2.2.3 Ensayos Radioactivos	23
2.2.4 Ensayos inmunológicos	23
2.2.5 Conductimetría	24
2.2.6 Cromatografía	24
2.2.7 Métodos basados en biosensores	25
2.2.8 Otros métodos	27

2.3 Espectrometría de absorción	28
2.4 Microbalanza de cristal de cuarzo (QCM)	30
3. Metodología	33
3.1 Método espectrofotométrico	34
3.1.1 Materiales y equipo	34
3.1.2 Reactivos	35
3.1.3. Determinación de la actividad enzimática	37
3.2 Método gravimétrico utilizando una microbalanza de cristal de cuarzo (QCM)	38
3.2.1 Materiales y equipo	38
3.2.2 Reactivos	39
3.2.3. Determinación de la actividad enzimática	40
4. Resultados	43
4.1 Método espectrofotométrico	44
4.2 Método gravimétrico utilizando una microbalanza de cristal de cuarzo (QCM)	51
5. Conclusiones y Recomendaciones	57
6. Referencias	60
Anexos	73

## *Índice de figuras*

2.1. Estructura de la enzima lipasa (triacilglicerol acilhidrolasa)	8
2.2. Paso 1 en la hidrólisis de un triglicérido por la lipasa.	13
2.3. Paso 2 en la hidrólisis de un triglicérido por la lipasa.	13
2.4. Molécula de trioleína	15
2.5. Molécula de ácido oleico	15
2.6. Molécula de glicerol	16
2.7. Descomposición de una molécula de trioleína en ácidos oleicos y glicerol.	16
2.8. Representación de absorción.	29
2.9. Microbalanza de cristal de cuarzo	31
2.10. Montaje típico de equipo experimental de microbalanza de cristal de cuarzo.	32
3.1. Lámina de prueba dentro de una celda espectrofotométrica.	34
3.2. Espectrofotómetro UV-visible de Gilford Stasar III.	35
3.3. Tiras de prueba con nanopartículas de grafito.	36
3.4. Tiras de prueba con nanopartículas de Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .	36
3.5. Espectro de absorbancia de una lámina de prueba	37
3.6. QCM y celda de prueba	38
3.7. QCM en instalada en la celda de medición	39
3.8. Equipo potenciostato/galvanostato y equipo de cómputo para el registro de mediciones	40
3.9. Evolución de la degradación de la capa aceite de oliva.	40
4.1. Absorbancia contra tiempo (Prueba 1 a 3).	44
4.2. Absorbancia contra tiempo (Prueba 4 a 7).	45
4.3. Absorbancia contra tiempo. Pruebas a diferentes temperaturas.	46
4.4. Lámina de prueba. Mezcla de aceite de oliva y nanopartículas de Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .	47
4.5. Imagen con microscopio XJP-H100 de lámina de prueba.	48
4.6. Imágenes de AFM de una lámina de prueba. b) Escala 50 nm, d) Escala 150 nm.	48
4.7. Espectro de absorbancia de una lámina de prueba a diferentes longitudes de onda.	49
4.8. Evolución de la degradación de la capa aceite de oliva/nanopartículas de Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .	50
4.9. Curva de calibración para la cuantificación de la actividad de la lipasa por método espectrofotométrico.	50

4.10. Microbalanza de cristal de cuarzo con sustrato adherido.	51
4.11. Adición de solución enzimática a celda de prueba.	51
4.12. Evolución de la degradación de una capa aceite de oliva.	52
4.13. Curva de calibración para la cuantificación de la actividad de la lipasa por método gravimétrico. Aceite de oliva como sustrato.	53
4.14. Gel de aceite de oliva y nanopartículas de SiO <sub>2</sub> A) Imagen por medio de microscopio XJP-H100. B) Imagen por medio de SEM	53
4.15. Dispersión aceite de oliva y nanopartículas de SiO <sub>2</sub> posterior a la evaporación de cloroformo A) Imagen por medio de microscopio XJP-H100. B) Imagen por medio de SEM.	54
4.16. Evolución de la degradación de la capa aceite de oliva/nanopartículas de SiO <sub>2</sub> .	54
4.17. Curva de calibración para la cuantificación de la actividad de la lipasa por método gravimétrico. Aceite de oliva/nanopartículas de SiO <sub>2</sub> como sustrato.	55
4.18. Comparación de curvas de calibración para el método gravimétrico.	56

### *Índice de tablas*

4.1. Actividad enzimática para cada prueba. Muestra de aceite de oliva y partículas de grafito mezclado con agitación sónica.	44
4.2. Actividad enzimática para cada prueba. Partículas adheridas utilizando una malla.	45
4.3. Actividad enzimática para cada prueba. Pruebas a diferentes temperaturas.	46
5.1 Limite de detección de métodos usuales para la determinación de la actividad.	58

## *Agradecimientos*

El presente trabajo se realizó bajo el apoyo económico del CONACYT, por lo cual se le agradece, ya que me dio la oportunidad de continuar con mis estudios de posgrado.

Se le agradece al Dr. Benjamín Valdez, Director del Instituto de Ingeniería, quien me abrió las puertas de la institución y proporcionó los medios e instalaciones necesarias para llevar este trabajo a cabo.

A mi directora de tesis, Dra. Margarita Stoytcheva, por darme la oportunidad de desarrollarme en el campo de la investigación, compartir sus conocimientos y siempre guiar mi preparación profesional. A mi Co-directora de tesis, Dra. Gisela Montero Alpírez, por su apoyo constante durante toda la etapa de esta investigación y pese a sus ocupaciones siempre atender mis inquietudes.

A mis compañeros: José Ramón Ayala, Laura Pérez, Marcos Coronado y Michelle Arredondo por su apoyo y dedicación son un ejemplo a seguir en mi formación profesional. A mis padres y hermano, sin cuya ayuda no tendría la oportunidad de desarrollar mis metas. A mis mejores amigos: Daniel Avalos, Moisés Fernández, Saúl Islas y José Luis Ruiz gracia a sus valiosos consejos me inspiran a seguirme superando cada vez más. Y un agradecimiento especial a mi pareja Karla Yetzeth Cota quien siempre me ha brindado un apoyo incondicional y gran motivación en esta etapa de mi preparación.

## *Resumen*

Las lipasas (triacilglicerol acilhidrolasa; EC 3.1.1.3) están entre las enzimas de uso más común en aplicaciones biotecnológicas, ya que son capaces de catalizar muchas reacciones. Ello ha causado que se conviertan en catalizadores valiosos en diferentes aplicaciones industriales y recientemente han sido utilizadas en la producción de biodiesel. La identificación de nuevas fuentes de lipasas con patrones únicos de la selectividad para cada reacción, ha generado un gran interés en el desarrollo de herramientas de detección de la actividad enzimática.

En este trabajo se describe un método espectrofotométrico y un método gravimétrico para la medición de la actividad enzimática de las lipasas.

El método espectrofotométrico está basado en el cambio de absorbancia de un triglicérido cargado con nanopartículas dispersado sobre una lámina de polietileno tereftalato (PET), el cambio en la absorbancia es proporcional a la actividad enzimática. El desarrollo del método gravimétrico se basa en la colocación de una película de un triglicérido sobre la superficie del electrodo de un sensor piezoeléctrico gravimétrico como lo es la microbalanza de cristal de cuarzo (QCM). Al degradarse el triglicérido, la frecuencia de oscilación de la QCM aumenta, siendo esto una medida directa de la pérdida de masa y la actividad enzimática.

Se lograron determinar las condiciones óptimas para el desarrollo de cada uno de los métodos así como curvas de calibración para la determinación de la actividad de la lipasa a diferentes concentraciones de la enzima. Desarrollando así dos métodos para la determinación directa de la actividad de la enzima lipasa, que resultan ser sencillos, rápidos, sensibles, confiables y un costo relativamente menor a métodos tradicionales.

# 1. Introducción

## ***1.1 Planteamiento del problema***

Una gran cantidad de enzimas son utilizadas en la industria, siendo de estas la mayoría de origen microbiano. Debido a las mejoras en el conocimiento de las reacciones bioquímicas, los procesos de fermentación y los métodos de recuperación, un creciente número de enzimas pueden ser producidas exitosamente. La utilización en diferentes industrias (farmacéutica, papelera, de alimentos, de detergentes), de enzimas como la lipasa ha venido en aumento en los últimos años. Más de 100 lipasas se han caracterizado hasta cierto punto, y más de 30 se encuentran disponibles comercialmente. La identificación de nuevas fuentes de lipasas con patrones únicos de la selectividad para cada reacción hace necesaria la determinación de la actividad catalítica para cada lote de lipasas, lo cual ha creado la necesidad de buscar nuevos métodos de determinación de actividad enzimática que no requieran un procedimiento elaborado en donde las determinaciones se puedan realizar en una manera rápida, que no necesiten equipo muy costoso o personal especializado, permitiendo disminuir el costo de la determinación y aplicar el método en cualquier laboratorio básico, cuya sensibilidad permita determinar la actividad a diferentes concentraciones de la enzima y que ofrezca resultados confiables.

## ***1.2 Justificación***

Hoy en día, se conocen cerca de 4000 tipos de enzimas, de las cuales cerca de 200 se encuentran para uso comercial. Además, la capacidad de las enzimas de catalizar una gran variedad de reacciones y tener una gran selectividad de sustratos a causada un aumento en las enzimas utilizadas comercialmente. En la producción de nuevas enzimas los métodos adecuados para el análisis de la actividad son requisitos previos para la purificación e identificación de la especificidad de la enzima.

Se han publicado diversos análisis para la determinación de la actividad de la lipasa, los cuales aunque suelen ser utilizados comúnmente, presentan diversas desventajas. Debido a que la mayoría de los métodos establecidos requieren la preparación de emulsiones y un procedimiento elaborado al momento de realizar la reacción enzimática, el tiempo que se requiere para la desarrollo de estos ensayos es considerablemente largo. Otra de las desventajas comunes en ensayos tradicionales es la utilización de sustratos no específicos para la enzima lipasa, los cuales pueden llegar a ser costosos o difíciles de obtener. Al no existir un método que supere las ventajas y desventajas de los ensayos actuales la búsqueda de nuevos métodos para la determinación de la actividad enzimática sigue siendo un objetivo en la investigación de tecnología enzimática. En este trabajo se presenta el desarrollo de dos métodos distintos para la determinación de la actividad enzimática de la lipasa, los cuales pueden ser utilizados en ensayos de actividad de manera directa, rápida, sensible y a un bajo costo, en comparación con métodos ya establecidos.

### ***1.3 Objetivo de la investigación***

Desarrollo de dos métodos basados en gravimetría y espectrofotometría para la determinación directa de la actividad de la enzima lipasa, que no requieran un procedimiento elaborado a un costo competitivo, cuya sensibilidad permita determinar la actividad a diferentes concentraciones de la enzima y que ofrezca resultados confiables, a manera de poder aplicarlos en ensayos cotidianos.

#### ***1.3.1 Objetivos específicos***

- Desarrollo de un método para la determinación directa de la actividad de la lipasa, basado en un método espectrofotométrico

- Desarrollo de un método para la determinación directa de la actividad de la lipasa, basado en un método gravimétrico utilizando una microbalanza de cristal de cuarzo (QCM).
- Estudiar los parámetros operacionales del método para la cuantificación de la actividad de la lipasa en condiciones de concentración de sustrato, temperatura y pH. Para ambos métodos.
- Elaboración de curva de calibración para la determinación de la actividad enzimática de la lipasa a diferentes concentraciones. Para ambos métodos.

### *1.4 Hipótesis*

La presente investigación describe dos métodos diferentes a partir de los cuales será posible determinar la actividad enzimática de la enzima lipasa.

Para el método espectrofotométrico:

H1: La disminución de la luz absorbida por la celda espectrofotométrica es proporcional a la actividad enzimática.

H2: La utilización de nanopartículas amplificará el cambio en la luz absorbida por la celda.

Para el método gravimétrico:

H1: El aumento en la frecuencia de oscilación de la QCM es proporcional a la actividad enzimática.

H2: La utilización de nanopartículas amplificará el cambio en la frecuencia de oscilación de la QCM.

## 2. Marco Teórico

## ***2.1 Enzimas***

Las enzimas son los catalizadores de las reacciones de los sistemas biológicos, cuyas dos principales características son la extrema especificidad y la increíble velocidad de reacción [1].

En la actualidad las enzimas o biocatalizadores pueden ser clasificados en dos grandes categorías según su actividad y los volúmenes de producción. En la primera se ubican aquellas que tienen gran actividad biológica y por lo tanto sus volúmenes de producción son pequeños, como ejemplo se pueden mencionar las enzimas utilizadas en la industria farmacéutica y de análisis clínico [2].

La mayoría de las enzimas que son comercialmente importantes se producen a partir de un número limitado de microorganismos. Los microorganismos producen una enorme gama de enzimas potencialmente útiles, muchas de las cuales son segregadas al exterior celular. Por otra parte, son capaces de desarrollarse fácil y rápidamente en su medio de cultivo y la tecnología al respecto, a gran escala, se encuentra hoy bien establecida [3].

Las enzimas se usan extensivamente en la industria: proteasas y lipasas se incluyen en detergentes; amilasas y glucosa isomerasas se utilizan en la obtención de jarabes de glucosa o fructosa a partir de maíz. Todas ellas presentan una gran eficiencia cuando son empleadas en la industria. Las enzimas microbianas son más usadas que las enzimas derivadas de plantas o animales, por la variedad de actividades catalíticas, la posibilidad de producir grandes cantidades empleando manipulación genética y el rápido crecimiento de los microorganismos. Las enzimas microbianas presentan mayor estabilidad que las enzimas extraídas de plantas y animales; así mismo su producción es más conveniente y segura [4].

Las lipasas (triacilglicerol acilhidrolasa; EC 3.1.1.3, figura 2.1) están entre las enzimas de uso más común en aplicaciones biotecnológicas [5]. Su ventaja frente a los catalizadores químicos clásicos es que exhiben una mejor especificidad de sustrato y operan en condiciones de reacción más suaves. Además, el hecho de que conservan su actividad en disolventes orgánicos y que son capaces de catalizar distintos tipos de reacciones, amplía su gama de aplicación [6].

Muchas lipasas son activas en disolventes orgánicos donde catalizan una serie de reacciones útiles que incluyen esterificación, transesterificación, acilación regioselectiva de glicoles y mentolados, y la síntesis de péptidos y otras sustancias químicas [6].

Su principal uso es en la hidrólisis de triglicéridos a ácidos grasos y glicerina, ello ha causado que se conviertan en catalizadores valiosos en diferentes aplicaciones industriales, tales como: aditivos en la formulación de detergentes, en la industria alimenticia para la elaboración de productos dietéticos con bajo nivel de grasas y colesterol, en la industria del papel con el objetivo de eliminar la cera de la pulpa del papel, en la industria farmacéutica en la obtención de moléculas bioactivas, así como en procesos de síntesis química para la obtención de compuestos ópticamente puros, modificación de grasas y otros lípidos por hidrólisis y esterificación [7].



Figura 2.1. Estructura de la enzima lipasa (triacilglicerol acilhidrolasa).

Estas enzimas hidrolíticas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y están presentes en los procesos metabólicos degradables de algunas plantas y animales. Son producidas por un gran número de microorganismos a partir de los cuales se obtienen usualmente para fines comerciales, un ejemplo típico son las lipasas producidas por los hongos *Aspergillus niger* y *A. fumigatus* [7].

### ***2.1.1 Actividad enzimática***

La actividad enzimática es una propiedad específica para cada tipo de enzima, la cual es medida por el aumento de la tasa de conversión de una reacción química para una enzima y reactantes específicos.

La actividad enzimática está definida como la cantidad de enzima que puede convertir cierta cantidad de reactivos en productos en un periodo específico de tiempo bajo condiciones de temperatura y pH específicas [8].

La comisión internacional de enzimas a adaptado una unidad estándar de actividad enzimática llamada unidad internacional de actividad enzimática (U). La unidad está definida por la cantidad de enzima que puede convertir 1  $\mu\text{mol}$  de sustrato en producto por minuto a 25°C [8].

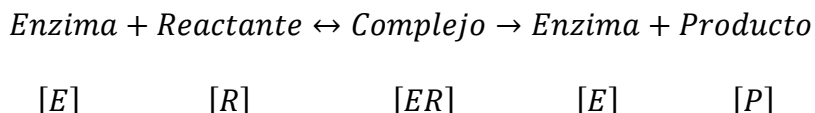
$$1 \text{ Unidad de Actividad (U)} = 1 \mu\text{mol}/\text{min}$$

En la caracterización de nuevas enzimas se utiliza también el concepto de actividad específica, la cual está definida como el número de unidades de actividad enzimática por miligramos de proteína.

$$\text{Actividad Específica} = \frac{\text{Unidades de Actividad}}{\text{mg de proteina}}$$

### 2.1.2 Aplicaciones de las lipasas como catalizadores

Las enzimas como catalizadores que son, aceleran las reacciones químicas, pero ellas mismas no resultan irreversiblemente modificadas. El aumento de la velocidad se atribuye al descenso de la energía de activación de la reacción. En términos simples, esto se explica por la unión física del reactante a la enzima en un “sitio activo”, formando un complejo metaestable. La energía de activación para la rotura de este complejo es considerablemente menor que para la rotura del reactante solo. Partiendo de este sencillo concepto, se puede proponer el esquema de reacción siguiente [3].



La etapa de formación del complejo se considera reversible, ya que el complejo tiene un estado energético semejante a la mezcla enzima-reactante. La rotura subsiguiente del complejo para rendir los productos se considera exotérmica, esta etapa puede ser prácticamente irreversible en muchos casos [3].

Las lipasas son muy diferentes en lo que respecta tanto a sus orígenes (que puede ser de bacterias, hongos, mamíferos, etc) y sus propiedades, y pueden catalizar la hidrólisis, o la síntesis, de una amplia gama de diferentes ésteres carboxílicos y liberar ácidos orgánicos y glicerol. Todos ellos muestran una actividad muy específica hacia sustratos glicéridos [9].

Debido a su capacidad para hidrolizar grasas, las lipasas han encontrado un uso principal como aditivos en la lavandería industrial y detergentes domésticos. Las lipasas en detergentes son especialmente seleccionadas para satisfacer los requisitos siguientes: (1) una baja especificidad de sustrato, es decir, una capacidad de hidrolizar las grasas de distintas composiciones, (2)

capacidad para resistir las condiciones de lavado relativamente duras (pH 10-11, 30-60°C), (3) capacidad para soportar agentes tensioactivos y enzimas dañinas, que son ingredientes importantes de las formulaciones de muchos detergentes [9].

Las grasas y aceites son constituyentes importantes de los alimentos. El valor nutricional y las propiedades físicas de un triglicérido están muy influenciados por factores tales como la posición de los ácidos grasos en el esqueleto de glicerol, la longitud de cadena del ácido graso, y su grado de insaturación. Las lipasas nos permiten modificar las propiedades de los lípidos mediante la alteración de la localización de cadenas de ácido graso en el glicérido y sustitución de uno o más de los ácidos grasos con los nuevos. De esta manera, un lípido relativamente barato y menos deseable se puede modificar para un valor más alto de grasa [9].

Las lipasas se han utilizado con éxito como catalizador para la síntesis de ésteres. Los ésteres producidos a partir de cadena corta de ácidos grasos tienen aplicaciones como agentes aromatizantes en la industria alimentaria. Ésteres de metilo y de etilo de los ácidos de cadena larga se han utilizado para enriquecer combustibles como el diesel [9].

Se utilizan lipasas en las reacciones de lipofilización, para insertar un radical lipófilo a uno hidrofílico, tal como azúcar, aminoácidos y proteínas o compuestos fenólicos. Un buen ejemplo es la lipofilización de sustratos de azúcar con el fin de mejorar la solubilidad de dicho azúcar en el disolvente seleccionado [10].

Aunque las lipasas están diseñadas por la naturaleza para la disociación hidrolítica de los enlaces éster del triacilglicerol, las lipasas pueden catalizar la reacción inversa (síntesis de éster) en un entorno con bajo nivel de agua. La hidrólisis y esterificación pueden ocurrir simultáneamente en un proceso conocido como interesterificación. Dependiendo de los sustratos, las lipasas pueden

catalizar acidólisis (donde un radical acilo es desplazado entre una acilglicerol y un ácido carboxílico), alcoholisis (donde un radical acilo es desplazado entre una acilglicerol y un alcohol), y la transesterificación (donde dos radicales acilo se intercambian entre dos acilgliceroles) [1]. Bajo determinadas condiciones, la cantidad de agua en la mezcla de reacción determina la dirección de la reacción catalizada por lipasa. Cuando hay poca o no hay agua, sólo la esterificación y transesterificación se favorecen [9].

### ***2.1.3 Mecanismo de reacción de la hidrólisis catalizada con lipasa.***

La hidrólisis de un triglicérido catalizada por la lipasa es un proceso enzimático que se produce en condiciones heterogéneas. Este proceso interfacial único es debido a tres dominios que caracterizan a las lipasas: Es capaz de distinguir al sustrato al contacto con su superficie, el dominio “hidrófobo” es responsable de extraer una molécula de sustrato y su conexión con la parte "funcional", que es el sitio real de la actividad catalítica de moléculas de enzima.

El área funcional de la lipasa se compone de tres aminoácidos Ser, His y Asp (donde Ser representa al aminoácido serina, His a la histiadina y Asp al ácido aspártico), dichos aminoácidos están presentes en prácticamente la totalidad de las lipasas (aunque en algunas de ellas el ácido aspártico es sustituido por el glutámico) [11].

La acción enzimática de las lipasas sobre el sustrato es un resultado de un ataque nucleófilo sobre el átomo de carbono del carbonilo de los grupos éster[11]. Las figuras 2.2 y 2.3 muestran el mecanismo de reacción para la hidrolisis de un triglicérido por medio de la lipasa.

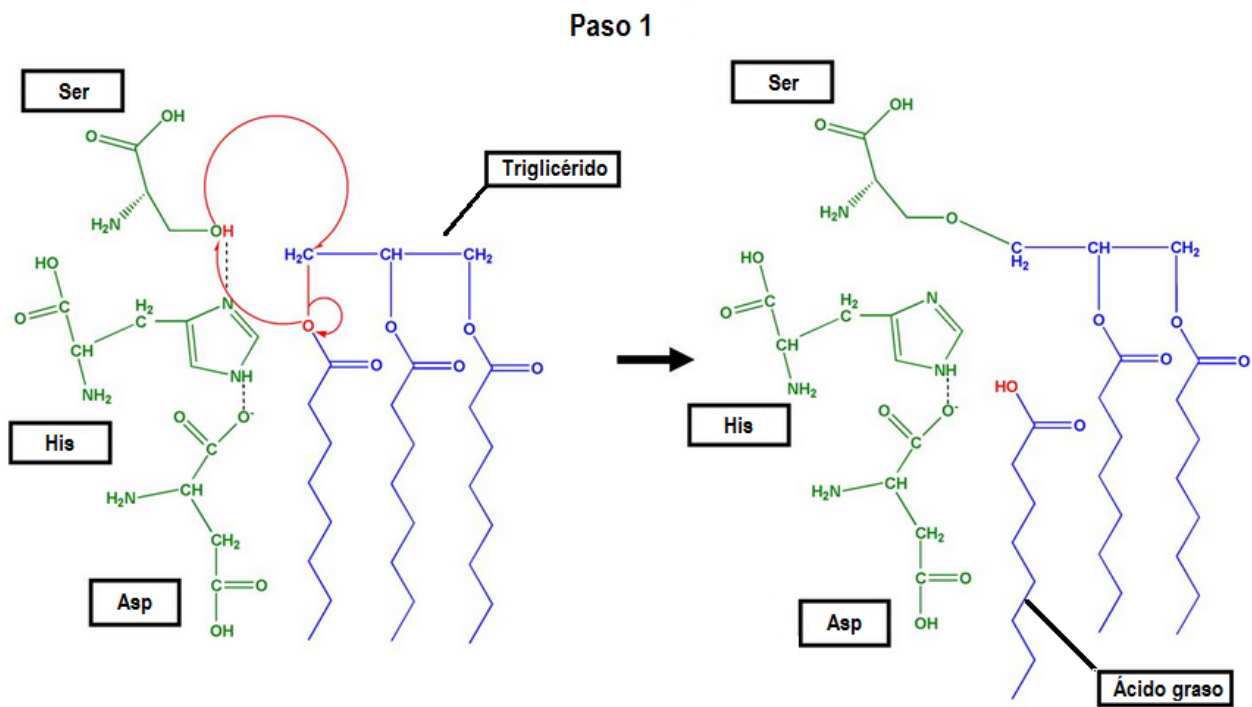


Figura 2.2. Paso 1 en la hidrólisis de un triglicérido por la lipasa.

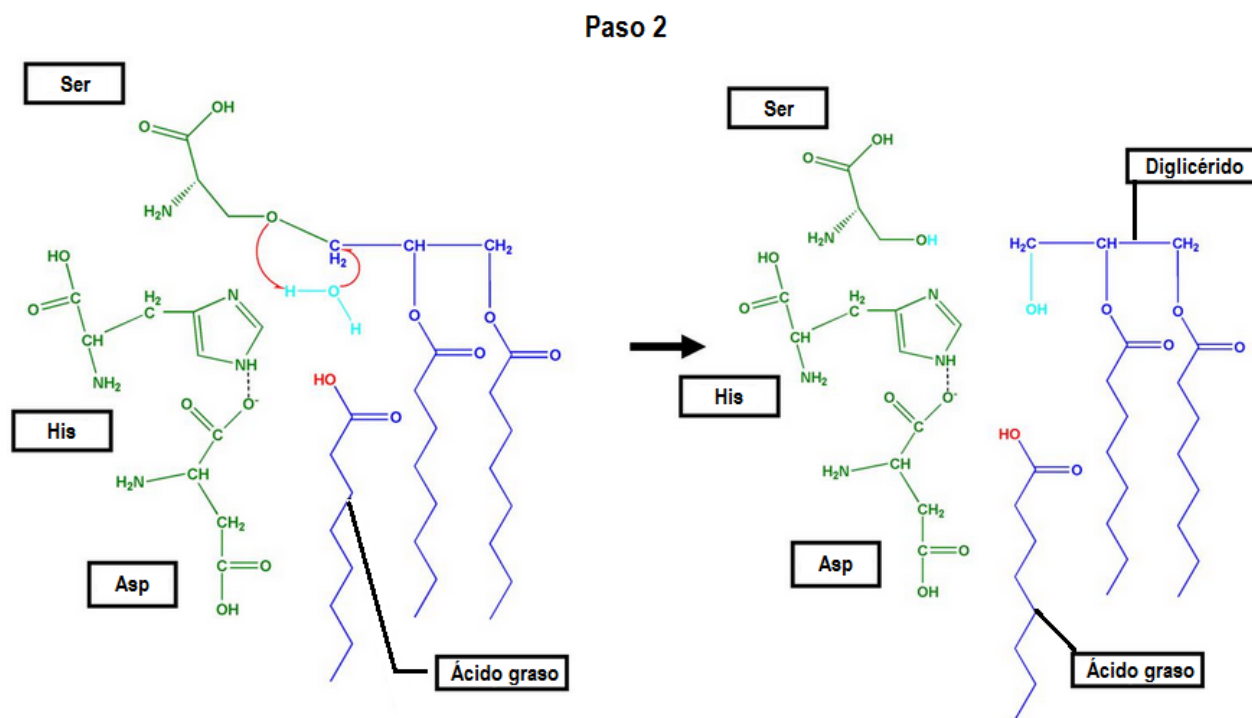


Figura 2.3. Paso 2 en la hidrólisis de un triglicérido por la lipasa.

El primer paso de la reacción se produce con el ataque nucleófilo al primer carbono del glicerol por la cadena lateral Ser. El oxígeno que estaba involucrado en el enlace éster se convierte al grupo saliente y es protonizado por el hidrógeno de la cadena Ser que se ha retirado desde el grupo hidroxilo para neutralizar su carga negativa. Con la adición del ion hidrógeno al oxígeno del producto de ácido graso de la primera posición está completamente formado y libre. El glicerol permanece unido al oxígeno de la cadena Ser, la cual debe ser removida si la enzima sigue siendo funcional.

En el segundo paso del mecanismo con el fin de completar la molécula de glicerol, es necesario que un grupo hidroxilo se una al primer carbono del glicerol y un ión de hidrógeno se una al oxígeno de la cadena Ser. Una molécula de agua a temperatura ambiente proporciona estos componentes necesarios. La molécula de agua, a través de la interacción de hidrógeno, se encuentra en su forma disociada. El ion hidronio tiene un momento dipolar muy grande y actúa como un nucleófilo en el primer carbono del glicerol. El oxígeno de la cadena Ser, en este caso, es el grupo saliente. La cadena Ser cargada negativamente es rápidamente protonizada por el ión de hidrógeno que vino del agua. Ahora está formado el producto que es un diglicérido. El puente de hidrogeno entre el nitrógeno aromático de la cadena His y el grupo hidroxilo en la cadena Ser es reformado y la enzima se encuentra en su orientación original, listo para otra reacción.

La siguiente reacción de hidrólisis se produce para catalizar el diglicérido recién formado en un ácido graso y un monoglicérido. El mecanismo en este caso es el mismo que el de la hidrólisis de los triglicéridos, excepto que los ataques nucleófilos se llevan a cabo en el tercer carbono del glicerol, y otra molécula de agua se utiliza. Después de este mecanismo, el monoglicérido y el nuevo ácido graso formado se mueven del sitio activo, y la enzima se arma para el triglicérido siguiente.

#### 2.1.4 Aceite de oliva como sustrato para la lipasa

El uso del aceite de oliva como sustrato para ensayos de actividad enzimática de la lipasa ha sido estudiado extensamente y se presenta como uno de los sustratos más compatibles con este tipo de enzima. El aceite de oliva es un alimento altamente energético, aporta 9 kcal/g provenientes de sus ácidos grasos, de los cuales el ácido oleico representa del 68-81.5%, siendo por ello el aceite considerado una grasa monoinsaturada [12].

Los ácidos grasos en el aceite de oliva están distribuidos en triglicéridos. Los triglicéridos son ésteres provenientes de la unión del trialcohol glicerina (1, 2, 3-propanotriol), con ácidos grasos como el ácido oleico. El triglicérido más representativo del aceite de oliva es la trioleína (Figura 2.4) [12]. La trioleína es un sustrato para la lipasa altamente específico, el alto contenido de trioleína en el aceite de oliva y su menor costo hace que sea más adecuado en ensayos de la actividad de la lipasa.

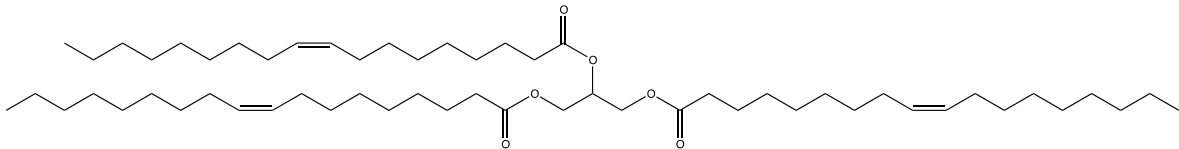


Figura 2.4. Molécula de trioleína.

De la hidrólisis de aceite de oliva catalizada con lipasa se desprenden ácidos grasos y glicerina, principalmente ácido oleico (Figura 2.5) y glicerol (Figura 2.6) respectivamente.

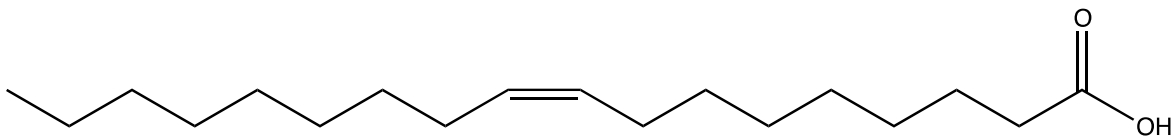


Figura 2.5. Molécula de ácido oleico.

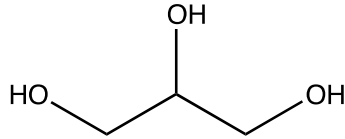


Figura 2.6. Molécula de Glicerol.

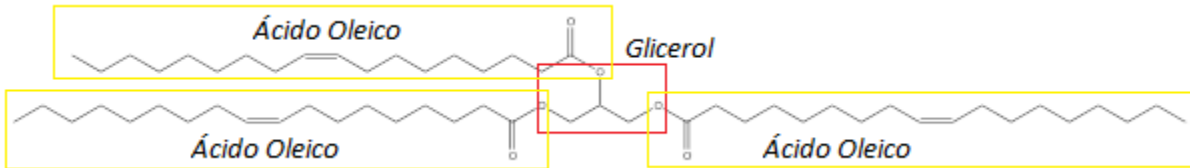


Figura 2.7. Descomposición de una molécula de trioleína en ácidos oleicos y glicerol.

## ***2.2 Métodos de determinación de actividad enzimática de la lipasa***

Con el descubrimiento de nuevas enzimas o alteración de las propiedades de las enzimas, existe un interés primordial en el desarrollo de herramientas de detección que se pueden utilizar para buscar el mejor rendimiento con respecto a la propiedad específica [13], como es la actividad enzimática. Muchos de los métodos disponibles para la determinación de la actividad de la lipasa se han desarrollado para la industria [2], sin embargo, en el ser humano se encuentran lipasas como la lipoproteinlipasa (LPL) y la lipasa hepática (HL) las cuales juegan un rol central en el metabolismo de los lípidos en el cuerpo humano y la deficiencia de estos puede provocar diversas enfermedades como la hipercolesterolemia y la hipertrigliceridemia, las cuales resultan en peligrosos problemas cardiacos [14,15]. Lo cual hizo también necesario el desarrollo de métodos para la determinación de la actividad de las enzimas en el cuerpo humano.

Se han publicado diversos análisis para la determinación de la actividad de la lipasa. Podemos analizar la actividad de las lipasas monitoreando tanto la cantidad de ácidos grasos como la cantidad de glicerol liberada por el triglicérido debido a la reacción de hidrólisis [13].

### ***2.2.1 Método volumétrico***

El método se basa en la determinación volumétrica de los ácidos grasos libres liberados de triglicéridos por medio de la hidrólisis catalizada por la lipasa. Las técnicas aplicadas implican la incubación de la muestra y titulación alcalina en el punto final de la liberación de ácidos grasos o por valoración continua de los productos por medio de un potenciómetro titulador. Los resultados dependen de la actividad de la lipasa. Un valorante comúnmente usado es hidróxido de sodio (NaOH). El método de punto final se conoce desde 1932, cuando se aplicó para la evaluación de la actividad de la lipasa sérica, utilizando fenolftaleína como indicador [16].

Sin embargo, el tiempo de incubación de 24 horas a 40 ° C, así como la rápida separación de la mezcla de emulsión de sustrato/solución enzimática ha limitado su utilización experimental y ha llevado a la modificación del método con el objetivo de reducir el tiempo de incubación y buscar la optimización de las condiciones experimentales [17]. Los sustratos ideales son los triglicéridos de cadena larga como trioleína y aceite de oliva [11]. Otro sustrato utilizado es la tributirina, que no es tan específico como lo es la trioleína, pero presenta la propiedad de formar dispersiones acuosas en la ausencia de emulsificantes [18]. El ácido butírico y butirato de sodio liberado son solubles en agua, en contraste con la trioleína, aceite de oliva y los productos de la lipólisis. Los triglicéridos de cadena larga requieren ser emulsificados, típicamente se utiliza goma arábiga.

A pesar de sus deficiencias: como el largo tiempo de análisis (2 determinaciones/h), la baja sensibilidad (1 mmol mL<sup>-1</sup>), las mediciones tediosas, y los errores debidos a la valoración incompleta, los métodos volumétricos para la determinación de la actividad de lipasas se mantiene en uso como un método de referencia.

## ***2.2.2 Métodos espectrofotométricos***

### *2.2.2.1 Colorimetría*

Ensayos colorimétricos se basan en la cuantificación de los productos de la lipólisis. Los ácidos grasos libres son convertidos en un jabón de color azul debido a la formación de complejos de cobre y ácidos grasos. Los productos finales coloreados se extraen mediante un disolvente orgánico y son evaluados por mediciones espectrofotométricas [19, 20]. Los numerosos intentos realizados para mejorar el método dio lugar a la reducción del tiempo de análisis (4 determinaciones / h) por el acortamiento del periodo de incubación y mediante la eliminación de los pasos de transferencia de fase [21-27]. El aumento de sensibilidad se consigue mediante la selección apropiada de los reactivos reveladores de color y disolventes orgánicos adecuados [28-30]. El método es específico para ácidos grasos y más sensible en comparación con el método de titulación. Los inconvenientes del método están relacionados con el uso de solventes orgánicos tóxicos.

### *2.2.2.2 Espectrometría visible*

Los métodos espectrofotométricos para la determinación de actividad de la lipasa hacen uso de sustratos sintéticos los cuales tras la hidrólisis catalizada por enzimas son transformados en productos capaces de ser detectados espectrofotométricamente. Los sustratos predominantes son los ésteres de p-nitrofenilo y naftilo de ácidos grasos de cadena larga y tioésteres.

La lipólisis de los ésteres de p-nitrofenilo (lauratos, palmitatos, oleatos) da lugar a p-nitrofenol de color amarillo, medido a 405-410 nm [31-43]. La deficiencia del método está relacionada con la dependencia del pH con el coeficiente de absorción del p-nitrofenol y la ausencia total de

absorción a valores ácidos de pH. Además, los ésteres de p-nitrofenol podrían desarrollar una hidrólisis no enzimática [44].

La hidrólisis de los ésteres de naftilo (naftilcaprilato, naftilacetato, naftilpropionato) producen naftol, en que el complejo formado con sales diazonium produce un color rojo y es medido a 560 nm [45-48].

Los tioésteres producen tioles que están acoplados con la reactivo de Ellman (2-Ácido nitro benzoico, DTNB) para obtener aniones TNB de color amarillo, evaluados a 412 nm [49-51]. Estos procesos han sido empleados para el desarrollo de rápidos y sensibles kits de ensayo de lipasa (40 a 1600 mU ml<sup>-1</sup>) [52,53], utilizando dimercaptopropanol tributirato (BALB) como sustrato.

Otro kit de ensayo de lipasa, basado en el método desarrollado por Panteghini [54] se propone por Randox [55]. El sustrato utilizado es el éster resorufina 1, 2-O-dilauril-racglicero-3-ácido glutárico-(6-metilresorufina) transformado en la hidrólisis enzimática en metil resorufina, que es cuantificado a 570 nm. La sensibilidad conseguida es 4 mU ml<sup>-1</sup>.

Un inconveniente común de los métodos espectrofotométricos mencionados es la baja especificidad de los sustratos de la enzima hacia los sustratos sintéticos análogos.

Existen métodos alternativos que se basan en la cuantificación del glicerol formado como resultado de la hidrólisis de los triglicéridos, de acuerdo con el siguiente esquema: degradación de acilglicerol; oxidación periódica de glicerol a formaldehído; conversión de formaldehído con ácido cromotrópico a un cromóforo violeta que es entonces cuantificado espectrofotométricamente [56].

Otros ensayos [57,58] hacen uso de una serie de reacciones enzimáticas acopladas, las cuales convierten el glicerol liberado en un colorante quinoneimina, el cual es determinado a 545 nm. Tal kit de ensayo fue desarrollado por Sigma [59].

Los métodos espectrofotométricos permiten efectuar 4 determinaciones / h, pero su número puede ser aumentado de 16-96 determinaciones/h utilizando sistemas automatizados.

### *2.2.2.3 Espectrometría Infrarrojo*

El método se basa en el análisis del espectro de infrarrojo por transformada de Fourier obtenido mediante la medición de la hidrólisis catalizada por lipasas de triglicéridos [60, 61]. Ésteres de ácidos grasos y los ácidos grasos libres se pueden evaluar basándose en su coeficiente molar de absorción y la ley de Beer. Debido a la dependencia con el pH de la frecuencia de absorción de carbonilo de los ácidos grasos libres, la actividad lipolítica debe cuantificarse preferentemente usando la frecuencia de absorción específica del éster carbonilo de 1730-1750  $\text{cm}^{-1}$  [62].

### *2.2.2.4 Espectrometría por Fluorimetría*

La fluorimetría es una técnica analítica sensible que permite el monitoreo continuo de la actividad enzimática. Los numerosos métodos fluorométricos para la determinación de la actividad de la lipasa se podrían clasificar como métodos en los que se utilizan sustratos cromogénicos, y métodos basados en la cuantificación de los ácidos grasos liberados después de su conversión en productos cromogénicos.

Una variedad de ésteres de ácidos grasos derivados de ácido parinárico [63-66], cumarínicos (umbeliferona) [67-71], compuestos pyrenic [72-75], resorufina [76], fluoresceína [77], etc son utilizados como sustratos cromogénicos.

El ácido parinámico es un cromóforo de origen natural, proporcionando fluorescencia a 432 nm con una longitud de onda de excitación a 320 nm. El método se aplicó con éxito para la medición de la actividad de lipasa pancreática con un límite de detección de 0,1 ng a pH 8. Un aumento significativo de la fluorescencia del ácido parinámico libre se observó en la presencia de detergentes [66]. El inconveniente de estos ensayos es la oxidación de los ácidos parinámicos por el oxígeno en la atmosférica [66].

Numerosos ésteres de ácidos grasos de la cumarina se sintetizaron y se ensayaron como sustratos cromogénicos para la lipasa [71, 78]. La sensibilidad alcanzada es 0.1-5 nmol [70]. Sin embargo, estos sustratos sufren de hidrólisis espontánea (a  $\text{pH} \geq 8.8$ ).

Al usar derivados de Acilglicerol pirenaico, los ácidos grasos libres liberados debido a la hidrólisis catalizada por la lipasa causan un cambio en la intensidad del pico de fluorescencia. El aumento de la intensidad del pico con el tiempo se correlaciona con la actividad de la lipasa. Según el procedimiento desarrollado por Marker Tecnologías Gene, la medición de la actividad de la lipasa puede llevarse a cabo utilizando el sustrato fluorescente 1, 2-dioleoil-3-(piren-1-il)-decanoylrac glicerol. Su hidrólisis forma el ácido graso fluorescente ácido pirenadecanoico [79]. Sin embargo, los derivados de acilglicerol pirenaico son también poco hidrolizados por lipasas [66, 74].

Otro kit de ensayo de lipasa ofrecido por Marker Tecnologías Gene se basa en el uso de la larga longitud de onda fluorescente del oleato resorufina. La liberación de resorufina por la hidrólisis se cuantificó mediante fluorimetría [80].

Otro método basado en hidrólisis catalizada por lipasa implica la conversión de ácidos grasos libres en productos cromogénicos utilizando rodamina B y la medición de la fluorescencia

emitida a 535 nm con una longitud de onda de excitación a 485 nm [81-83]. El método es rápido, podría ser automatizado, y permite la determinación simultánea de un gran número de muestras usando varios sustratos.

#### *2.2.2.5 Turbidimetría y nefelometría*

La turbidimetría es un método para determinar la concentración de una sustancia en una solución mediante la medición del cambio de la intensidad de la luz en la dirección de propagación del haz incidente, con referencia a una solución estándar. La cuantificación de la actividad de la lipasa se lleva a cabo midiendo la disminución con el tiempo en la absorbancia de una emulsión de triglicéridos, debido a la de-emulsificación con la liberación de ácidos grasos libres [84-91]. El método turbidimétrico de Neumann [85,86], fue comercializado por Boehringer-Mannheim.

Otra técnica consiste en el uso de sustratos como Tweens, determinando la actividad por un aumento de la absorbancia debido a la precipitación de los productos de la hidrólisis como sales de calcio [92,93]. Los métodos de turbidimetría utilizando Tweens resultan ser bastante sensibles, sin embargo, los Tweens no son sustratos específicos de las lipasas.

La nefelometría consiste en la medición de la intensidad de la luz dispersada. La determinación nefelométrica de la actividad de la lipasa podría ser realizada en un periodo de 2-4 min [92-94].

En general, la turbidimetría y la nefelometría son métodos muy convenientes para la evaluación rápida de la actividad de la lipasa. Los problemas que surgen y algunas soluciones han sido revisados por Tietz [90].

### ***2.2.3 Ensayos radioactivos***

Las dos técnicas principales aplicadas implican: (i) el uso de los sustratos de lipasa marcados y la cuantificación de los productos liberados, y (ii) el uso de sustratos no marcados y la determinación de los ácidos grasos libres marcados una vez liberados.

Los sustratos radiactivos comúnmente utilizados son oleiglicerol marcado con  $^{14}\text{C}$  o  $^3\text{H}$ , así como yodo-131 etiquetados análogos de triglicéridos [95-98]. La cantidad detectable del producto se encontró que era del orden de nanogramos [99].

El marcado de los ácidos grasos se lleva a cabo mediante el empleo de  $^{63}\text{Ni}$  [100].

Los Ensayos radioactivos son métodos analíticos específicos y sensibles. Sin embargo, no permiten el monitoreo continuo y requieren mucho tiempo, debido a los pasos de extracción implicados para eliminar los ácidos grasos. Además, hacen uso de sustancias radiactivas, que requieren de medidas de seguridad diferentes a las comúnmente utilizadas.

### ***2.2.4 Ensayos inmunológicos***

Los ensayos inmunológicos se conocen como técnicas altamente específicas y sensibles para la determinación de la actividad de lipasas. Estos métodos son de importancia principalmente para diagnósticos clínicos y están aplicados para la cuantificación de lipasas en suero y plasma, tejidos y cultivos celulares lisados, y duodeno [101-115]. Un número de kits clínicos basados en ensayos de ELISA se han desarrollado, y son útiles en el rango de hasta  $500 \text{ ng ml}^{-1}$  de lipasa [116-122]. Estas técnicas no son adecuadas para la evaluación de la actividad de lipasas originadas a partir de diversas fuentes, ya que requieren la selección de una amplia gama de

anticuerpos específicos. Además, la enzima podría formar agregados [123], lo que limita la precisión de los ensayos inmunológicos.

### **2.2.5 Conductimetría**

La evaluación conductimétrica de actividad de la lipasa se basa en la medición de la variación de la conductancia de una solución, debido al cambio de concentración de carga eléctrica como resultado de la liberación de ácidos grasos libres. Se obtuvieron resultados confiables utilizando Triacetina [124-126]. La Triacetina es un sustrato adecuado debido a su solubilidad en agua. Los límites de la conductividad equivalente de los aniones acetato liberados son mayores en comparación con la de los ácidos grasos de cadena larga, aumentando la sensibilidad de las determinaciones. El inconveniente de esta técnica es que la triacetina no es un sustrato específico de la lipasa y las mediciones conductimétricas sufren de dependencia de altas temperaturas.

### **2.2.6 Cromatografía**

La cromatografía es una técnica poderosa, muy adecuada para probar matrices complejas. Los métodos relacionados que se aplican actualmente para la medición de los lípidos y ácidos grasos libres puesto en libertad en la lipólisis son: cromatografía de capa fina, cromatografía de gases, y cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC).

El estado actual de análisis de lípidos por cromatografía en capa fina fue revisado recientemente por Fuchs et al. [127]. El método es sensible y permite la detección de picomoles de ácidos grasos [128].

Simples y rápidos métodos de cromatografía de gases para la determinación de la actividad de la lipasa usando tributirina como sustrato se describen por Kulkarni y Li [129]. Las técnicas

implican un tratamiento de procedimientos sencillos, un período de incubación corto, y sólo 6 minutos de tiempo de análisis después de la reacción enzimática.

Métodos de HPLC para el seguimiento de reacciones de lipasa fueron diseñados por Ergan y André [130]. Supervisión directa de la actividad de la lipasa por HPLC en medios micelares inversos la realizaron Mingarro et al. [131].

Un nuevo ensayo in vitro de la lipasa que supera las limitaciones del sustrato y pH de las técnicas convencionales fue desarrollado por Hao et al. [132]. Se basa en la cuantificación de ácidos grasos por cromatografía líquida-espectrometría de masas. Los ácidos oleicos enzimáticamente liberados de trioleína se aislaron de la mezcla de reacción por cromatografía de fase inversa, ionizado en un espectrómetro de masa en modo de electrospray negativo y se cuantificó con la ayuda del estándar interno de C<sup>13</sup>-ácido oleico. La actividad enzimática se midió por seguimiento de producciones de ácido oleico en puntos de tiempo múltiples. Sin embargo, las determinaciones cromatográficas siguen siendo costosas y consumen mucho tiempo. Además, requieren personal con experiencia y equipo de laboratorio sofisticados.

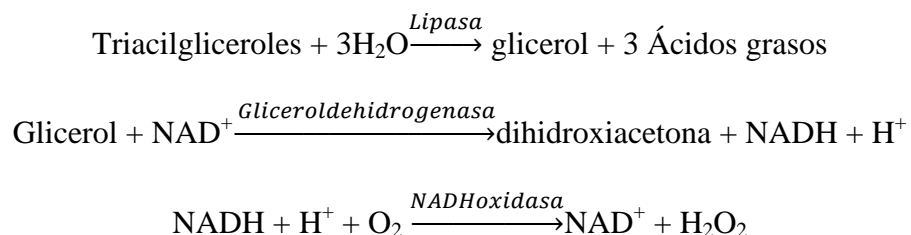
### ***2.2.7 Métodos basados en biosensores***

Los biosensores, de acuerdo con la definición de la IUPAC, son "Dispositivos que utilizan las reacciones bioquímicas específicas mediadas por enzimas aisladas, sistemas inmunológicos, tejidos, orgánulos o células enteras para detectar compuestos químicos por lo general, por medio de señales eléctricas térmicas u ópticas "[133].

Varios biosensores se han desarrollado para la determinación de los productos de lipólisis de sustratos de lipasa, utilizando enzimas inmovilizadas. Estos biosensores son ampliamente revisado por Starodub, 2006 [21].

Los biosensores para la determinación de triglicéridos recientemente diseñados incluyen: (i) los biosensores amperométricos, construido por co-inmovilización de la lipasa, la quinasa de glicerol, y glicerol-3 fosfato oxidasa sobre distintos soportes: acetato de celulosa [135], PVC [136], alcohol de polivinilo [137], cáscara de huevo [138], y una película de material compuesto de quitosano y nanopartículas de óxido de zinc [139] depositada sobre la superficie de un electrodo de Pt. En todos los casos la respuesta amperométrica es la corriente de oxidación de  $H_2O_2$ ; (ii) biosensores impedimétricos utilizando como soporte para la inmovilización de la lipasa utilizan nanotubos de polianilina depositados electroforéticamente (PANI-NT) en una película de indio-estaño-óxido sobre una superficie de vidrio. Las moléculas de ácidos grasos producidos durante la hidrólisis de triglicéridos provocan un cambio en la resistencia de transferencia de carga de la película PANI-NT en función de la concentración de triglicéridos [140], (iii) los biosensores potenciométricos y micromecánicos, basados respectivamente en un capacitor electrolito-aislante-semiconductor, y una microguía de polisilicio [141]; y (iv) transistor de efecto de campo enzimático, en base a lipasas inmovilizadas a través de nanopartículas magnéticas [142]. Sin embargo, sólo unos pocos biosensores se aplicaron a la determinación de la actividad de la lipasa. Tal sensor es un sensor capacitivo con una estructura de tipo sándwich:  $Au/S(CH_2)_{17}CH_3$ /sustrato/electrolito [143]. La actividad enzimática se cuantificó mediante el seguimiento de la velocidad de desorción de los productos de la lipólisis. La desorción se evalúa midiendo el incremento de la capacitancia de los electrodos. Un biosensor amperométrico para la evaluación de la actividad de la lipasa fue sugerido por Rejeb et al. [144]. Implica glicerol deshidrogenasa/NADH oxidase inmovilizado en la superficie de un electrodo modificado con una película impresa con Azul de Prusia.

El principio de la determinación se basa en las siguientes reacciones:



La señal analítica es la corriente de oxidación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, determinada con azul de Prusia como mediador, y proporcional a la concentración de glicerol, que es dependiente de la actividad de la lipasa. Las mediciones se realizan en el electrodo de bajo potencial, evitando así interferencias. La sensibilidad de los análisis es inferior a la lograda por cromatografía de gases, pero suficiente para la determinación de los niveles de triglicéridos en sueros biológicos y preparación de alimentos.

Un método muy conveniente para la determinación de la actividad de la lipasa se ha desarrollado recientemente por QSENSE, utilizando una microbalanza de cristal de cuarzo con disipación (QCM-D) [145]. Utilizando trioleína como substrato para la lipasa, se deposita trioleína sobre la superficie del electrodo de oro de la QCM-D. La degradación de la enzima de la película de trioleína se controló continuamente midiendo los cambios en la frecuencia y la disipación, y se correlacionó con la actividad de la lipasa.

Los biosensores son considerados como prometedoras herramientas analíticas, debido a la rapidez y la sensibilidad de las determinaciones, y al bajo costo de los equipos.

### **2.2.8 Otros métodos**

Un método de quimioluminiscencia, permitiendo la terminación de un único ensayo dentro de 5 min, y mostrar una sensibilidad y una repetibilidad superiores a las del método de titulación fue sugirió por Arima et al. [146]. Se utiliza el ácido láurico éster de 2-(4-hidroxifenil)-4,5-

difenilimidazol (HDI-laurate) como un sustrato, y se basa en la reacción de quimioluminiscencia del luminol-peroxidasa de rábano picante de peróxido de hidrógeno con HDI, que se libera desde el sustrato mediante hidrólisis enzimática. El método se aplicó para la determinación de la actividad de la lipasa en preparaciones farmacéuticas.

Una novedosa técnica de electroforesis basado en gel para la actividad de enzimas lipolíticas, combinados con imágenes de fluorescencia, y la identificación de las proteínas etiquetadas por MS/MS fue desarrollado por Morak et al. [147]. el estudio representa la primera aplicación de esta tecnología para análisis comparativo de las lipasas y esterasas.

En este grupo también se incluyen los métodos diseñados para detección de actividad de la lipasa y la investigación cinética de la lipólisis, en lugar de para la cuantificación de la actividad de lipasa. Los métodos comprende: Numerosos ensayos de placa [83, 148, 149], mediciones de tensión superficial [150, 151], microscopía electrónica [152, 153], microscopía de fuerza atómica [154, 155], y resonancia magnética nuclear [156].

Tomando en cuenta que ninguno de los métodos antes mencionados cumple en su totalidad con los requisitos analíticos, el método de elección se debe seleccionar basada en la finalidad del análisis, el equipo disponible de laboratorio y el personal calificado. Los esfuerzos actuales son enfocados a mejorar la rapidez, la sensibilidad y la selectividad de los métodos para la determinación de la actividad enzimática.

### ***2.3 Espectrometría de absorción***

La espectroscopia emplea la interacción de la radiación con la materia para determinar información sobre una muestra dada. Habitualmente la muestra se estimula en cierto modo al aplicar energía en la forma de calor, energía eléctrica, luz, partículas o una reacción química.

En la espectroscopia de absorción se mide la cantidad de luz absorbida en función de la longitud de onda, lo que proporciona información cuantitativa y cualitativa sobre la muestra.

La ley de absorción, también llamada ley de Beer-Lambert, indica cuantitativamente la forma en que el grado de atenuación depende de la concentración de las moléculas absorbentes y de la longitud del trayecto en el que ocurre la absorción. Cuando la luz atraviesa un medio que contiene un analito absorbente, disminuye su intensidad como consecuencia de la excitación del analito (Figura 2.8) [157].

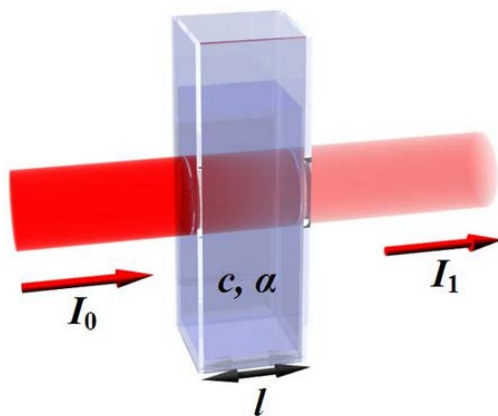


Figura 2.8. Representación de absorción.

Según la ley de Beer, la absorbancia es directamente proporcional a la concentración de la especie absorbente  $c$  y a la longitud de trayecto  $b$  del medio de absorción, como se expresa en la siguiente ecuación:

$$A = abc \quad \text{Ecuación 2.1}$$

Donde  $a$  es la constante de proporcionalidad llamada absorptividad. Cuando se expresa la concentración con unidades de moles por litro y  $b$  en centímetros, la constante de proporcionalidad se llama absorptividad molar y recibe el símbolo especial  $\epsilon$  (Ecuación 2.2).

$$A = \epsilon bc \text{ Ecuación 2.2}$$

La ley de Beer, como se expresa en la ecuación anterior puede emplearse de diversas maneras. Es posible calcular la absorptividad molar de especies cuando se conoce la concentración. Puede emplearse el valor medio de la absorbancia para obtener la concentración si se tienen los valores de absorptividad y longitud de trayecto. Se pueden utilizar soluciones patrón del analito en el mismo disolvente y a temperatura similar para obtener la absorptividad en el momento del análisis. Lo más frecuente es recurrir a una serie de soluciones patrón del analito para preparar una curva de calibración, de  $A$  frente a  $c$  y obtener una ecuación de regresión lineal [157].

#### ***2.4 Microbalanza de cristal de cuarzo (QCM)***

La microbalanza de cristal de cuarzo (QCM, por sus siglas en inglés) es un dispositivo altamente sensible a las pequeñas variaciones de masa que en ella ocurren. Esto se debe a los cambios que experimenta la frecuencia de resonancia del cristal de cuarzo, material piezoeléctrico, al hacerlo su masa. Algunas microbalanzas poseen una resolución de hasta 0,05  $\eta\text{g}$ . Las QCM poseen una mayor sensibilidad que las microbalanzas analíticas convencionales que se utilizan actualmente en los laboratorios. Esta gran sensibilidad a la masa se explica en la elevada aceleración que actúa sobre el film depositado.

Las QCM (Figura 2.9) están constituidas por un delgado disco de cristal de cuarzo al cual se le fijan los electrodos para la estimulación y sensado. La aplicación de un potencial eléctrico externo al material piezoeléctrico, produce tensiones mecánicas internas. Un campo eléctrico oscilante aplicado en las caras del dispositivo induce una onda acústica que se propaga a través del cristal [158].



Figura 2.9. Microbalanza de cristal de cuarzo

Desde que el uso de resonadores de cristal de cuarzo para aplicaciones de control de frecuencia en equipos radio-comunicación comenzó, ha sido conocido el efecto de materiales externos depositados sobre la superficie de resonancia. Sin embargo, la relación cuantitativa de la masa y la frecuencia no fue establecida sino hasta 1959. La posibilidad de usar la QCM como un dispositivo medidor cuantitativo de la masa fue explorada por primera vez por Sauerbrey [159]. La disminución de la frecuencia de resonancia de un corte delgado de un cristal de cuarzo resonante es proporcional a la película de masa depositada en la superficie, descrita por la siguiente ecuación:

$$\Delta f = -f_0^2 \frac{\Delta m}{N \cdot \rho \cdot A} \quad \text{Ecuación 2.3}$$

Donde  $f_0$  es la frecuencia de oscilación inicial;  $A$  es el área del cristal y  $\rho$  es su densidad;  $N$  es una constante.

Es posible simplificar la ecuación de Sauerbrey a una simple relación del cambio de frecuencia respecto al cambio en la masa a través de una constante de proporcionalidad.

$$\Delta f = -K\Delta m \quad \text{Ecuación 2.4}$$

Hay tres supuestos que deben cumplirse para que la relación Sauerbrey pueda aplicarse. En primer lugar, la masa adsorbida sobre la microbalanza debe ser relativamente más pequeña en relación a la masa del cristal de cuarzo; segundo, la masa adsorbida debe ser absorbida rígidamente, y tercero, la masa adsorbida se distribuye uniformemente sobre el área activa del cristal.

Los sistemas comerciales están diseñados para medir de forma fiable los cambios de masa hasta 100 mg, mientras que el mínimo cambio detectable en masa suele ser  $1 \text{ ng cm}^2$ . El reto planteado es la adaptación de la química de la superficie de modo que el dispositivo puede ser un detector de masas específico y no simplemente una microbalanza. El espesor del cristal determina la frecuencia de resonancia, que a su vez determina la sensibilidad a la masa. El cristal y sus electrodos están incorporados en un circuito oscilador de retroalimentación positiva. Un contador de frecuencia puede ser empleado para realizar mediciones (Figura 2.10). La eventual aplicación de la QCM debe ser cuidadosamente abordado antes de comprar un QCM [160].

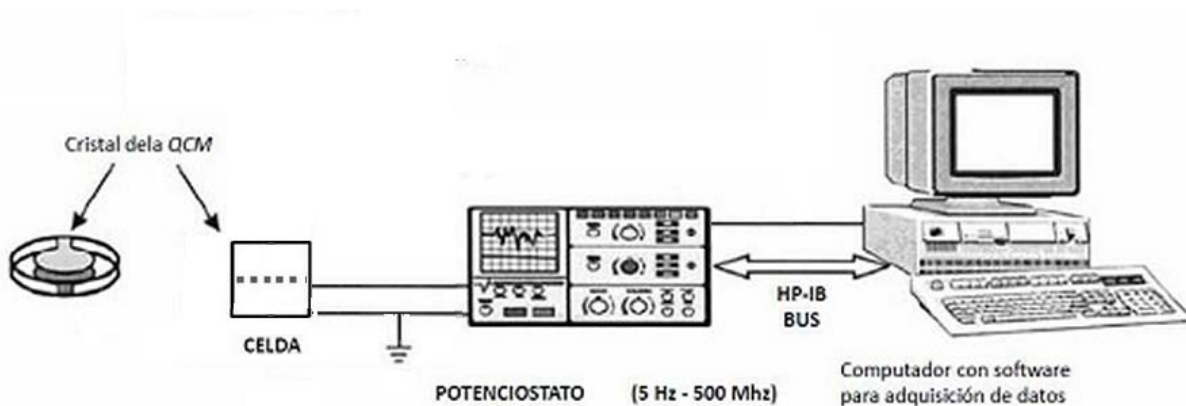


Figura 2.10. Montaje típico de equipo experimental de microbalanza de cristal de cuarzo.

# 3. Metodología

### ***3.1 Método espectrofotométrico***

El método está basado en la actividad catalítica de la lipasa que en contacto con aceite de oliva separa al triglicérido en glicerina y ácido oleico. Sobre una lámina de polietileno tereftalato (PET) se coloca una capa delgada de aceite de oliva con nanopartículas. Dentro de una celda espectrofotométrica se coloca una solución enzimática y posteriormente una lámina que fue preparada con sustrato y nanopartículas (Figura 3.1). Esta celda es colocada dentro de un espectrofotómetro UV-vis y se mide la absorbancia por un periodo determinado de tiempo. Las nanopartículas actúan como una barrera para el haz de luz del espectrofotómetro, conforme la enzima acelera la reacción de hidrolisis en el sustrato, las nanopartículas van siendo removidas por la degradación del aceite, resultando en la amplificación de la intensidad de luz que pasa a través de la muestra, provocando una disminución en la absorbancia, siendo proporcional a la actividad enzimática.

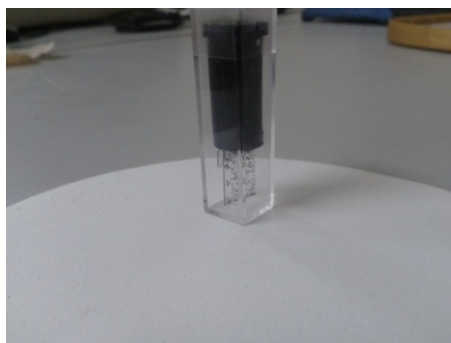


Figura 3.1. Lámina de prueba dentro de una celda espectrofotométrica.

#### ***3.1.1 Materiales y equipo.***

En los ensayos se utilizaron láminas de polietileno tereftalato transparente (PET). Las dimensiones de las láminas de prueba fueron 35x10x0.5 mm con un área de recubrimiento del sustrato de 6x10 mm en el extremo de la tira.

Las mediciones espectrofotométricas se realizaron utilizando espectrofotómetro UV-visible de Gilford Stasar III (Figura 3.2). Imágenes de microscopía óptica se obtuvieron con un microscopio XJP-H100. Imágenes de AFM se registraron con un AFM/STM 8 (Bruker). La longitud que atraviesa el haz de luz a través de la celda de prueba fue de 1 cm.



Figura 3.2. Espectrofotómetro UV-visible de Gilford Stasar III.

### **3.1.2 Reactivos**

La lipasa de *Rhizopus arrhizus* (~ 10 U mg<sup>-1</sup>) se adquirió de Sigma. La actividad enzimática se verificó aplicando un ensayo volumétrico. Los datos obtenidos (10.4 U mg<sup>-1</sup>) bajo diferentes condiciones de almacenamiento fueron consistentes con la establecida por el fabricante.

Se preparó una solución tampón de fosfato (PBS) (0.1 M, pH 8), obtenida disolviendo las cantidades apropiadas de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> en agua destilada. La solución tampón se utilizó como blanco en las pruebas base y para preparar una solución enzimática con una concentración de 100 µg/mL.

Como sustrato se utilizó una marca comercial de aceite oliva. Se utilizaron dos tipos de nanopartículas para los ensayos, nanopartículas de grafito y nanopartículas de óxido de hierro III (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>). Las nanopartículas de grafito eran 99.9 % carbono y fueron manufacturadas por la compañía American Elements (Figura 3.3).



Figura 3.3. Tiras de prueba con nanopartículas de grafito.

Las nanopartículas de  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  en dispersión acuosa fueron suministradas por US Research Nanomaterials, Inc. (Figura 3.4), el tamaño de partículas original fue de 20-100 nm y la concentración de partículas fue de 20% w / v.

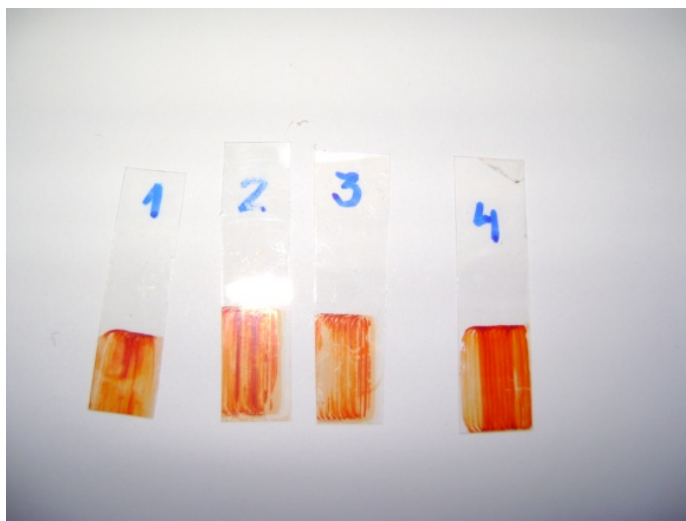


Figura 3.4. Tiras de prueba con nanopartículas de  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ .

Todos los productos químicos utilizados en la solución tampón y la solución enzimática eran de grado reactivo analítico y se utilizaron sin purificación adicional.

### 3.1.3. Determinación de la actividad enzimática.

Para la determinación de la actividad enzimática es necesario graficar para cada ensayo el comportamiento de la absorbancia con respecto al tiempo (Figura 3.5).

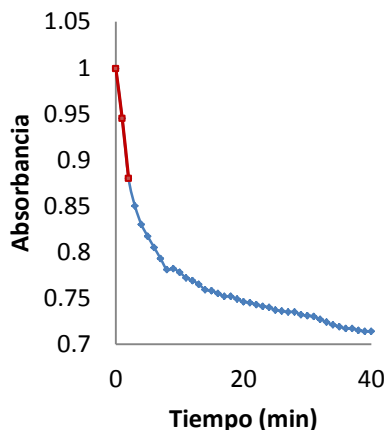


Figura 3.5. Espectro de absorbancia de una lámina de prueba.

En la gráfica se puede observar como conforme transcurre el tiempo la absorbancia disminuye, las nanopartículas adheridas al sustrato son arrastradas al fondo de la celda por la hidrólisis catalizada por la lipasa, permitiendo que la cantidad de luz que atraviesa la celda aumente. Por lo tanto la gráfica es una representación de la generación de productos a través del tiempo. Bajo esta consideración, la pendiente de la primera sección lineal es igual a la actividad enzimática. La pendiente puede ser determinada fácilmente por medio de un análisis de regresión lineal simple.

Tomando en cuenta que la ecuación que describe a una recta es:

$$Y = mX + b \quad \text{Ecuación 3.1}$$

Para el caso de los ensayos  $Y$  es igual a la absorbancia y  $X$  representa el tiempo. La pendiente de la recta está representada por la letra  $m$ , para determinar la pendiente se utiliza la siguiente ecuación.

$$m = \frac{\sum_{i=1}^n X_i Y_i - \frac{(\sum_{i=1}^n Y_i)(\sum_{i=1}^n X_i)}{n}}{\sum_{i=1}^n X_i^2 - \frac{(\sum_{i=1}^n X_i)^2}{n}} \quad \text{Ecuación 3.2}$$

### **3.2 Método gravimétrico utilizando una microbalanza de cristal de cuarzo (QCM)**

Sobre la superficie del electrodo de la microbalanza de cristal de cuarzo se colocan 10µL de solución de sustrato/cloroformo y se deja secar alrededor de 10 min hasta que el cloroformo se evapora y el sustrato queda fijado a la superficie de la microbalanza. Una vez que el sustrato queda adherido, se coloca dentro de la celda de medición a la microbalanza y se agregan 180µL de solución tampón. Se da tiempo al equipo para estabilizarse por 3 minutos y se agregan 20µL de solución enzimática. Debido a la acción de la enzima sobre el sustrato se comienza a liberar glicerina y ácido oleico. La glicerina es desplazada a la fase acuosa en la celda, la pérdida de masa sobre la superficie de la microbalanza afecta su frecuencia de vibración, siendo esto una medida directa de la pérdida de masa y la actividad enzimática.

#### 3.2.1. Materiales y equipo.

Las mediciones se llevaron a cabo utilizando la microbalanza de cristal de cuarzo series electrochemical modelo CHI400A (Figura 3.6).



Figura 3.6. QCM y celda de prueba.

El equipo incluye un potencióstato/galvanostato modelo CHI440A, una caja externa con un circuito oscilador, y una celda de prueba (Figura 3.7). La densidad de los cristales de cuarzo recubiertos con oro (13.7 mm diámetro del cristal, y el diámetro de 5.11 mm del disco de oro) fue de  $2.648 \text{ g cm}^{-3}$ . El cambio de masa es de 0.14 ng por cambio de frecuencia de 0.1 Hz.

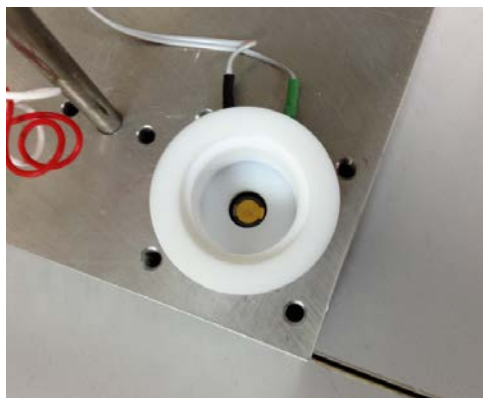


Figura 3.7. QCM instalada en su celda de medición.

### 3.2.2 Reactivos

La lipasa de *Rhizopus arrhizus* ( $\sim 10 \text{ U mg}^{-1}$ ) se adquirió de Sigma. La actividad enzimática se verificó aplicando un ensayo volumétrico. Los datos obtenidos ( $10.4 \text{ U mg}^{-1}$ ) bajo diferentes condiciones de almacenamiento fueron consistentes con la establecida por el fabricante.

Se preparó una solución tampón de fosfato (PBS) (0.1 M, pH 8), obtenida disolviendo las cantidades apropiadas de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  en agua destilada. La solución tampón se utilizó directamente en las pruebas y para preparar soluciones enzimáticas con diversas concentraciones.

Se utilizaron dos tipos de soluciones de sustratos para los ensayos, una solución de aceite de oliva/cloroformo y otra con aceite de oliva/nanopartículas de Dióxido de Silicio ( $\text{SiO}_2$ )/cloroformo. La solución de aceite de oliva/cloroformo se preparó con 1.2 mg de aceite

de oliva comercial y 5 mL de cloroformo. La solución de oliva/nanopartículas de Dióxido de Silicio ( $\text{SiO}_2$ )/cloroformo se preparó con 1.6 mg de aceite de oliva, 5 mL de cloroformo y 6 mg de nanopartículas de  $\text{SiO}_2$ . Inicialmente se formó un gel mezclando manualmente aceite de oliva con las nanopartículas de  $\text{SiO}_2$ , posteriormente se agregó el cloroformo.

Todos los productos químicos utilizados en la solución tampón, las soluciones del sustrato y la solución enzimática eran de grado reactivo analítico y se utilizaron sin purificación adicional.

### ***3.2.3 Determinación de la actividad enzimática.***

Por medio un equipo cómputo acoplado al dispositivo de control de la microbalanza se puede registrar el comportamiento de la frecuencia de vibración del cristal de cuarzo a través del tiempo (Figura 3.8.), lo cual es necesario para determinar la actividad enzimática.

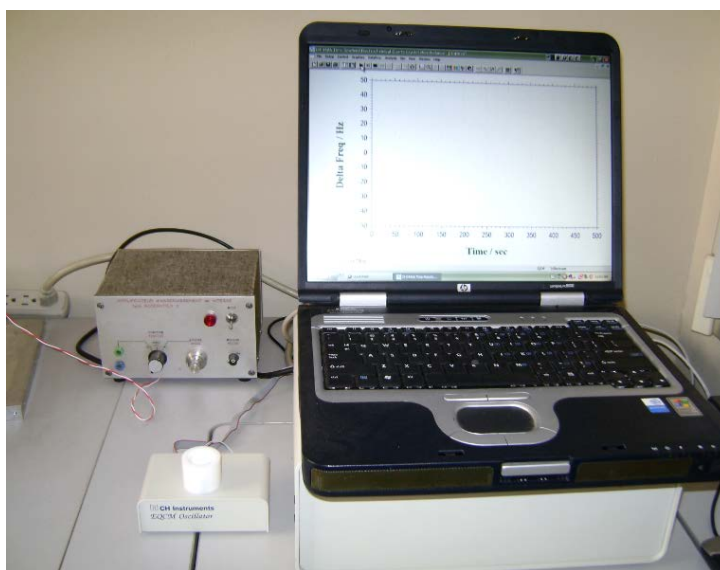


Figura 3.8. Equipo potencióstato/galvanostato y equipo de cómputo para el registro de mediciones.

En la figura 3.9 se puede observar como conforme transcurre el tiempo la frecuencia aumenta, lo cual es causado por la acción de la enzima sobre el sustrato, por lo tanto la gráfica es una representación de la generación de productos a través del tiempo.

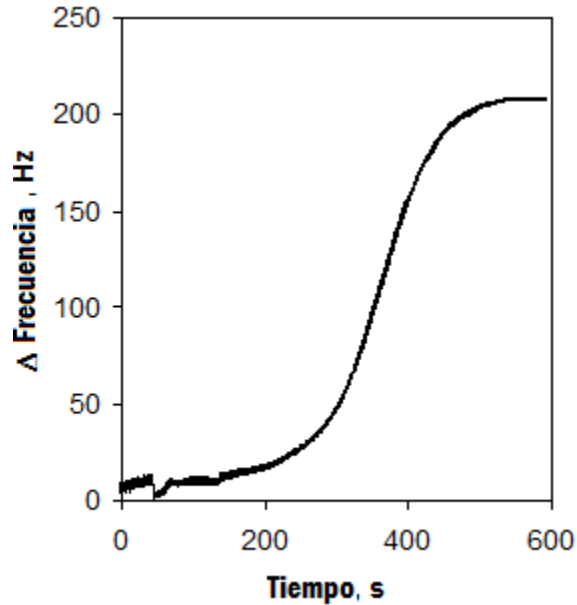


Figura 3.9. Evolución de la degradación de una capa de aceite de oliva.

La actividad enzimática se puede expresar como la velocidad de la reacción enzimática, la cual está dada por la siguiente ecuación:

$$U = v = \frac{\Delta n_s}{\Delta t} \quad \text{Ecuación 3.3}$$

Tomando en cuenta que  $\Delta n_s$  es el cambio de moles de sustrato, el cual es igual a:

$$\Delta n_s = M \Delta m_s \quad \text{Ecuación 3.4}$$

Donde  $M$  es la masa molar del sustrato y  $\Delta m$  es el cambio en la masa del sustrato. Utilizando la ecuación 3.4 y la ecuación 2.4 se obtiene la siguiente modificación de la ecuación de Sauerbrey:

$$\Delta f = -K \Delta m \quad \text{Ecuación 2.4}$$

$$\frac{\Delta f}{\Delta t} = -KM \frac{\Delta n_s}{\Delta t} \quad \text{Ecuación 3.5}$$

*Ecuación de Sauerbrey modificada*

En la segunda parte de la experimentación del método se trabajó con los efectos provocados con la adición de nanopartículas, lo cual hace necesario la modificación de la ecuación 2.5, donde ahora el cambio de masa estará dado por:

$$\Delta m = \Delta m_s + \Delta m_{NP} = A\Delta n_{NP} + M\Delta n_s \quad \text{Ecuación 3.6}$$

$$\frac{\Delta f}{\Delta t} = -K \frac{(A\Delta n_{NP} + M\Delta n_s)}{\Delta t} \quad \text{Ecuación 3.7}$$

*Ecuación de Sauerbrey modificada para las nanopartículas*

Donde  $A$  es la masa atómica de las nanopartículas,  $\Delta n_{NP}$  es el cambio en el número de moles de nanopartículas. Mostrando como el cambio en la frecuencia de vibración de la microbalanza aumentará con el cambio de la masa de las nanopartículas y la masa del sustrato.

Bajo esta consideración, la pendiente de la sección lineal en la gráfica de cambio de frecuencia contra tiempo es igual a la actividad enzimática. La pendiente puede ser determinada fácilmente de la misma forma que se determinó para el método espectrofotométrico, por medio de la ecuación 3.1 y 3.2.

# 4. Resultados

#### 4.1. Método espectrofotométrico.

En los primeros experimentos realizados con este método, como se mencionó en la sección de método experimental, se utilizaron diferentes formas manuales de colocar las nanopartículas de grafito sobre la capa de sustrato. En las pruebas 1 a 3 se utilizó una muestra de aceite de oliva y partículas de grafito mezclado con agitación sónica, en solución de lipasa  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  a  $25^\circ\text{C}$  y solución PBS (0.1 M, pH 8). En la figura 4.1 se muestra el comportamiento de la absorbancia con respecto al tiempo para cada prueba, la absorbancia se midió cada minuto por 15 minutos.

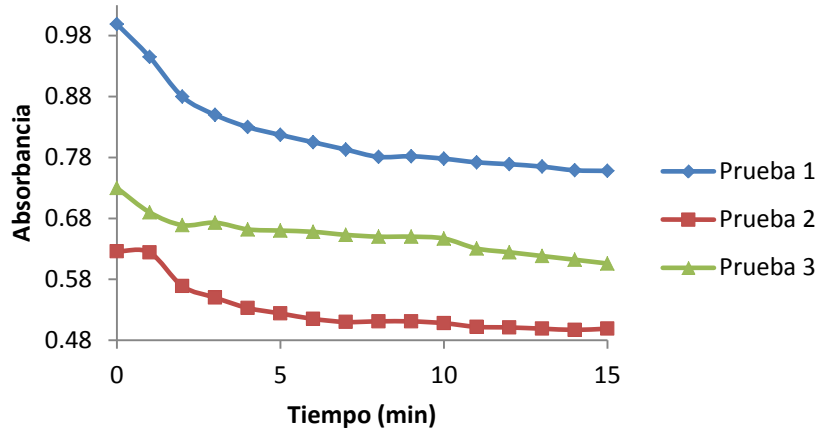


Figura 4.1. Absorbancia contra tiempo (Prueba 1 a 3).

Los resultados para la actividad enzimática se muestran en la tabla 4.1, expresados en unidades de actividad enzimática.

Tabla 4.1. Actividad enzimática para cada prueba. Muestra de aceite de oliva y nanopartículas de grafito mezclado con agitación sónica.

Prueba	Actividad (U)
1	0.059
2	0.055
3	0.04

Posteriormente, se realizaron pruebas donde se utilizó aceite de oliva y nanopartículas de grafito agregadas a través de una malla, en solución de lipasa  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  a  $25^\circ\text{C}$  y solución PBS ( $0.1 \text{ M}$ ,  $\text{pH } 8$ ). En la figura 4.2 se muestra el comportamiento de la absorbancia con respecto al tiempo para cada prueba, la absorbancia se midió cada minuto por 15 minutos.

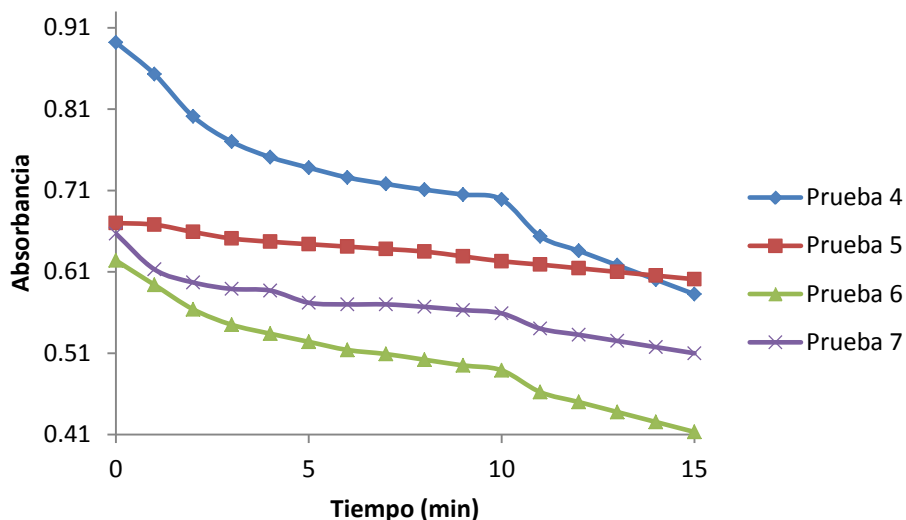


Figura 4.2. Absorbancia contra tiempo (Prueba 4 a 7).

Los resultados para la actividad enzimática se muestran en la tabla 4.2, expresados en unidades de actividad enzimática.

Tabla 4.2. Actividad enzimática para cada prueba. Nanopartículas adheridas utilizando una malla.

Prueba	Actividad (U)
4	0.039
5	0.009
6	0.03
7	0.044

La manera en la que se adhieren las partículas influye directamente en los rangos de absorbancia, debiendo ser menores a 1. Cuando la absorbancia es mayor a uno la actividad no puede ser calculada con exactitud.

Además de las técnicas para la adhesión de las nanopartículas de grafito se realizaron pruebas a diferentes temperaturas. En cada prueba se midió la absorbancia cada minuto durante 10 minutos. En la figura 4.3 se muestra el comportamiento de las pruebas a diferentes temperaturas, en solución de lipasa  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  y solución PBS (0.1 M, pH 8).

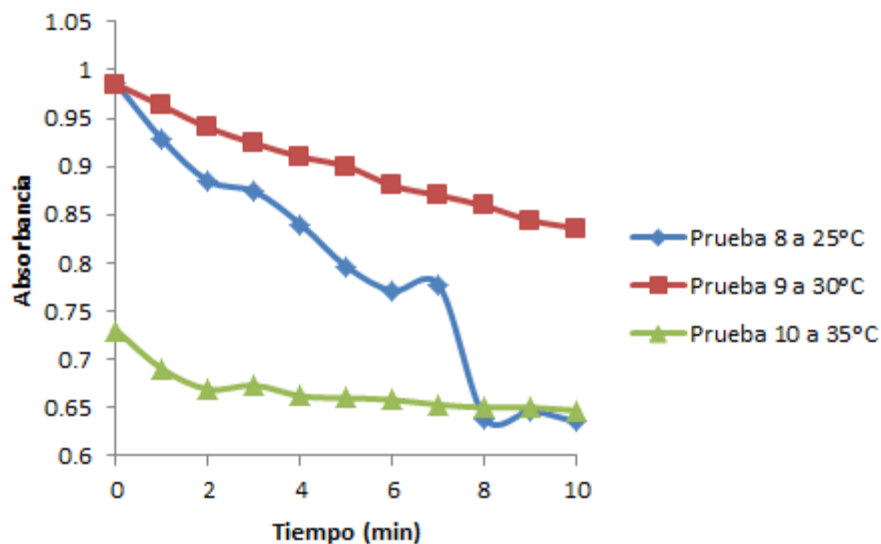


Figura 4.3. Absorbancia contra tiempo. Pruebas a diferentes temperaturas.

Los resultados para la actividad enzimática a diferentes temperaturas se muestran en la tabla 4.3, expresados en unidades de actividad enzimática.

Tabla 4.3. Actividad enzimática para cada prueba. Pruebas a diferentes temperaturas.

Prueba	Actividad (U)
8	0.05
9	0.02
10	0.04

El cambio en la temperatura puede afectar la velocidad de la reacción aunque en los rangos de 25 a 30 grados centígrados los cambios pueden ser muy pequeños.

En este punto de la investigación el método propuesto dio buenos resultados, sin embargo era necesario trabajar más en la distribución homogénea de las partículas y la distribución del aceite de oliva. La manera en la que se adhieren las partículas influye directamente en los rangos de absorbancia que se detectan en la prueba, debiendo ser menores a 1. Cuando la absorbancia es mayor a uno la actividad no puede ser calculada con exactitud.

Con el objetivo de mejorar la distribución y la adhesión de las nanopartículas en el sustrato y en la lámina de prueba se decidió utilizar partículas de óxido de Hierro III ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ). También el método de fijación del sustrato en la lámina fue optimizado gracias a la colaboración de la empresa nanolike®.

Una capa de nanopartículas de  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  se depositó sobre un triglicérido recubriendo una lámina de polietileno tereftalato (PET) con un método de microserigrafía (Figura 4.4).

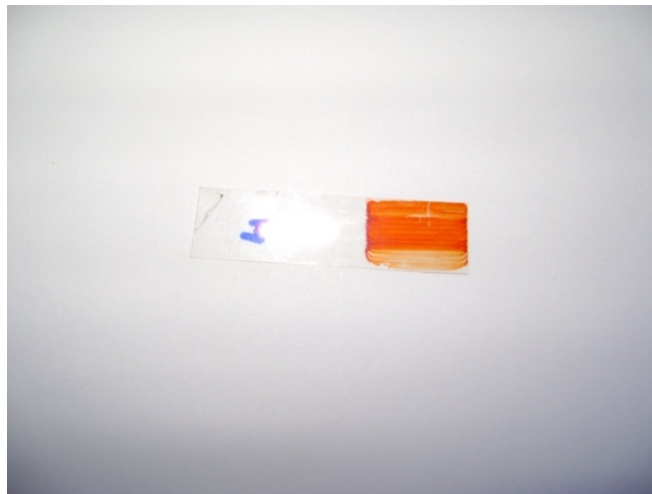


Figura 4.4. Lámina de prueba. Mezcla de aceite de oliva y nanopartículas de  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ .

Se lograron capturar imágenes del sustrato adherido a la lámina por medio de microscopio XJP-H100 y microscopia de fuerza atómica (Figuras 4.5 y 4.6), donde podemos observar que la distribución de las nanopartículas ha sido mejorada notablemente, de esta manera se aumenta la reproducibilidad del método.



Figura 4.5. Imagen con microscopio XJP-H100 de lámina de prueba.

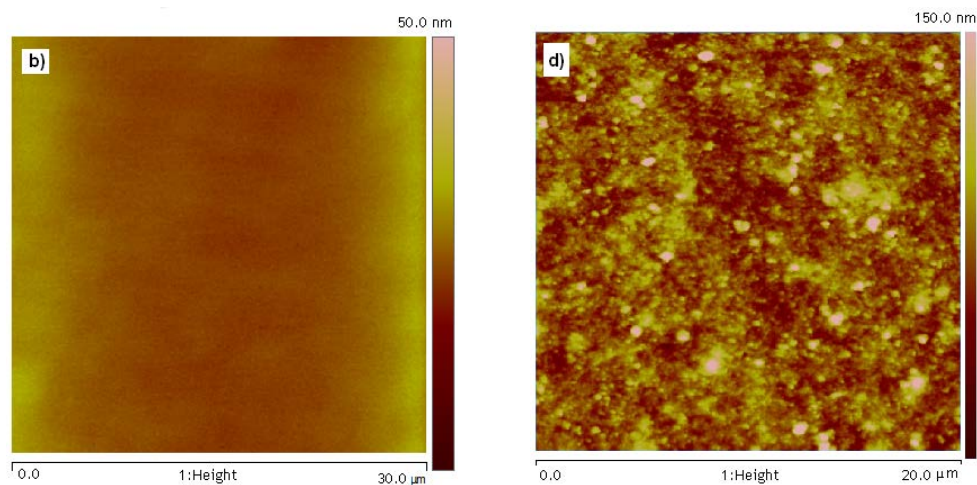


Figura 4.6. Imágenes de AFM de una lámina de prueba. b) Escala 50 nm, d) Escala 150 nm.

Se realizaron pruebas midiendo la absorbancia diferentes longitudes de onda para identificar la longitud óptima para los ensayos con nanopartículas de  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  (Figura 4.7).

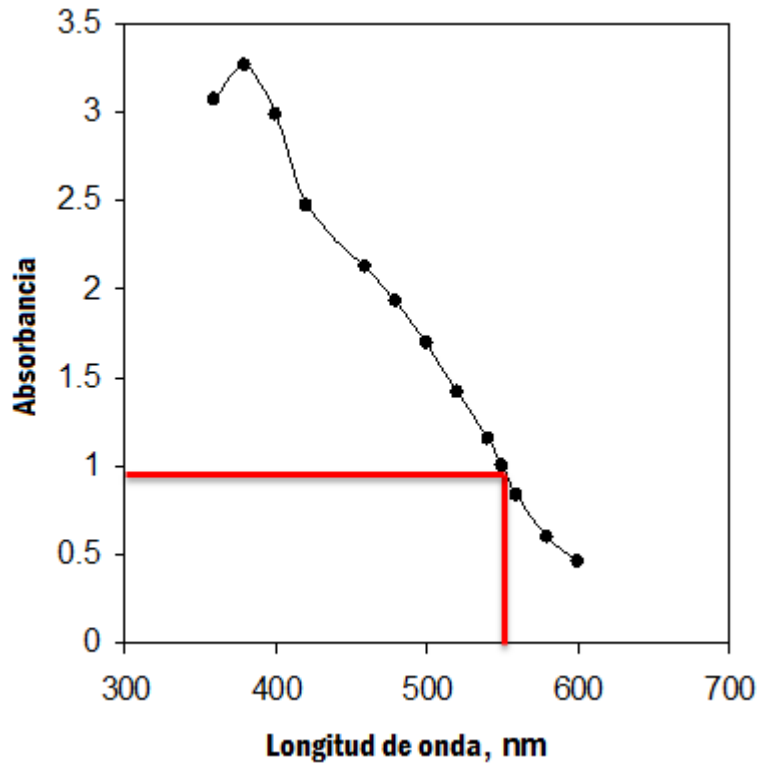


Figura 4.7. Espectro de absorción de una lámina de prueba a diferentes longitudes de onda. A partir de la figura 4.7. Se determinó que la longitud de onda óptima es la de 550 nm, pues a esa longitud de onda se obtienen valores aproximados de absorbancia a 1, los cuales son necesarios para asegurar la linealidad de la determinación de la actividad enzimática.

Una vez mejorado el método de distribución de las nanopartículas y encontrada la longitud de onda para realizar la experimentación, se logró obtener la reproducibilidad de los resultados en la determinación de la actividad enzimática. En la figura 4.8 se muestra la gráfica de un ensayo con una tira de prueba con una capa de aceite de oliva/nanopartículas de  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  por la acción de lipasa  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  a  $25^\circ\text{C}$  en solución PBS (0.1 M, pH 8), en la cual se observa una disminución de la absorbancia con el tiempo a 550 nm.

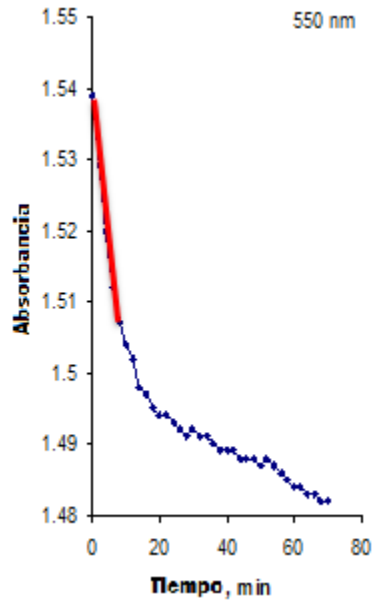


Figura 4.8. Evolución de la degradación de la capa aceite de oliva/nanopartículas de  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ .

Dadas las mejoras en la distribución de la capa de aceite y nanopartículas se pudo graficar una curva de calibración para la determinación de la actividad enzimática a diferentes concentraciones de enzima lipasa, en PBS 0.1 M, pH 8;  $25^\circ\text{C}$ ; 550 nm. (Figura 4.9).

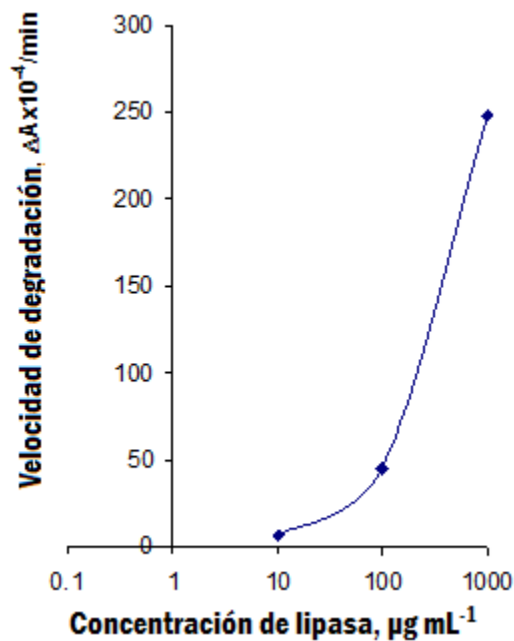


Figura 4.9. Curva de calibración para la cuantificación de la actividad de la lipasa por método espectrofotométrico.

Es necesario continuar con una mayor experimentación y poder obtener valores a menores concentraciones para la curva de calibración. Aun así se obtuvieron buenos resultados y confiables para la determinación de la actividad enzimática.

#### ***4.2. Método gravimétrico utilizando una microbalanza de cristal de cuarzo (QCM)***

En la experimentación con la microbalanza de cristal de cuarzo se utilizó primeramente 10  $\mu$ L de una solución de aceite de oliva en cloroformo (1.2 mg de aceite/5ml de cloroformo), la cual se dejó secar en la superficie de la microbalanza (Figura 4.10), se agregó solución buffer y enzimática para realizar las pruebas (Figura 4.11). La fijación del sustrato sobre la superficie de la microbalanza es importante para la exactitud de las mediciones, por lo cual es importante el tiempo de secado.



Figura 4.10. Microbalanza de cristal de cuarzo con sustrato adherido.

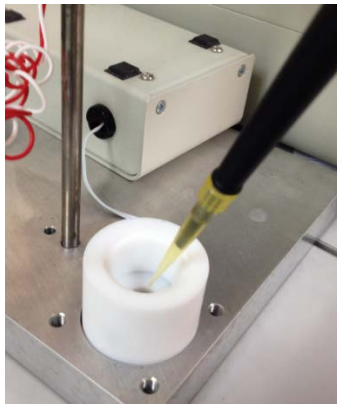


Figura 4.11. Adición de solución enzimática a celda de prueba.

En la figura 4.12 se muestra como inicialmente la frecuencia disminuye lo cual es atribuido a la absorción de las moléculas de la enzima sobre la capa de sustrato, posteriormente comienza la reacción enzimática y el desprendimiento de los productos. La formación de productos y su disolución en la fase acuosa resulta en el incremento de la frecuencia. Finalmente, la degradación completa del sustrato es alcanzada, al observar como el cambio en la frecuencia de la QCM es casi nulo.

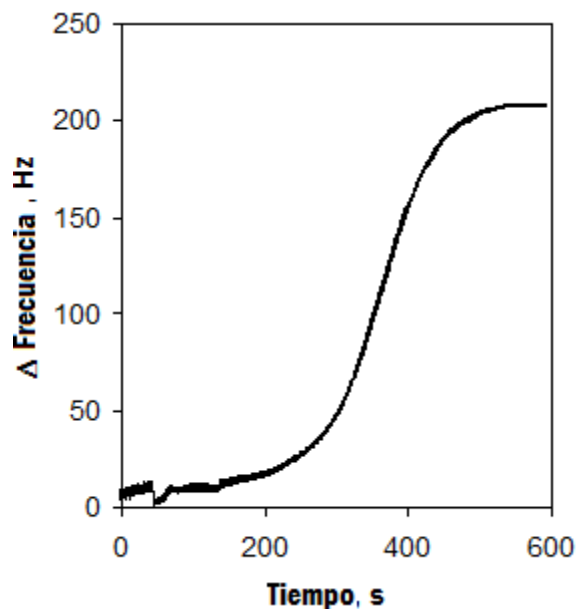


Figura 4.12. Evolución de la degradación de una capa aceite de oliva.

Una vez realizadas las pruebas en las que el sustrato es degradado por la enzima aumentando la frecuencia de vibración de la microbalanza, es posible encontrar la actividad enzimática por medio de las ecuaciones descritas en la metodología del ensayo.

Se obtuvieron los resultados suficientes para formar una curva de calibración del método para diferentes concentraciones de lipasa, PBS 0.1 M, pH 8; 25°C; aceite de oliva como sustrato (Figura 4.13).

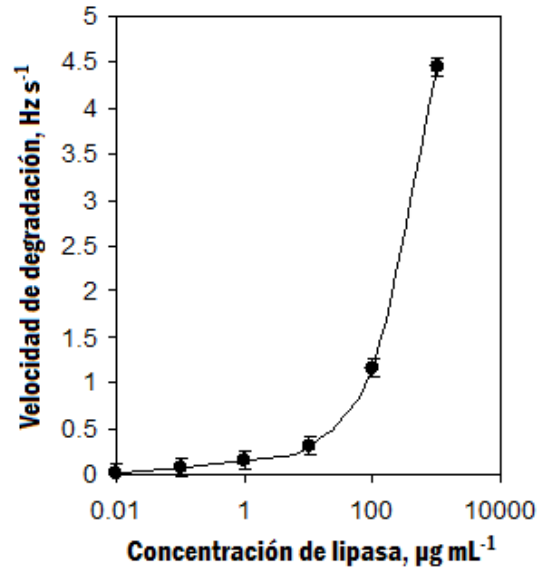


Figura 4.13. Curva de calibración para la cuantificación de la actividad de la lipasa por método gravimétrico. Aceite de oliva como sustrato.

La carga que se le aplica a la QCM es muy importante al momento de las determinaciones pues puede afectar el funcionamiento de la microbalanza, así mismo afecta las concentraciones con las que se puede trabajar. Con el objetivo de amplificar la señal obtenida en la pruebas utilizando la microbalanza se decidió agregar nanopartículas de dióxido de silicio ( $\text{SiO}_2$ , 99.8%, 10-20 nm, superficie modificada, super-hidrofóbico y oleofílico) al sustrato. Se preparó un gel formado por aceite de oliva y nanopartículas de  $\text{SiO}_2$  con una relación de 15:1 (Figura 4.14), el gel fue disuelto en cloroformo para su aplicación sobre la QCM (Figura 4.15).

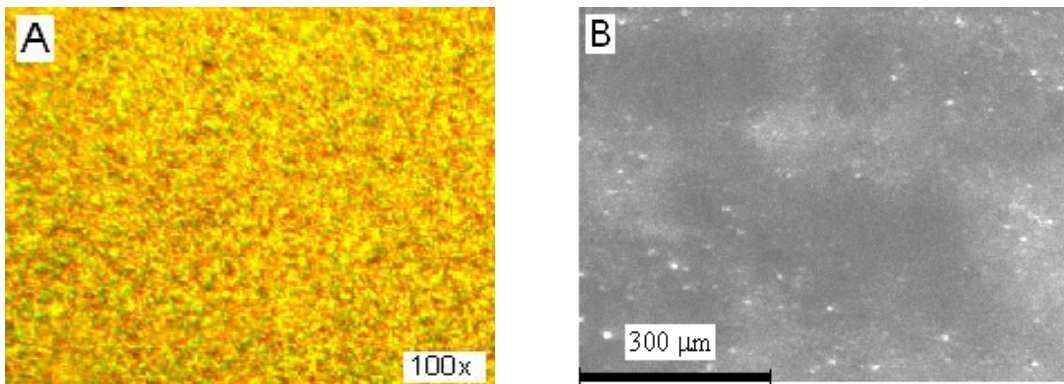


Figura 4.14. Gel de aceite de oliva y nanopartículas de  $\text{SiO}_2$  A) Imagen por medio de microscopio XJP-H100. B) Imagen por medio de SEM

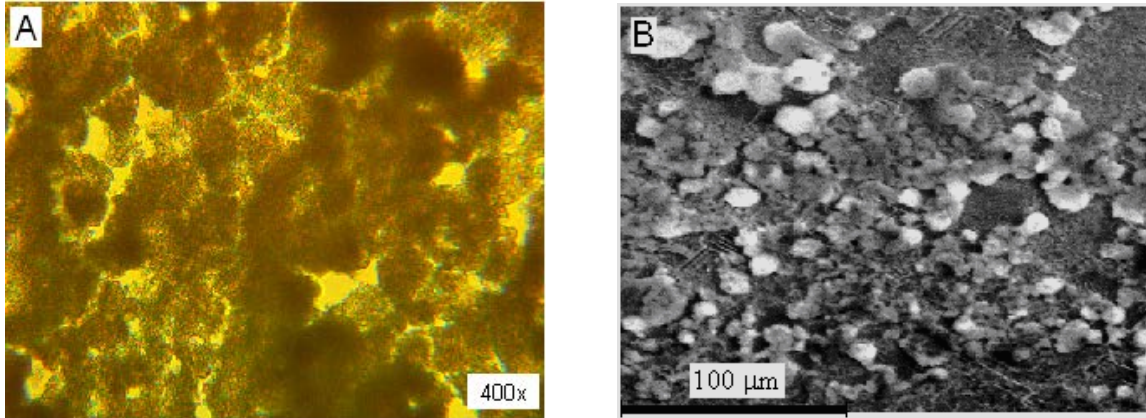


Figura 4.15. Dispersión aceite de oliva y nanopartículas de SiO<sub>2</sub> posterior a la evaporación de cloroformo A) Imagen por medio de microscopio XJP-H100. B) Imagen por medio de SEM

En la figura 4.16 se muestra el cambio en la frecuencia de vibración de la microbalanza por la degradación de la capa de aceite de oliva/nanopartículas de SiO<sub>2</sub> por la acción de lipasa 100 μg mL<sup>-1</sup> a 25°C en solución PBS (0.1 M, pH 8).

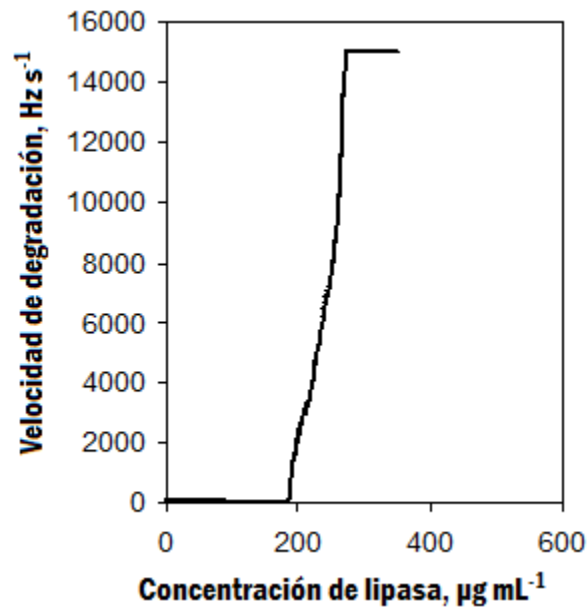


Figura 4.16. Evolución de la degradación de la capa aceite de oliva/nanopartículas de SiO<sub>2</sub>.

Cuando el aceite de oliva cargado con nanopartículas depositado en la superficie de la QCM es utilizado como sustrato para la lipasa, las pesadas nanopartículas dejan la película de sustrato junto con los productos de la degradación enzimática del aceite de oliva, causando así una mayor

disminución en la masa depositada en la QCM comparado con el caso en el que el sustrato no contiene nanopartículas.

Al haber amplificado la señal que se obtiene por el cambio en la masa sobre la QCM se pudo obtener la siguiente curva de calibración para la cuantificación de la actividad de la lipasa, en PBS 0.1 M, pH 8; 25°C y aceite de oliva/nanopartículas de SiO<sub>2</sub> como sustrato (Figura 4.17).

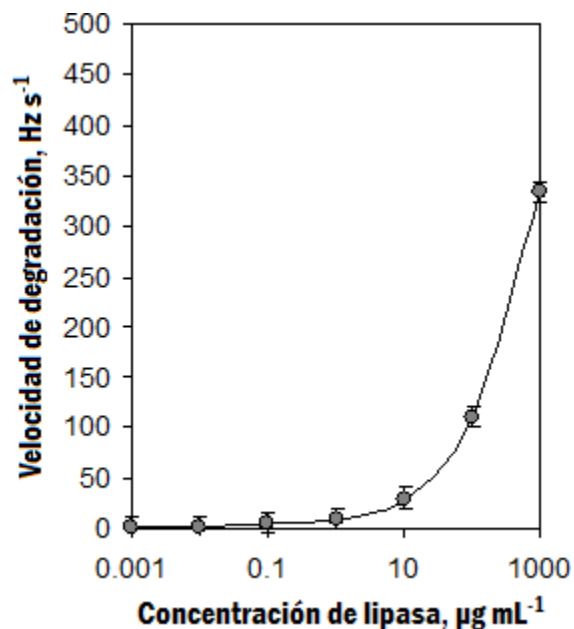


Figura 4.17. Curva de calibración para la cuantificación de la actividad de la lipasa por método gravimétrico. Aceite de oliva/nanopartículas de SiO<sub>2</sub> como sustrato.

Comparando las curvas de calibración obtenidas por el método utilizando el sustrato sin y con nanopartículas (Figura 4.18), podemos observar como la adición de nanopartículas provoca que los rangos en los que la frecuencia varía sean mucho mayores lo cual se puede traducir en un aumento de la sensibilidad del método.

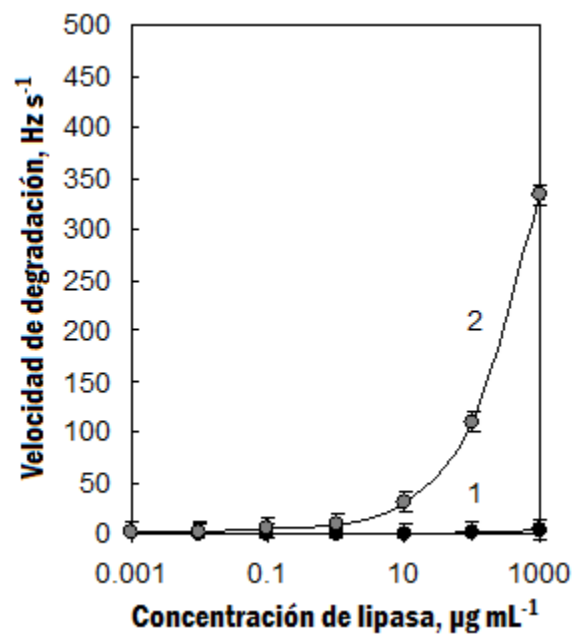


Figura 4.18. Comparación de curvas de calibración para el método gravimétrico.

El método gravimétrico utilizando la QCM y un sustrato con nanopartículas resultó ser muy sensible al momento de determinar actividades enzimáticas a diferentes concentraciones de la lipasa.

# 5. Conclusiones y Recomendaciones

Gracias a los resultados obtenidos en la investigación presentada se lograron realizar las siguientes conclusiones para ambos métodos estudiados.

En el método espectrofotométrico se logró concluir que el cambio en la absorbancia es proporcional a la actividad enzimática, así como que la utilización de nanoparticulas aumenta la sensibilidad del ensayo.

En el método gravimétrico el aumento en la frecuencia es de oscilación de la QCM es proporcional a la actividad enzimática. Además, la utilización de nanoparticulas de SiO<sub>2</sub> aumenta el cambio en la masa sobre la superficie del cristal, mejorando así la sensibilidad.

Al comparar la sensibilidad de los métodos propuestos con métodos tradicionales encontramos que el método gravimétrico utilizando nanoparticulas da los mejores resultados, con un límite de detección (LDD) 0.000001 Unidades de actividad enzimática (Tabla 5.1).

Tabla 5.1 Limite de detección de métodos usuales para la determinación de la actividad.

Método	LDD, U
Método volumétrico con aceite de olive como sustrato [161]	10 <sup>-2</sup>
Ensayo colorimétrico utilizando el método de jabón de cobre [161]	10 <sup>-1</sup>
Ensayo espectrofotométrico con p-nitrofenil laurato [161]	10 <sup>-4</sup>
Método gravimétrico propuesto sin nanoparticulas	10 <sup>-5</sup>
Método gravimétrico propuesto con nanoparticulas	10 <sup>-6</sup>
Método espectrofotométrico propuesto	10 <sup>-4</sup>

El método espectrofotométrico propuesto ofrece un LDD similar al ensayo espectrofotométrico con p-nitrofenil laurato pero este tiene la desventaja de utilizar un sustrato no específico para la lipasa.

Los métodos propuestos presentan la ventaja de ser más rápidos que ensayos comunes pues la medición de la actividad enzimática se realiza en tiempo real conforme se lleva a cabo la

reacción enzimática. En la mayor parte de los ensayos comúnmente utilizados primeramente se prepara la reacción enzimática para después determinar la actividad a partir de los productos formados, haciendo de estos métodos tardados y laboriosos.

Los métodos turbidimétricos son similares al método espectrofotométrico propuesto, sin embargo, estos requieren de la utilización de emulsiones como sustrato las cuales pueden ser inestables y difíciles de manejar.

La utilización de tiras prefabricadas hace que el método espectrofotométrico además de ser rápido y sensible se pueda realizar a un bajo costo.

Existe un método gravimétrico similar al propuesto en donde utilizan una microbalanza de cristal de cuarzo con disipación (QCM-D) para medir la degradación de una capa de aceite de oliva. Aunque este método es efectivo, la utilización de una QCM-D sube los costos de elaboración del ensayo, además de que al utilizar solo aceite de oliva como sustrato su sensibilidad no es mayor a la lograda con el método gravimétrico experimentado en este trabajo.

Los métodos propuestos ofrecen una alternativa sencilla, sensible, rápida y fácil de reproducir para la determinación de la actividad enzimática de la lipasa, además de tener un costo relativamente bajo en comparación a métodos espectrofotométricos indirectos, de fluorescencia y cromatográficos.

Se demostró la aplicación eficaz de ambos métodos, permitiendo el uso futuro de los métodos en ensayos de rutina. El avance en la investigación de este tipo de métodos podrá permitir utilizarlos en diversos ensayos de actividad enzimática, no solo con lipasa, así como también con diversos sustratos.

# 6. Referencias

- [1] Rohit Sharma, Yusuf Chisti, Uttam Chand Banerje. "Production, purification, characterization, and applications of lipases". *Biotechnology Advances*, 2001, 19: 627–662
- [2] O.Castellanos, D.Ramírez, V. Montañez. Perspectiva en el desarrollo de las enzimas industriales a partir de la inteligencia tecnológica. *Ingeniería e investigación*, 2006, 26:52-67.
- [3] P. Gacesa y J. Hubble. *Tecnología de las enzimas*. Editorial Aribia, S.A. 1990
- [4] C. Rivera, F. García. *Enzimas Lipolíticas y su Aplicación en la Industria del Aceite*. *Biotecnología*, 2007, 11: 37-45.
- [5] A. Salis, E. Sanjust, V. Solinas, M. Monduzzi. *Biocatalysis and Biotransformation*, 2005 23: 381-386.
- [6] V. Gochev, G. Montero, G. Kostov, L. Toscano, M. Stoytcheva, A. Krastanov, A. Georgieva. "Nutritive medium engineering Enhanced production of extracellular lipase by *Trichoderma longibrachiatum*", *Biotechnol. & Biotechnol.* 2012 **26**: 2875-2882
- [7] J. Coca, O. Hernández, R. Berrio, S. Martínez, E. Díaz, J.C. Producción y caracterización de las lipasas de *Aspergillus niger* y *A. fumigatus* Dustet. *Biotecnología Aplicada*, 2001 18:216-220.
- [8] Glossary of chemists of terms used in biotechnology (IUPAC Recommendations 1992). *PAC*, 1992, 64, 143.
- [9] F. Hasan \*, A.Shah, A. Hameed. "Industrial applications of microbial lipases". *Enzyme and Microbial Technology*, 2006 39:235–251.
- [10] P.Villeneuve. "Lipases in lipophilization reactions". *Biotechnology Advances*, 2007 25:515–536
- [11] Marc Fromer & Michael Merolla. "Pancreatic Triacylglycerol Lipase". *Molecular Anatomy Project*, <http://maptest.rutgers.edu/drupal/?q=node/50>, (visto en marzo 16, 2011).
- [12] J. Lozano, A. Segura, A. Fernández. Composición del aceite de oliva. *Analistas económicos de Andalucía*.
- [13] R. Gupta, P. Rathi, N. Gupta, S. Bradoo. "Lipase assays for conventional and molecular screening: an overview", *Biotechnol. Appl. Biochem*, vol.37, pp 63–71, 2003.
- [14] S. Imamura, J. Kobayashi, S. Sakasegawa, A. Nohara, K. Nakajima, M. Kawashiri, A. Inazu, M. Yamagishi, J. Koizumi, H. Mabuchi. *Journal of Lipid Research*, 2007 48: 459-457
- [15] S. Imamura, J. Kobayashi, K. Nakajima, S. Sakasegawa, A. Nohara, T. Noguchi, M. A. Kawashiri, A. Inazu, S. S. Deeb, H. Mabuchi, J. D. Brunzell. *Journal of Lipid Research* 2008, 49:1431-1437
- [16] Cherry, I.S.; Crandall, L.A. The specificity of pancreatic lipase; its appearance in the blood after pancreatic injury. *Am. J. Physiol.*, 1932, 100, 266-273.

- [17] Tietz, N.; Fiereck, E. Serum lipase. *Stand. Methods Clin. Chem.*, 1972, 7, 19-31.
- [18] Lowe, M. Assays for pancreatic trygliceride lipase and colipase. In: *Lipase and Phospholipase Protocols*; Doolittle, M; Reue, K.; Eds.; Humana Press, Totowa, New Jersey, 1999; pp. 59-70.
- [19] Duncombe, W.G. The colorimetric determination of long-chain fatty acids in the 0.05–0.5"mole range. *Biochem. J.*, 1963, 88, 7- 10.
- [20] Duncombe, W.G. The colorimetric micro-determination of nonesterified fatty acids in plasma. *Clin. Chim. Acta*, 1964, 9(2), 122- 125.
- [21] Dirstine, P.H.; Sobel, C.; Henry, R.J. A new rapid method for the determination of serum lipase. *Clin. Chem.*, 1968, 14(11), 1097-1106.
- [22] Yang, J.S.; Biggs, H.G. Rapid, reliable method for measuring serum lipase activity. *Clin. Chem.*, 1971, 17(6), 512-518.
- [23] Myrtle, J.; Zell, W. Simplified photometric copper-soap method for rapid assay of serum lipase activity, *Clin. Chem.* 1975, 21(10), 1469-1473.
- [24] Blain, J.A.; Akhtar, M.W.; Patterson, J.D.E. Study on lipase activities using organic solvent systems. *Pak. J. Biochem.*, 1976, 10, 41- 53.
- [25] Kim, K.H.; Kwon, D.Y. Rhee, J.S. Effects of organic solvents on lipase for fat splitting. *Lipids*, 1984, 19(12), 975-977.
- [26] Kwon, D.; Rhee, J.S. A simple and rapid colorimetric method for determination of free fatty acids for lipase assay. *J. Amer. Oil Chemists' Society*, 1986, 63(1), 89-92.
- [27] Lowry, R.L.; Tinsley, I.J. Rapid colorimetric determination of free fatty acids. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1976, 53, 470-472.
- [28] Hron, W.T.; Menahan, L.A. A sensitive method for the determination of free fatty acids in plasma. *J. Lipid Res.*, 1981, 22, 377-381.
- [29] Redding, W.; Mayer, G.G.; Lornell, J.W. A semiautomated assay for nonesterified fatty acids in the 0.02 to 0.4 mueq/ml range. *J. Lipid Res.*, 1983, 24(1), 100.
- [30] Becker, P.; Abu-Reesh, I.; Markossian, S.; Antranikian, G.; Märkl, H. Determination of the kinetic parameters during continuous cultivation of the lipaseproducing thermophile *Bacillus* sp. on olive oil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1997, 48(2), 184-190.
- [31] Labuschagne, R.B.; van Tonder, A.; Litthauer, D. *Flavobacterium odoratum* lipase: isolation and charac-terization. *Enzyme Microb. Technol.*, 1997, 21, 52-58.

- [32] Pencreac'h, G.; Baratti, J. C. Hydrolysis of p-nitro-phenyl palmitate in n-heptane by the *Pseudomonas cepacia* lipase: a simple test for the determination of lipase activity in organic media. *Enz. Microb. Technol.*, 1996, 18(6), 417-422.
- [33] Ushio, K.; Hirata, T.; Yoshida, K.; Sakaue, M.; Hirose, C.; Suzuki, T.; Ishizuka, M. Superinducers for induction of thermostable lipase production by *Pseudomonas* species NT-163 and other *Pseudomonas* like bacteria. *Biotechnol. Lett.*, 1996, 10, 267-272.
- [34] Kojima, Y.; Yokoe, M.; Mase, T. Purification and characterization of an alkaline lipase from *Pseudomonas fluorescens* AK102. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 1994, 58, 1564-1568.
- [35] Sigurgísladóttir, S.; Konráðsdóttir, M.; Jónsson, Á.; Kristjánsson, J.; Matthiasson, E. Lipase activity of thermophilic bacteria from Icelandic hot springs. *Biotechnol. Lett.*, 1993, 15(4), 361-366.
- [36] Kordel, M.; Hofmann, B.; Schomburg, D.; Schmid, R. Extracellular lipase of *Pseudomonas* sp. strain ATCC 21808: purification, characterization, crystallization, and preliminary X-ray diffraction data. *J. Bacteriol.*, 1991, 173, 4836-4841.
- [37] Winkler, U.K.; Stuckmann, M. Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.*, 1979, 138, 663-670.
- [38] Huggins, C.; Lapidus, J. Chromogenic substrates. IV. Acyl esters of p-nitrophenol as substrates for the colorimetric determination of esterases. *J. Biol. Chem.*, 1947, 170, 467-482.
- [39] Stuer, W.; Jaeger, K.E.; Winkler, U.K. Purification of extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, 1986, 168, 1070-1074.
- [40] Vorderwülbecke, T.; Kieslich, K.; Erdmann, H. Comparison of lipases by different assays. *Enzyme Microb. Technol.*, 1992, 14(8), 631-639.
- [41] Liebeton, K.; Zacharias, A.; Jaeger, K.E. Disulfide bonding *Pseudomonas aeruginosa* lipase stabilizes the structure but is not required for interaction with its foldase. *J. Bacteriol.*, 2001, 183(2), 597-603.
- [42] Dimitrijević, A., Veličković, D., Bezbradica, D., Bihelović, F., Jankov, R., Milosavić, N. Production of lipase from *Pseudozyma aphidis* and determination of the activity and stability of the crude lipase preparation in polar solvents. *J. Serb. Chem. Soc.*, 2001, 76, 1081-1092.
- [44] Beisson, F.; Tiss, A.; Rivière, C.; Verger, R. Methods for lipase detection and assay: a critical review. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2000, 2(2), 133-153.

- [45] Gandolfi, R.; Marinelli, F.; Lazzarini, A.; Molinari, F. Cell-bound and extracellular carboxylesterases from *Streptomyces*: hydrolytic and synthetic activities. *J. Appl. Microbiol.*, 2000, 89(5), 870-875.
- [46] Lanz W.W.; Williams, P.P. Characterization of esterases produced by a ruminal bacterium identified as *Butyrivibrio fibrisolvens*. *J. Bacteriol.*, 1973, 113(3), 1170-1176.
- [47] Nachlas, M.M.; Blackburn, R. The colorimetric determination of urinary lipase. *J. Biol. Chem.*, 1958, 230, 1051-1061.
- [49] Furukawa, I.; Kurooka, S.; Arisue, K.; Kohda, K.; Hayashi, C. Assays of serum lipase by the "BALB- DTNB method" mechanized for use with discrete and continuous- flow analyzers. *Clin Chem.*, 1982, 28, 110-113.
- [50] Lombard, S.; Helmy, M.E.; Piéroni, G. Lipolytic activity of ricin from *Ricinus sanguineus* and *Ricinus communis* on neutral lipids. *Biochem. J.*, 2001, 358, 773-781.
- [51] Kurooka, S.; Kitamura, T. Properties of serum lipase in patients with various pancreatic diseases. Analysis by a new serum lipase assay method (the BALB-DTNB method) in combination with gelfiltration and iso-electrofocusing techniques. *J. Biochem. (Tokyo)*, 1978, 84, 1459-66.
- [52] BioVision lipase assay. <http://www.biovision.com/manuals/K723.pdf?osCsid=v2nosiqm7mav4kvsmm6t6qvm83> (Accessed December 16, 2011).
- [53] BioAssay Systems' QuantiChrom™ Lipase Assays.  
[http://www.bioassaysys.com/file\\_dir/DLPS.pdf](http://www.bioassaysys.com/file_dir/DLPS.pdf) (visto en diciembre 16, 2011).
- [54] Panteghini, M.; Bonora, R.; Pagani, F. Measurement of pancreatic lipase activity in serum by a kinetic colorimetric assay using a new chromogenic substrate. *Ann. Clin. Biochem.*, 2001, 38, 365-70.
- [55] Randox. <http://www.randox.com/brochures/PDF%20Brochure/LT092.pdf> (Accessed December 16, 2011).
- [56] Van Handel, E.; Zilversmit, D. Micromethod for the direct determination of serum triglycerides. *J. Lab. Clin. Med.*, 1957, 50, 152- 157.
- [57] Saiki, T.; Takagi, Y.; Suzuki, T.; Narasaki, T.; Tamura, G.; Arima, K. Studies on the lipoprotein lipases of microorganisms. Part IV Purification and general properties of the lipoprotein lipase produced by *Mucor javanicus*. *Agr. Bio. Chem. (Tokyo)*, 1969, 33(3), 414-423.

- [58] Yamaguchi, T.; Muroya, N.; Isobe, M.; Sugiura, M. Production and properties of lipase from a newly isolated chromobacterium. *Agr. Biol. Chem. (Tokyo)*, 1973, 37(5), 999-1005.
- [59] Sigma test assay kit. <http://www.sigmaaldrich.com/technicaldocuments/protocols/biology/enzymatic-assay-of-lipase-typexiii.html> (Accessed December 16, 2011).
- [60] Walde, P.; Luisi, P. L. A continuous assay for lipases in reverse micelles based on Fourier transform infrared spectroscopy. *Biochemistry*, 1989, 28, 3353-3360.
- [61] O'Connor, C.; Cleverly, D.R. Fourier-transform infrared assay of bile salt-stimulated lipase activity in reversed micelles. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 1994, 61(3), 209-214.
- [62] Snabe, T.; Petersen, S. Application of infrared spectroscopy (attenuated total reflection) for monitoring enzymatic activity on substrate films. *J. Biotechnol.*, 2002, 95, 145-155.
- [63] Wolf, C.; Sagaert, L.; Bereziat, G. A sensitive assay of phospholipase using the fluorescent probe 2-parinaroyllecithin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1981, 99, 275-283.
- [64] McGuire, S.O.; James-Kracke, M.R.; Sun, G.Y.; Fritsche, K.L. An esterification protocol for cis-parinaric acid-determined lipid peroxidation in immune cells. *Lipids*, 1997, 32(2), 219-226.
- [65] Hingh, Y.; Meyer, J.; Fischer, J.; Berger, R.; Smeitink, J.; Op den Kamp, J.A.F. Direct measurement of lipid peroxidation in submitochondrial particles. *Biochemistry*, 1995, 34(39), 12755-12760.
- [66] Beisson, F.; Ferté, N.; Nari, J.; Noat, G.; Arondel, V.; Verger, R. Use of naturally fluorescent triacylglycerols from *Parinari glaberrimum* to detect low lipase activities from *Arabidopsis thaliana* seedlings. *J. Lipid Res.*, 1999, 40(12), 2313-2321.
- [67] Dooijewaard-Kloosterziel, A.M.P.; Wuuters, J.T.M. Some properties of the lipase of *Geotrichum candidum* evaluated by a fluorimetric assay technique. *J. Appl. Bacteriol.*, 1976, 40(3), 293-297.
- [68] Roy, R.N. Fluorimetric assay of the activity of extracellular lipases of *Pseudomonas fluorescens* and *Serratia marcescens*. *J. Appl. Bacteriol.*, 1980, 49(2), 265-271.
- [69] Matthey, M.; Morgan, D. Secretion of extracellular lipases by *Candida lipolytica*. *Biochem. Soc. Trans.*, 1978, 6, 426-428.
- [70] Severson, D.L.; Fletcher, T.; Groves, G.; Hurley, B.; Sloan, S. Hydrolysis of triolein, cholesterol oleate, and 4-methylumbelliferyl stearate by acid and neutral ester hydrolases (lipases) from pigeon adipose tissue: effect of cAMP-dependent protein kinase. *Can. J. Biochem.*, 1981, 59(6), 418-429.

- [71] Monpezat, T.L.; Jeso, B.; Butour, J.L.; Chavant, L.; Sancholle, M. A fluorimetric method for measuring lipase activity based on umbelliferyl ester. *Lipids*, 1990, 25(10), 661-664.
- [72] Nègre, A.; Salvayre, R.S.; Dagan, A.; Gatt, S. New fluorometric assay of lysosomal acid lipase and its application to the diagnosis of Wolman and cholesteryl ester storage diseases. *Clin. Chim. Acta*, 1985, 149, 81-88.
- [73] Nègre, A.; Salvayre, R.S.; Dagan, A.; Gatt, S. Pyrenemethyl laurate, a new fluorescent substrate for continuous kinetic determination of lipase activity. *Biochim. Biophys. Acta-Lipids and Lipid Metabolism*, 1989, 1006(1), 84-88.
- [74] Duque, M.; Graupner, M.; Stütz, H.; Wicher, I.; Zechner, R.; Paltauf, F.; Hermetter, A. New fluorogenic triacylglycerol analogs as substrates for the determination and chiral discrimination of lipase activities. *J. Lipid Res.*, 1996, 37, 868-876.
- [75] Hermetter, A. Triglyceride lipase assays based on a novel fluorogenic alkyldiacyl glycerol substrate. In: *Methods in Molecular Biology*; Doolittle, M.; Reue, K; Eds.; Humana Press, Totowa, New Jersey, 1999; pp. 19-29.
- [76] Gilham, D.; Lehner, R. Techniques to measure lipase and esterase activity in vitro. *Methods*, 2005, 36, 139-147.
- [77] Del Prado, M.; Hernández-Montes, H.; Villalpando, S. Characterization of a fluorometric method for lipoprotein lipase. *Arch Med Res.*, 1994, 25(3), 331-335.
- [78] Jacks, T.J.; Kircher, W. Fluorometric assay for the hydrolytic activity of lipase using fatty acyl esters of 4-methylumbelliferone. *Anal. Biochem.*, 1964, 21(2), 279-285.
- [79] MarkerGene™ Fluorescent Lipase Assay Kit.  
<http://www.markergene.com/ProductDetails.php/M0612> (Accessed December 16, 2011).
- [80] MarkerGene™ Long Wavelength Fluorescent Lipase Assay Kit.  
<http://www.markergene.com/ProductDetails.php/M1214> (Accessed December 16, 2011).
- [81] Jarvis, G.M.; Thiele, J.H. Qualitative rhodamine B assay which uses tallow as a substrate for lipolytic obligately anaerobic bacteria. *J. Microbiol. Methods*, 1997, 29(1), 41-47.
- [82] Jette, J.-F.; Ziomek, E. Determination of lipase activity by a rhodamine- triglyceride-agarose assay. *Anal. Biochem.*, 1994, 219, 256- 260.
- [83] Kouker, G.; Jaeger, K.-E. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1987, 53(1), 211-213.

- [84] Bumba, J.; Janíček, A. Turbidimetric determination of serum lipase. *Vnitr Lek.*, 1974, 20(11), 1116-20.
- [85] Neumann, U.; Knitach, K.W.; Ziegenhorn, J.; Roder, A.; Zwez, W.; Krämer, W. Reagens zur lipasebestimmung und verfahren zu seiner herstellung. German Patent 2 904 305, February 5, 1979.
- [86] Neumann, U.; Kaspar, P.; Ziegenhorn, J. Lipases, turbidimetric method. In: *Methods of Enzymatic Analysis*, vol. 4; Bergmeyer, H.U.; Ed.; Weinheim, Verlag Chemie, 1984; pp. 26-34.
- [87] Prencipe, L. Turbidimetric kinetic method for rapid determination of pancreatic lipase activity in the serum. *Quad Sclavo Diagn.*, 1974, 10(3), 437-46.
- [88] Puukka; Puukka, R. Automation of the turbidimetric determination of serum lipase. *Ann. Clin. Biochem.*, 1978, 15(6), 326-330.
- [89] Shihabi, Z.K.; Bishop, C. Simplified turbidimetric assay for lipase activity. *Clin. Chem.*, 1971, 17(12), 1150-1153.
- [90] Tietz, N.; Shuey, D.; Astles, J. Turbidimetric measurement of lipase activity-problems and some solutions. *Clin. Chem.*, 1987, 33(9), 1624-1629.
- [91] Vogel, W.C.; Zieve, L. A rapid and sensitive turbidimetric method for serum lipase based upon differences between the lipases of normal and pancreatitis serum. *Clin. Chem.*, 1963, 9, 168-181.
- [92] Arzoglou, P.L.; Ferard, G.; Khalfa, F.; Metais, P. Conditions for assay of pancreatic lipase from human plasma using a nephelometric technique *Clin. Chim. Acta*, 1982, 119(3), 329-335.
- [93] Zinterhofer, L.; Wardlaw, S.; Jatlow, P.; Seligson, D. Nephelometric determination of pancreatic enzymes II. Lipase. *Clin. Chim. Acta*, 1973, 44(2), 173-178.
- [94] Kannisto, H.; Lalla, M.; Lukkari, E. Characterization and elimination of a factor in serum that interferes with turbidimetry and nephelometry of lipase. *Clin. Chem.*, 1983, 29, 96-99.
- [95] Bourguet, N.; Torréton, J-P.; Galy, O.; Arondel, V.; Goutx, M. Application of a specific and sensitive radiometric assay for microbial lipase activities in marine water samples from the lagoon of Nouméa. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, 69(12), 7395-7400.
- [96] Briquet-Laugier, V.; Ben-Zeev, O.; Doolittle, M.H. Determining lipoprotein lipase and hepatic lipase activity using radiolabelled substrates, In: *Methods in Molecular Biology*; Doolittle, M.; Reue, K.; Eds.; Humana Press, Totowa, New Jersey, 1999; pp. 81-94.
- [97] Kropp, J.; Knapp, R. (Jr.); Weyenberg, A.; McPherson, D.; Ambrose, K.; Callahan, A.; Bergmann, K.; Biersack, H-J. Evaluation of pancreatic lipase activity by simple urine analysis

after oral administration of a new iodine-131-labeled triglyceride. *Eur. J. Nuc. Med.*, 1994, 21, 1227-1230.

[98] Whayne, T. Jr.; Morelli, J. Assays for lipoprotein lipase: Comparison of radiolabeled vs. titration method and of triolein vs. intralipid substrate. *Biochemical Medicine*, 1977, 17(3), 248-257.

[99] Jensen, R. Detection and determination of lipase (acylglycerol hydrolase) activity from various sources. *Lipids*, 1983, 18(9), 650- 657.

[100] Huang, J.; Roheim, P.S.; Sloop, C.H.; Wong, L. A sensitive, inexpensive method for determining minute quantities of lipase activity. *Anal. Biochem.*, 1989, 179, 413-417.

[101] Aoubala, M.; Douchet, I.; Bezzine, S.; Hirn, M.; Verger, R.; De Caro, A. Immunological techniques for the characterization of digestive lipases. In: *Methods Enzymol.* Dennis, E.; Rubin, B.; Eds.; Academic Press, INC, San Diego, 1997; pp. 126-149.

[102] De Caro, A.; Bezzine, S.; Lopez, V.; Aoubala, M.; Daniel, C.; Verger, R.; Carrière, F. Immunological characterization of digestive lipases. In: *Methods Mol. Biol.*; Doolittle, M.; Reue, K.; Eds.; Humana Press, Totowa, New Jersey, 1999, pp. 239-256.

[103] Doolittle, M.; Ben-Zeev, O. Immunodetection of lipoprotein lipase: antibody production, immunoprecipitation, and western blotting techniques. In: *Methods Mol. Biol.*; Doolittle, M. Reue, K.; Eds.; Humana Press, Totowa, New Jersey, 1999; pp. 215-237.

[104] Grenner, G.; Deutch, G.; Schmidtberger, R.; Dati, F. A highly sensitive immunoassay for the determination of pancreatic lipase. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 1982, 20, 515-519.

[105] Hayakawa, T.; Kondo, T.; Shibata, T.; Kitagawa, M.; Ono, H.; Sakai, Y.; Kiriyama, S. Enzyme immunoassay for serum pancreatic lipase in the diagnosis of pancreatic diseases. *Gastroenterol. Jpn.*, 1989, 24, 556-560.

[106] Ingen, H.E.; Sanders, G.T.B. Clinical evaluation of a pancreatic lipase mass concentration assay. *Clin. Chem.*, 1992, 38, 2310-2313.

[107] Kawamura, M.; Gotoda, T.; Mori, N.; Shimano, H.; Kozaki, K.; Harada, K.; Shimada, M.; Inaba, T.; Watanabe, Y.; Yazaki, Y. Establishment of enzyme-linked immunosorbent assays for lipoprotein lipase with newly developed antibodies. *J. Lipid Res.*, 1994, 35, 1688-1697.

[108] Moller-Petersen, J.; Klaerke, M.; Dati, F.; Toth, T. Immunochemical qualitative latex agglutination test for pancreatic lipase in serum evaluated for use in diagnosis of acute pancreatitis, *Clin. Chem.*, 1985, 31, 1207-1210.

- [109] Singhbist, A.; Maheux, P.; Azhar, S.; Chen, Y.D.I.; Komaromy, M.C.; Kraemer, F.B. Generation of antibodies against a human lipoprotein lipase fusion protein. *Life Sci.*, 1995, 57, 1709-1715.
- [110] Sternby, B.; Nilsson, A.; Melin, T.; Borgström, B. Pancreatic lipolytic enzymes in human duodenal contents: radioimmunoassay compared with enzyme activity. *Scand. J. Gastroenterol.*, 1991, 26, 859-866.
- [111] Sternby, B.; Akerstrom, B. Immunoreactive pancreatic colipase, lipase and phospholipase A2 in human plasma and urine from healthy individuals. *Biochim. Biophys. Acta*, 1984, 789, 164-169.
- [112] Uhl, W.; Malfertheiner, P.; Drosdat, H.; Martini, M.; Buechler, M. Determination of pancreatic lipase by immunoactivation technology: a rapid test system with high sensitivity and specificity. *Int. J. Pancreatol.*, 1992, 12, 253-261.
- [113] Vannier, C.; Deslex, S.; Pradines-Figueres, A.; Ailhaud, G. Biosynthesis of lipoprotein lipase in cultured mouse adipocytes. I. Characterization of a specific antibody and relationships between the intracellular and secreted pools of the enzyme. *J. Biol. Chem.*, 1989, 264, 13199-13205.
- [114] Vilella, E.; Joven, J. In vitro measurement of lipoprotein and hepatic lipases. *Methods Mol. Biol.*, 1998, 110, 243-251.
- [115] Zsigmond, E.; Lo, J.; Smith, L.; Chan, L. Immunochemical quantitation of lipoprotein lipase. *Methods Enzymol.*, 1996, 263, 327-333.
- [116] ABO-Biotechnology.  
<http://www.medicinekit.com/medicinekit/human%20ELISA%20reagent%20case/Human-Lipase-ELISA-Kit/> (Accessed December 16, 2011).
- [117] ALPCO Immunoassays. <http://www.alpco.com/pdfs/47/47-LPLHU-E01.pdf> (Accessed December 16, 2011).
- [118] Antibodies.  
<http://www.antibodiesonline.com/kit/627172/Hormone+Sensitive+Lipase+ELISA/> (Accessed December 16, 2011).
- [119] Alpha Diagnostic Int. <http://www.4adi.com/objects/catalog/product/extras/1310.pdf> (Accessed December 16, 2011).
- [120] Bio-Equip. <http://www.bioequip.cn/enshow1equip.asp?equipid=4140&division=2535> (Accessed December 16, 2011).

- [121] DRG International Inc. <http://www.drg-international.com/ifu/eia-4459.pdf> (Accessed December 16, 2011).
- [122] MyBioSource. [http://www.mybiosource.com/datasheet.php?products\\_id=720741](http://www.mybiosource.com/datasheet.php?products_id=720741)  
(Accessed December 16, 2011).
- [123] Iizumi, T.; Nakamura, K.; Fukase, T. Purification and characterization of a thermostable lipase from newly isolated *Pseudomonas* sp. KWI-56. *Agric. Biol. Chem.*, 1990, 54, 1253-1258.
- [124] Ballot, C.; Favre-Bonvin, G.; Wallach, J.M. Lipase assay in duodenal juice using a conductimetric method. *Clin. Chim. Acta*, 1984, 143(2), 109-114.
- [125] Ballot, C.; Saizonou-Manika, B.; Mealet, C.; Favre-Bonvin, G.; Wallach, J.M. Conductimetric measurements of enzyme activities. *Anal. Chim. Acta*, 1984, 163, 305-308.
- [126] Ballot, C.; Favre-Bonvin, G.; Wallach, J.M. Conductimetric assay of a bacterial lipase using triacetin as a substrate. *Anal. Letters*, 1982, 15(B13), 1119-1129.
- [127] Fuchs, B.; Süß, R.; Teuber, K.; Eibisch, M.; Schiller, J. Lipid analysis by thin-layer chromatography-A review of the current state. *Journal of Chromatography A*, 2011, 1218, 2754-2774.
- [128] Ruiz-Larrea, M.F.; Galdiz-Valdovinos, B.; Rodríguez-Fernández, C. Kinetic study of hepatic triglyceride lipase from rat liver soluble fraction. *Enzyme*, 1982, 27, 215-219.
- [129] Kulkarni, N.; Gadre, R.V. Simple gas chromatography method for lipase assay. *Biotechnol. Techniques*, 1998, 12(8), 627-628.
- [130] Ergan, F.; André, G. Simple high performance liquid chromatography methods for monitoring lipase reactions. *Lipids*, 1989, 24(1), 76-78.
- [131] Mingarro, I.; González-Navarro, H.; Braco, L. Direct HPLC monitoring of lipase activity in reverse micellar media. *J. Liquid Chromatogr.*, 1995, 18(2), 235-244.
- [132] Hao, G., Yang, L., Mazsaroff, I., Lin, M. Quantitative determination of lipase activity by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrometry*, 2007, 18, 1579-1581.
- [133] IUPAC. *Compendium of Chemical Terminology*, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by McNaught, A. D.; Wilkinson, A.; Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1997.
- [134] Starodub, N.F. Biosensors for the evaluation of lipase activity. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 2006, 40(3-4), 155-160.

- [135] Minakshi; Pundir, C.S. Construction of an amperometric enzymic sensor for triglyceride determination. *Sensors and Actuators B*, 2008, 133, 251-255.
- [136] Narang, J.; Minakshi; Bhambi, M.; Pundir, C.S. Fabrication of an amperometric triglyceride biosensor based on PVC Membrane. *Anal. Letters*, 2009, 43(1), 1-11.
- [137] Pundir, C. S.; Singh, B.S.; Narang, J. Construction of an amperométrico triglyceride biosensor using PVA membrane bound enzymes. *Clin. Biochem.*, 2010, 43(4-5), 467-472.
- [139] Narang, J.; Minakshi; Bhambi, M.; Pundir, C.S. Determination of serum triglyceride by enzyme electrode using covalently immobilized enzyme on egg shell membrane. *Int. J. Biol. Macromolecules*, 2010, 47(5), 691-695.
- [140] Dhand, C.; Solanki, P.; Sood, K.N.; Datta, M.; Malhotra, B.D. Polyaniline nanotubes for impedimetric triglyceride detection. *Electrochem. Communications*. 2009, 11, 1482-1486.
- [141] Fernandez, R.E.; Hareesh, V.; Bhattacharya, E.; Chadha, A. Comparison of a potentiometric and a micromechanical triglyceride biosensor. *Biosens. Bioelectron.*, 2009, 24, 1276-1280.
- [142] Vijayalakshmi, A.; Tarunashree, Y.; Baruwati, B.; Manoramab, S.V.; Narayana, B.L.; Johnson, R.E.C.; Rao, N.M. Enzyme field effect transistor (ENFET) for estimation of triglycerides using magnetic nanoparticles. *Biosens. Bioelectron.*, 2008, 23, 1708- 1714.
- [143] Mirsky, V.M.; Krause, C.; Heckmann, K.D. Capacitive sensor for lipolytic enzymes. *Thin Solid Films*, 1996, 284-285, 939-941.
- [144] Rejeb, I.; Arduini, F.; Amine, A.; Gargouri, M.; Palleschi, G. Amperometric biosensor based on Prussian Blue-modified screenprinted electrode for lipase activity and triacylglycerol determination. *Anal. Chim. Acta*, 2007, 594(1), 1-8.
- [145] QSENSE. <http://www.q-sense.com/proteins> (accessed December 16, 2011).
- [146] Arima, K., Ichibangase, T., Ohba, Y., Kishikawa, N., Kuroda, N. Simple and rapid chemiluminescence assay for lipase activity in pharmaceutical preparations using proenhancer substrate. *Bunseki Kagaku*, 2006, 55, 307-311.
- [147] Morak, M., Schmidinger, H., Krempl, P., Rechberger, G., Kollroser, M., Birner-Gruenberger, R., Hermetter, A. Differential activity-based gel electrophoresis for comparative analysis of lipolytic and esterolytic activities. *J. Lipid Research*, 2009, 50, 1281-1292.
- [148] Karnetová, J.; Matějka, J.; Ježanka, T.; Procházka, P.; Nohánek, M.; Rokos, J. Estimation of lipase activity by the diffusion plate method. *Folia Microbiologica*, 1984, 29(4), 346-347.

- [149] Samad, M.Y.A.; Razak, C.N.A.; Salleh, A.B.; Yunus, W.M.Z.W.; Ampon, K.; Basri, M. A plate assay for primary screening of lipase activity. *J. Microbiol. Methods*, 1989, 9(1), 51-56.
- [150] Ladefoged, C.; Cagna, A.; Gormsen, E. Lipase activity as a function of interfacial tension using the rising drop method on a new oil drop tensiometer. *Ann. New York Acad. Sci.*, 2006, 750(1), 202- 208.
- [151] Nury, S.; Piéroni, G.; Rivière, C.; Gargouri, Y.; Bois, A.; Verger, R. Lipase kinetics at the triacylglycerol-water interface using surface tension measurements. *Chem. Phys. Lipids.*, 1987, 45(1), 27-37.
- [152] Menon, G.; Ghadially, R.; Williams, M.; Elias, P. Lamellar bodies as delivery systems of hydrolytic enzymes: implications for normal and abnormal desquamation. *Br. J. Dermatol.*, 1992, 126, 337-45.
- [153] Murata, F.; Yokota, S.; Nagata, T. Electron microscopic demonstration of lipase in the pancreatic acinar cells of mice. *Histochemistry and Cell Biology*, 1968, 13(3), 215-222.
- [154] Balashev, K.; Jensen, T.R.; Kjaer, K.; Bjørnholm, T. Novel methods for studying lipids and lipases and their mutual interaction at interfaces. Part I. Atomic force microscopy. *Biochemistry*, 2001, 8(5), 387-97.
- [155] Nielsen, L.; Risbo, C.T.; Bjornholm, T. Lag-burst kinetics in phospholipase A2 hydrolysis of DPPC bilayers visualized by atomic force microscopy. *Biochim. Biophys. Acta*, 1999, 1420, 266-271.
- [156] O'Connor, C.; Petricevic, S.; Coddington, J.; Stanley, R. An NMR assay for quantitating lipase activity in biphasic macroemulsions. *J. Amer. Oil Chemists' Soc.*, 1992, 69(4), 295-300.
- [157] Skoog, West, Holler, Crouch. *Fundamentos de Química analítica*. Octava edición. Editorial Thomson.
- [158] Martín A. Zalazara, Fabio A. Guarnieria. Microbalanza de cristal de cuarzo: diseño y simulación. *Mecanica Computacional*, 2009, 28: 2123-2136
- [159] Vasile Mihai Mecea. From Quartz Crystal Microbalance to Fundamental Principles of Mass Measurements. *Analytical Letters*, 2005, 38: 753–767.
- [160] C.K. O'Sullivan, G.G. Guilbault. Commercial quartz crystal microbalances – theory and Applications. *Biosensors & Bioelectronics*, 1999, 14:663–670.
- [161] P. Pinsirodom and K. Parkin, in *Handbook of food analytical chemistry, water, proteins, enzymes, lipids, and carbohydrates*, eds. R.E. Wrolstad, E.A. Decker, S.J. Schwartz and P. Sporns, Wiley, New Jersey, 2005, ch. C3, pp. 370-383.

# 7. Anexos

# Analytical Methods for Lipases Activity Determination: A Review

Margarita Stoytcheva<sup>1,\*</sup>, Gisela Montero<sup>1</sup>, Roumen Zlatev<sup>1</sup>, José Ángel León<sup>1</sup> and Velizar Gochev<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali, México; <sup>2</sup>Department of Biochemistry and microbiology, Plovdiv University, Plovdiv, Bulgaria

**Abstract:** The increasing industrial demand for lipases has led to the identification of new sources of enzymes with unique properties and generated a great interest in applying rapid, reliable, specific, selective, and sensitive analytical methods for evaluating their catalytic activity. This work offers a professional look on the achievements and the emerging strategies for lipases activity determination, involving volumetry, spectrometry, radioactive assays, immunoassays, conductimetry, chromatography, and biosensors. The principle, the advantages, and the deficiencies of each of these methods are addressed in detail.

**Keywords:** Analytical methods, Biosensors, Catalytic activity, Conductimetry, Chromatography, Immunoassays, Lipase, Radioactive assays, Spectrometry, Volumetry.

## 1. INTRODUCTION

Lipases (EC 3.1.1.3 triacylglycerol acylhydrolase) are a group of water soluble enzymes, which exhibit the ability of acting at the interface between aqueous and organic phases. They primarily catalyze the hydrolysis of ester bonds in water insoluble lipid substrates. However, some lipases are also able to catalyze the processes of esterification, interesterification, transesterification, acidolysis, aminolysis and may show enantioselective properties [1]. The unique features and biotechnological potential of lipases have led to their use in food, detergent, pharmaceutical, leather, textile, cosmetic, and paper industries [2, 3]. Efficient, energy-saving, and environmental friendly biodiesel production by lipase catalyzed transesterification was recently suggested as a promising alternative to the conventional chemical catalysis [4].

Lipases are of plant, animal, and microbial origin, but only bacterial and fungal lipases such as: *Candida antarctica* (Novozym 435), *Candida Rugosa* (Lipase AY), *Pseudomonas cepacia* (Lipase PS), *Pseudomonas fluorescens* (Lipase AK), *Pseudomonas aeruginosa*, and *Thermomyces lanuginose* (Lipozyme TL), among others are produced at industrial scale [5]. The catalytic properties and potential applications of *Bacillus* lipases are extensively reviewed by Guncheva & Zhiryakova [6]. Among the available lipase producing microorganisms, filamentous fungi belonging to various species of genera *Aspergillus* [7, 8], *Rhizopus* [9, 10] *Penicillium* [11-13], and *Trichoderma* [14, 15] have been described as potentially the most useful for industrial purposes lipases producers. A review on microbial lipases production with emphasis on lipases engineering and use of mathematical models for process improvement and control is provided by Treichel *et al.* [16].

The growing industrial demand for lipases has led to the identification of new and prospective highly lipase productive microbial strains together with rational enzyme properties design to achieve high levels of activity and substrate specificity, and has generated a great interest in applying rapid, reliable, specific, selective, and sensitive analytical methods for lipases activity evaluation. Most of these are comprehensively reviewed by Jensen, 1983 [17], Thomson *et al.*, 1999 [18], Beisson *et al.*, 2000 [19], Gupta *et al.*, 2003 [20], Starodoub, 2006 [21], and Hasan, 2009 [1]. The current review provides recent information on the achievements and the emerging strategies for lipases activity quantification, involving volumetry, spectrometry, radioactive assays, immunoassays, conductimetry, chromatography, and biosensors. The principle, the advantages, and the deficiencies of each of these methods are addressed in detail.

## 2. METHODS FOR LIPASES ACTIVITY DETERMINATION

### 2.1. Volumetry

The method is based on the titrimetric determination of the free fatty acids released from triacylglycerols by lipase catalyzed hydrolysis. The techniques applied involve sample incubation and end-point alkaline titration of the liberated acids or continuous titration of the generated products in a pH-stat titrator. Results are dependent on lipase activity. The commonly used titrant is NaOH. The end-point method has been known since 1932 when it was applied for serum lipase activity evaluation, using phenolphthalein as indicator [22]. However, the 24 h incubation time at 40°C, as well as the rapid separation of the substrate emulsion/enzyme solution mixture limited its experimental utilization and led to its modification aiming the reduction of the incubation time and experimental conditions optimization [23]. Ideal substrates are the long-chain triacylglycerols triolein and olive oil [24, 25]. Triolein is a highly specific lipase substrate; nevertheless, the high content of triolein in olive oil and its lower cost

\*Address correspondence to this author at the Instituto de Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California, Blvd. B. Juárez s/n, 21280 Mexicali, Mexico; Tel./Fax: +52 6865664150; E-mail: margarita@iing.mx1.uabc.mx

makes it most suitable in lipase activity assays. Another commonly used substrate is tributyrin; it is not as specific as triolein, but exhibits the property of forming aqueous dispersions in the absence of emulsifiers [26]. Butyric acid and sodium butyrate released are water soluble, in contrast to triolein, olive oil, and the products of their lipolysis. The long-chain triacylglycerols need to be emulsified, typically using gum arabic or various detergents. The substrate used in the recommended European Pharmacopeia standard lipase activity assay is olive oil, in a gum arabic stabilized emulsion. It has been demonstrated that the increased oil/water interface leads to an increase in the enzymatic hydrolysis rate [27]. The complete titration of the oleic acid released is achieved at pH 9, because of its high  $pK_a$  value, but butyric acid could be titrated at pH 6.

Despite of its deficiencies: long analysis time (2 determinations/h), low sensitivity ( $1 \mu\text{mol mL}^{-1}$ ), tedious measurements, and errors due to incomplete titration, the titrimetric method for lipases activity determination remains in use as a reference method.

## 2.2. Spectrometric Methods

### 2.2.1. Colorimetry

Colorimetric assays as the titrimetric ones are based on the quantification of the lipolysis products. The released free fatty acids are converted in a blue color soap of cupric complexes of the fatty acids. The colored end products are extracted into an organic solvent and evaluated by spectrophotometric measurements [28, 29]. The numerous attempts made to improve the method resulted in reduction of the analysis time (4 determinations/h) by shortening the incubation period and by eliminating the phase transfer steps [30-36]. Sensitivity increase was achieved by selecting appropriate color developing reagents and suitable organic solvents [35-37]. The method is specific for fatty acids and more sensitive in comparison to titrimetric method. Redding [38] for instance performed lipase activity determinations in the range  $0.02\text{-}0.4 \text{ nmol mL}^{-1}$ . The drawbacks of the method are related to the use of toxic organic solvents.

### 2.2.2. Visible Spectrophotometry

The spectrophotometric methods for lipase activity determination make use of synthetic lipase substrates transformed upon enzyme catalyzed hydrolysis into products able to be detected spectrophotometrically. The predominant substrates are *p*-nitrophenyl and naphthyl esters of the long chain fatty acids, and thioesters.

The lipolysis of the *p*-nitrophenyl esters (laurates, palmitates, oleates) gives rise to the yellow colored *p*-nitrophenol, measured at 405-410 nm [39-51]. The deficiency of the method is related to the pH dependence of the *p*-nitrophenol absorption coefficient and the total absence of absorption at acidic pH values. In addition, *p*-nitrophenol esters could undergo a non-enzymatic hydrolysis [19].

The cleavage of the naphthyl esters (naphthylcaprylate, naphthylacetate, naphthylpropionate) yields naphthol, in which the red colored complex with diazonium salts is monitored at 560 nm [52-55].

Thioesters produce thiols which are coupled with the Ellman's reagent (5, 5'-dithiobis 2-nitro benzoate, DTNB) to obtain yellow colored TNB anions, evaluated at 412 nm [56-58]. These processes have been employed for the development of rapid and sensitive ( $40\text{-}1600 \text{ mU mL}^{-1}$ ) lipase assay kits [59, 60], using dimercaptopropanol tributyrate (BALB) as a substrate.

Another lipase assay kit, based on the method developed by Panteghini [61] is proposed by Randox [62]. The lipase substrate used is the resorufin ester 1, 2-*o*-dilauryl-rac-glycero-3-glutaric acid-(6-methylresorufin) transformed upon enzymatic hydrolysis into methyl resorufin, which is quantified at 570 nm. The sensitivity achieved is  $4 \text{ mU mL}^{-1}$ . However, as established by Beisson [19], the hydrolytic activity measured in a plant homogenate with the resorufin ester could not be attributed to a true lipase activity. In addition, resorufin ester is poorly hydrolyzed by many lipases [19].

A common drawback of the mentioned spectrophotometric methods is the low substrate specificity of the enzyme towards the synthetic substrate analogues.

Alternative methods are based on the spectrophotometric quantification of the glycerol formed as a result of the triacylglycerols lipolysis, according to the following scheme: acylglycerol cleavage; periodic glycerol oxidation to formaldehyde; formaldehyde conversion with chromotropic acid to a violet chromophore which is then spectrophotometrically quantitated [63].

Other assays [64, 65] make use of a series of coupled enzyme reactions to convert the released glycerol and formation of a quinoneimine dye monitored at 545 nm. Such a test assay kit was developed by Sigma [66].

In BioVision's Lipase Assay Kit [67] glycerol is quantified enzymatically by monitoring a linked change in the Oxi-Red probe absorbance ( $\lambda=570\text{nm}$ ). Lipase activity is detected at levels as low as  $0.02 \text{ mU}$  per well.

The spectrophotometric methods allow performing 4 determinations/h, but their number could be increased up to 16-96 determinations/h using automated systems and multi-cuvettes holders or 96-well microplate readers.

### 2.2.3. IR Spectrophotometry

The method is based on the analysis of the Fourier Transform Infrared spectrum monitoring lipases catalyzed hydrolysis of triacylglycerols [68, 69]. Fatty acid esters and free fatty acids can be evaluated on the basis of their molar absorption coefficients and Beer's law. Because of the pH dependence of the carbonyl absorption frequency of the free fatty acids, lipolytic activity should be quantified preferentially using the specific carbonyl ester absorption frequency at  $1730\text{-}1750 \text{ cm}^{-1}$  [70]. Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared Spectroscopy (ATR-FTIR) was applied for monitoring lipase activity on surface-attached substrate films [70].

### 2.2.4. Fluorometry

Fluorometry is a sensitive analytical technique allowing continuous monitoring of enzyme activity. The numerous fluorometric methods for lipase activity determination could

be classified as methods using chromogenic substrates, and methods based on the quantification of the fatty acids released after their conversion into chromogenic products.

A variety of fatty acid esters derived from parinaric acid [71-74], coumarin (umbelliferone) [75-79], pyrenic compounds [80-83], resorufin [884], fluorescein [85], etc. are used as chromogenic substrates.

Parinaric acid is a naturally occurring chromophore, providing fluorescence at 432 nm with an excitation wavelength at 320 nm. It was successfully applied to pancreatic lipase activity measurement with a limit of detection of 0.1 ng at pH 8. Significant increase of the free parinaric acid fluorescence was observed in the presence of detergents [19]. A drawback of the assay is parinaric acid oxidation by the atmospheric oxygen [19].

Numerous coumarin fatty acid esters were synthesized and tested as chromogenic lipase substrates [79, 86]. The sensitivity reached is 0.1-5 nmol [78]. However, these substrates undergo spontaneous hydrolysis (at pH  $\geq$  8.8).

When using pyrenic acylglycerol derivatives, the free fatty acids released upon lipase catalyzed hydrolysis cause a shift in the peak fluorescence intensity. Peak intensity increase with time is correlated to lipase activity. According to the procedure developed by Marker Gene Technologies, lipase activity measurement could be performed using the fluorescent substrate 1, 2-dioleoyl-3-(pyren-1-yl) decanoyl-glycerol. Its cleavage gives the fluorescent fatty acid pyrenedecanoic acid [87]. Nevertheless, the pyrenic acylglycerol derivatives are also poorly hydrolyzed by lipases [74, 82].

Another lipase assay kit offered by Marker Gene Technologies is based on the use of the long wavelength fluorescent substrate resorufin oleate. The release of resorufin upon cleavage is quantified by fluorometry [88].

Another method based upon lipase catalyzed hydrolysis involves conversion of free fatty acids into chromogenic products using rhodamine B and measuring the emitted fluorescence at 535 nm with an excitation wavelength at 485 nm [89-91]. The method is rapid, could be automated, and allows the simultaneous determination of a large number of samples using various substrates.

### 2.2.5. Turbidimetry and Nephelometry

Turbidimetry is a method for determining the concentration of a substance in a solution by measuring the change of intensity of light in the direction of propagation of the incident beam, with reference to a standard solution. Lipase activity quantification is performed monitoring the decrease with time in the absorbance of a triacylglycerol emulsion, due to its de-emulsification with free fatty acids release [92-99]. The turbidimetric method of Neumann [93, 94] was marketed by Boehringer-Mannheim.

Another technique involved the use of Tweens as substrates with activity determined by increase in absorbance due to precipitation of the lipolysis products as calcium salts [100, 101]. The later method is 36 times more sensitive than the titrimetric assay with Tween 20, and 4 times more sensi-

tive than the spectrophotometric assay with p-nitrophenyl palmitate [20]. Nevertheless, Tweens are not specific lipase substrates.

Nephelometry involves measurement of the intensity of the scattered light. The nephelometric determination of lipase activity could be performed within 2-4 min [100-102].

In general, turbidimetry and nephelometry are very convenient methods for the fast evaluation of the lipase activity. The arising problems and some solutions have been reviewed by Tietz [98].

### 2.3. Radioactive Assays

The two main techniques applied involve: (i) use of labeled lipase substrates and quantification of the liberated products, and (ii) use of unlabeled substrates and determination of the free fatty acids labeled once released.

The radioactive substrates commonly used are oleoyl-glycerols labeled with  $^{14}\text{C}$  or  $^3\text{H}$ , as well as iodine-131-labeled triglyceride analogues [103-106]. The detectable quantity of the product was found to be of the order of nanograms [17].

Fatty acids labeling is performed by employing  $^{63}\text{Ni}$  [107].

Radioactive assays are specific and sensitive analytical methods. However, they do not allow continuous monitoring and are time-consuming, because of the implicated extraction steps to remove the fatty acids. In addition, they make use of radioactive substances.

### 2.4. Immunoassays

Immunoassays are known as highly specific and sensitive techniques for lipases activity determination. These methods are of primary importance for clinical diagnostics and are applied for lipases quantification in serum and plasma, tissues and cell cultures lysates, and duodenum [108-122]. A number of ELISA-based clinical test kits have been developed, and are useful in the range up to 500 ng mL<sup>-1</sup> lipase [123-129]. These techniques are not suitable for the evaluation of the activity of lipases originated from various sources, because they require the selection of a wide range of specific antibodies. In addition, the enzyme could form aggregates [130], which limits the accuracy of the immunological assays.

### 2.5. Conductimetry

Conductimetric evaluation of lipase activity is based on the measurement of the variation of the solution conductance due to electrical charge concentration change as a result of the release of free fatty acids. Reliable results were obtained using triacetin [131-133]. Triacetin is a suitable substrate due to its water solubility. The limiting equivalent conductivity of the liberated acetate anions is higher in comparison with that of the long-chain fatty acids, increasing the sensitivity of the determinations. The drawback of the technique is that triacetin is not a specific lipase substrate and conductimetric measurements suffer from high temperature dependence.

## 2.6. Chromatography

Chromatography is a powerful technique, well suited for testing complex matrices. The related methods currently applied for measuring lipids and released upon lipolysis free fatty acids are: thin layer chromatography, gas chromatography, and high performance liquid chromatography (HPLC).

The present state of lipid analysis by thin layer chromatography was recently reviewed by Fuchs *et al.* [134]. The method is sensitive and allows detecting picomols of fatty acids [135].

Simple and rapid gas chromatographic methods for lipase activity determination using tributyrin as substrate are described by Kulkarni and Li [136]. The techniques involve straightforward treatment procedures, short incubation period, and only 6 min analysis time after enzyme reaction.

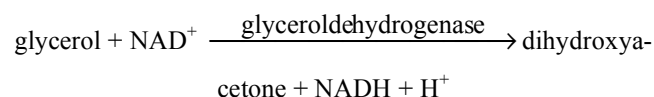
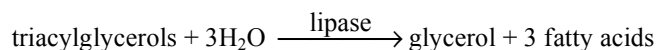
HPLC methods for monitoring lipase reactions were designed by Ergan and André [137]. Direct HPLC monitoring of lipase activity in reverse micellar media were performed by Mingarro *et al.* [138].

A novel *in vitro* lipase assay which overcomes the substrate and pH limitations of conventional techniques was developed by Hao *et al.* [139]. It is based on the quantitation of fatty acids by liquid chromatography-mass spectrometry. Oleic acids enzymatically released from triolein substrates were isolated from the reaction mixture by reverse-phase chromatography, ionized in negative mode electrospray mass spectrometry and quantitated with the aid of C<sup>13</sup>-oleic acid internal standard. The enzymatic activity was measured by monitoring oleic acid productions at multiple time points. Nevertheless, chromatographic determinations remain expensive and time consuming. In addition, they require experienced personnel and sophisticated laboratory equipment.

## 2.7. Biosensors Based Methods

The biosensors, according to the IUPAC definition, are “devices that use specific biochemical reactions mediated by isolated enzymes, immunosystems, tissues, organelles or whole cells to detect chemical compounds usually by electrical, thermal or optical signals” [140]. Various biosensors were developed for lipases substrates and lipolysis products determination, using immobilized enzymes. They are comprehensively reviewed by Starodub, 2006 [21]. The novel biosensors for triglycerides determination recently designed include: (i) amperometric biosensors, constructed by co-immobilization of lipase, glycerol kinase, and glycerol-3-phosphate oxidase onto various supports: cellulose acetate [141], PVC [142], polyvinyl alcohol [143], egg shell [144], or chitosan and zinc oxide nanoparticles composite film [145] deposited on the surface of a Pt electrode. In all cases the amperometric response is the current of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidation; (ii) impedimetric biosensor using as a support for lipase immobilization an electrophoretically deposited polyaniline nanotubes (PANI-NT) film onto indium-tin-oxide coated glass surface. Fatty acid molecules produced during triglyceride hydrolysis provoked a change in charge transfer resistance of PANI-NT film depending on triglyceride concentration [146]; (iii) potentiometric and micromechanical biosensors, based respectively on electrolyte-insulator-semi-

conductor capacitor, and a polysilicon microcantilever [147]; and (iv) enzyme field effect transistor, based on lipases immobilized via magnetic nickelferrite nanoparticles [148]. Nevertheless, only few biosensors were applied to lipase activity determination. Such a sensor is the capacitive one with a sandwich-like structure: Au/S(CH<sub>2</sub>)<sub>17</sub>CH<sub>3</sub>/substrate/electrolyte [149]. Enzyme activity is quantified by monitoring the rate of desorption of the lipolysis products. Desorption is evaluated measuring the increase of the electrode capacitance. An amperometric biosensor for lipase activity evaluation was suggested by Rejeb *et al.* [150]. It involves glycerol dehydrogenase/NADHoxidase immobilized on the surface of a Prussian Blue modified screen printed electrode. The principle of the determination is based on the following reactions:



The analytical signal is the current of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidation, determined using Prussian Blue as a mediator, and proportional to the glycerol concentration, that is dependent on the lipase activity. The measurements are performed at low electrode potential, thus avoiding interferences. The sensitivity of the analysis is inferior to that achieved by gas chromatography, but sufficient for determination of triacylglycerols levels in biological sera and food preparations.

A very convenient method for lipase activity determination was recently developed by QSENSE, using quartz crystal microbalance with dissipation (QCM-D) [151]. Triolein, used as lipase substrate, was deposited onto the surface of the gold electrode of the QCM-D. The enzyme degradation of the triolein film was continuously monitored measuring the changes in frequency and dissipation and was correlated to lipase activity.

Biosensors are considered as promising analytical tools, because of the rapidity and sensitivity of the determinations, and the low cost of the equipment.

## 2.8. Other Methods

A chemiluminescence method, allowing the completion of a single assay within 5 min, and displaying a sensitivity and a repeatability superior to those of the titration method was suggested by Arima *et al.* [152]. It uses the lauric acid ester of 2-(4-hydroxyphenyl)-4,5-diphenylimidazole (HDI-laurate) as a proenhancer substrate, and is based on the chemiluminescence reaction of luminol-horseradish peroxidase-hydrogen peroxide with HDI, which is liberated from the substrate by enzymatic hydrolysis. The method was applied to the determination of lipase activity in pharmaceutical preparations.

A novel technique for differential activity-based gel electrophoresis of lipolytic enzymes, combined with fluorescence imaging, and identification of the tagged proteins by MS/MS was developed by Morak *et al.* [153]. The study

represents the first application of this technology for comparative analysis of lipases and esterases.

In this group are also included the methods designed for lipase activity detection and lipolysis kinetics investigation, rather than for quantifying lipase activity. These involve: numerous plate assays [91, 154, 155], surface tension measurements [156, 157], electron microscopy [158, 159], atomic force microscopy [160, 161], and nucleic magnetic resonance [162] based methods.

### 3. CONCLUSION

In this work are discussed the basic principles, the advantages, and the deficiencies of the numerous established and emerging methods for lipase activity determination. Taking into consideration that none of them fulfills totally the analytical requirements, the method of choice should be selected based upon the purpose of the analysis, the available laboratory equipment, and qualified personnel. Current efforts are devoted to rapidity, sensitivity, and selectivity improvements.

### REFERENCES

- Hasan, F.; Shah, A.; Hameed, A. Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. *Biotechnol. Adv.*, **2009**, *27*, 782-798.
- Houde, A.; Kademi, A.; Leblanc, D. Lipases and their industrial applications. An overview. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **2004**, *118*, 155-170.
- Hasan, F.; Shah, A.; Hameed, A. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme Microb. Technol.*, **2006**, *39*(2), 235-251.
- Fjerbaek, L.; Christensen, V.; Norddahl, B. A review of the current state of biodiesel production using enzymatic transesterification. *Biotechnol. Bioeng.*, **2009**, *102*(5), 1298-1315.
- Seitz, E. Industrial application of microbial lipases: A review. *J. Amer. Oil Chemists' Society*, **1973**, *51*(2), 12-16.
- Guncheva, M.; Zhiryakova, D. Catalytic properties and potential applications of *Bacillus* lipases. *J. Mol. Catalysis B: Enzymatic*, **2011**, *68*, 1-21.
- Adinarayana, K.; Bapi Raju, K.V.V.S.N.; Zargar, M.I.; Devi, R.B.; Lakshmi, P.J.; Ellaiah, P. Optimization of process parameters for production of lipase in solid-state fermentation by newly isolated *Aspergillus* species. *Ind. J. Biotechnol.*, **2004**, *3*, 65-69.
- Karanam, S.K.; Medicherla, N.R. Enhanced lipase production by mutation induced *Aspergillus japonicus*. *African J. Biotechnol.*, **2008**, *7*, 2064-2067.
- Hiol, A.; Jonzo, M.D.; Rugani, N.; Druet, D.; Sarda, L.; Comeau, L.C. Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit. *Enzyme Microb. Technol.*, **2000**, *26*, 421-430.
- Shukla, P.; Gupta, K. Ecological screening for lipolytic molds and process optimization for lipase production from *Rhizopus oryzae* KG-5. *J. Appl. Sci. Environ. Sanit.*, **2007**, *2*, 35-42.
- Chahinian, H.; Vanot, G.; Ibrik, A.; Rugani, N.; Sarda, L.; Comeau, L.C. Production of extracellular lipases by *Penicillium cyclopium* purification and characterization of a partial acylglycerol lipase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **2000**, *64*, 215-222.
- Lima, V.M. G.; Krieger, N.; Sarquis, M.I.M.; Mitchell, D.A.; Ramos, L.P.; Fontana, J.D. Effect of nitrogen and carbon sources on lipase production by *Penicillium aurantiogriseum*. *Food Technol. Biotechnol.*, **2003**, *41*, 105-110.
- Vardanega, R.; Remonato, D.; Arbter, F.; Polloni, A.; Rigo, E.; Ninow, L.N.; Treichel, H.; Oliveira, D.; Luccio, M. A Systematic study on extraction of lipase obtained by solid-state fermentation of soybean meal by a newly isolated strain of *Penicillium sp.* *Food Process. Technol.*, **2010**, *3*, 461-465.
- Kashmiri, M.A.; Adnan, A.; Butt, B.W. Production, purification and partial characterization of lipase from *Trichoderma viride*. *African J. Biotechnol.*, **2006**, *5*, 878-882.
- Rajesh, E.M.; Arthe, R.; Rajendran, R.; Balakumar, C.; Pradeepa, N.; Anitha, S. Investigation of lipase production by *Trichoderma reesei* and optimization of production parameters. *EJEAFChe*, **2010**, *9*, 1177-1189.
- Treichel, H.; Oliveira, D.; Mazutti, M.; Di Luccio, M.; Oliveira, J. A review on microbial lipases production. *Food Bioprocess Technol.*, **2010**, *3*, 182-196.
- Jensen, R. Detection and determination of lipase (acylglycerol hydrolase) activity from various sources. *Lipids*, **1983**, *18*(9), 650-657.
- Thomson, C.A.; Delaquis, P.J.; Mazza, G. Detection and measurement of microbial lipase activity: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **1999**, *39*(2), 165-87.
- Bisson, F.; Tiss, A.; Rivière, C.; Verger, R. Methods for lipase detection and assay: a critical review. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **2000**, *2*(2), 133-153.
- Gupta, R.; Rathi, P.; Gupta, N.; Bradoo, S. Lipase assays for conventional and molecular screening: an overview. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **2003**, *37*, 63-71.
- Starodub, N.F. Biosensors for the evaluation of lipase activity. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, **2006**, *40*(3-4), 155-160.
- Cherry, I.S.; Crandall, L.A. The specificity of pancreatic lipase; its appearance in the blood after pancreatic injury. *Am. J. Physiol.*, **1932**, *100*, 266-273.
- Tietz, N.; Fiereck, E. Serum lipase. *Stand. Methods Clin. Chem.*, **1972**, *7*, 19-31.
- Wrolstad, R.; Decker, E.; Schwartz, S.; Sporns, P. *Handbook of Food Analytical Chemistry, Water, Proteins, Enzymes, Lipids, and Carbohydrates*; Wiley: New Jersey, **2005**.
- Pandey, A.; Webb, C.; Soccol, C.R.; Larroche, C. Eds.; *Enzyme technology*; Springer, **2006**.
- Lowe, M. Assays for pancreatic trygliceride lipase and colipase. In: *Lipase and Phospholipase Protocols*; Doolittle, M; Reue, K.; Eds.; Humana Press, Totowa, New Jersey, **1999**; pp. 59-70.
- Benzonana, G.; Desnuelle, P. Etude cinétique de l'action de la lipase pancréatique sur des triglycérides en émulsion. Essai d'une enzymologie en milieu hétérogène. *Biochim. Biophys. Acta*, **1965**, *105*(1), 121-136.
- Duncombe, W.G. The colorimetric determination of long-chain fatty acids in the 0.05-0.5µmole range. *Biochem. J.*, **1963**, *88*, 7-10.
- Duncombe, W.G. The colorimetric micro-determination of non-esterified fatty acids in plasma. *Clin. Chim. Acta*, **1964**, *9*(2), 122-125.
- Dirstine, P.H.; Sobel, C.; Henry, R.J. A new rapid method for the determination of serum lipase. *Clin. Chem.*, **1968**, *14*(11), 1097-1106.
- Yang, J.S.; Biggs, H.G. Rapid, reliable method for measuring serum lipase activity. *Clin. Chem.*, **1971**, *17*(6), 512-518.
- Myrtle, J.; Zell, W. Simplified photometric copper-soap method for rapid assay of serum lipase activity. *Clin. Chem.* **1975**, *21*(10), 1469-1473.
- Blain, J.A.; Akhtar, M.W.; Patterson, J.D.E. Study on lipase activities using organic solvent systems. *Pak. J. Biochem.*, **1976**, *10*, 41-53.
- Kim, K.H.; Kwon, D.Y. Rhee, J.S. Effects of organic solvents on lipase for fat splitting. *Lipids*, **1984**, *19*(12), 975-977.
- Kwon, D.; Rhee, J.S. A simple and rapid colorimetric method for determination of free fatty acids for lipase assay. *J. Amer. Oil Chemists' Society*, **1986**, *63*(1), 89-92.
- Lowry, R.L.; Tinsley, I.J. Rapid colorimetric determination of free fatty acids. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1976**, *53*, 470-472.
- Hron, W.T.; Menahan, L.A. A sensitive method for the determination of free fatty acids in plasma. *J. Lipid Res.*, **1981**, *22*, 377-381.
- Redding, W.; Mayer, G.G.; Lornell, J.W. A semiautomated assay for nonesterified fatty acids in the 0.02 to 0.4 mueq/ml range. *J. Lipid Res.*, **1983**, *24*(1), 100.
- Becker, P.; Abu-Reesh, I.; Markossian, S.; Antranikian, G.; Märkl, H. Determination of the kinetic parameters during continuous cultivation of the lipase-producing thermophile *Bacillus sp.* on olive oil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **1997**, *48*(2), 184-190.
- Labuschagne, R.B.; van Tonder, A.; Litthauer, D. Flavobacterium odoratum lipase: isolation and characterization. *Enzyme Microb. Technol.*, **1997**, *21*, 52-58.
- Pencreac'h, G.; Baratti, J. C. Hydrolysis of p-nitro-phenyl palmitate in n-heptane by the *Pseudomonas cepacia* lipase: a simple test

- for the determination of lipase activity in organic media. *Enz. Microb. Technol.*, **1996**, *18*(6), 417-422.
- [42] Ushio, K.; Hirata, T.; Yoshida, K.; Sakae, M.; Hirose, C.; Suzuki, T.; Ishizuka, M. Superinducers for induction of thermostable lipase production by *Pseudomonas* species NT-163 and other *Pseudomonas*-like bacteria. *Biotechnol. Lett.*, **1996**, *10*, 267-272.
- [43] Kojima, Y.; Yokoe, M.; Mase, T. Purification and characterization of an alkaline lipase from *Pseudomonas fluorescens* AK102. *Bio-sci. Biotech. Biochem.*, **1994**, *58*, 1564-1568.
- [44] Sigurgisladóttir, S.; Konráðsdóttir, M.; Jónsson, Á.; Kristjánsson, J.; Matthiasson, E. Lipase activity of thermophilic bacteria from icelandic hot springs. *Biotechnol. Lett.*, **1993**, *15*(4), 361-366.
- [45] Kordel, M.; Hofmann, B.; Schomburg, D.; Schmid, R. Extracellular lipase of *Pseudomonas* sp. strain ATCC 21808: purification, characterization, crystallization, and preliminary X-ray diffraction data. *J. Bacteriol.*, **1991**, *173*, 4836-4841.
- [46] Winkler, U.K.; Stuckmann, M. Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.*, **1979**, *138*, 663-670.
- [47] Huggins, C.; Lapidus, J. Chromogenic substrates. IV. Acyl esters of p-nitrophenol as substrates for the colorimetric determination of esterases. *J. Biol. Chem.*, **1947**, *170*, 467-482.
- [48] Stuer, W.; Jaeger, K.E.; Winkler, U.K. Purification of extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, **1986**, *168*, 1070-1074.
- [49] Vorderwülbecke, T.; Kieslich, K.; Erdmann, H. Comparison of lipases by different assays. *Enzyme Microb. Technol.*, **1992**, *14*(8), 631-639.
- [50] Liebeton, K.; Zacharias, A.; Jaeger, K.E. Disulfide bonding *Pseudomonas aeruginosa* lipase stabilizes the structure but is not required for interaction with its foldase. *J. Bacteriol.*, **2001**, *183*(2), 597-603.
- [51] Dimitrijević, A.; Veličković, D.; Bezbradica, D.; Bihelović, F.; Jankov, R.; Milosavić, N. Production of lipase from *Pseudozyma aphidis* and determination of the activity and stability of the crude lipase preparation in polar solvents. *J. Serb. Chem. Soc.*, **2001**, *76*, 1081-1092.
- [52] Gandolfi, R.; Marinelli, F.; Lazzarini, A.; Molinari, F. Cell-bound and extracellular carboxylesterases from *Streptomyces*: hydrolytic and synthetic activities. *J. Appl. Microbiol.*, **2000**, *89*(5), 870-875.
- [53] Lanz W.W.; Williams, P.P. Characterization of esterases produced by a ruminal bacterium identified as *Butyrivibrio fibrisolvens*. *J. Bacteriol.*, **1973**, *113*(3), 1170-1176.
- [54] Nachlas, M.M.; Blackburn, R. The colorimetric determination of urinary lipase. *J. Biol. Chem.*, **1958**, *230*, 1051-1061.
- [55] Degrassi, G.; Uotila, L.; Klima, R.; Venturi, V. Purification and properties of an esterase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and identification of the encoding gene. *Appl. Environ. Microbiol.*, **1999**, *65*(8), 3470-3472.
- [56] Furukawa, I.; Kurooka, S.; Arisue, K.; Kohda, K.; Hayashi, C. Assays of serum lipase by the "BALB- DTNB method" mechanized for use with discrete and continuous- flow analyzers. *Clin Chem.*, **1982**, *28*, 110-113.
- [57] Lombard, S.; Helmy, M.E.; Piérone, G. Lipolytic activity of ricin from *Ricinus sanguineus* and *Ricinus communis* on neutral lipids. *Biochem. J.*, **2001**, *358*, 773-781.
- [58] Kurooka, S.; Kitamura, T. Properties of serum lipase in patients with various pancreatic diseases. Analysis by a new serum lipase assay method (the BALB-DTNB method) in combination with gel-filtration and iso-electrofocusing techniques. *J. Biochem. (Tokyo)*, **1978**, *84*, 1459-66.
- [59] BioVision lipase assay. <http://www.biovision.com/manuals/K723.pdf?osCsid=v2nosiqm7mav4kvsmm6qvfm83> (Accessed December 16, **2011**).
- [60] BioAssay Systems' QuantiChrom™ Lipase Assays. [http://www.bioassaysys.com/file\\_dir/DLPS.pdf](http://www.bioassaysys.com/file_dir/DLPS.pdf) (Accessed December 16, **2011**).
- [61] Panteghini, M.; Bonora, R.; Pagani, F. Measurement of pancreatic lipase activity in serum by a kinetic colorimetric assay using a new chromogenic substrate. *Ann. Clin. Biochem.*, **2001**, *38*, 365-70.
- [62] Randox. <http://www.randox.com/brochures/PDF%20Brochure/LT092.pdf> (Accessed December 16, **2011**).
- [63] Van Handel, E.; Zilversmit, D. Micromethod for the direct determination of serum triglycerides. *J. Lab. Clin. Med.*, **1957**, *50*, 152-157.
- [64] Saiki, T.; Takagi, Y.; Suzuki, T.; Narasaki, T.; Tamura, G.; Arima, K. Studies on the lipoprotein lipases of microorganisms. Part IV Purification and general properties of the lipoprotein lipase produced by *Mucor javanicus*. *Agr. Bio. Chem. (Tokyo)*, **1969**, *33*(3), 414-423.
- [65] Yamaguchi, T.; Muroya, N.; Isobe, M.; Sugiura, M. Production and properties of lipase from a newly isolated chromobacterium. *Agr. Biol. Chem. (Tokyo)*, **1973**, *37*(5), 999-1005.
- [66] Sigma test assay kit. <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/enzymatic-assay-of-lipase-type-xiii.html> (Accessed December 16, **2011**).
- [67] BioVision lipase assay. <http://www.biovision.com/manuals/K722-100.pdf> (Accessed December 16, **2011**).
- [68] Walde, P.; Luisi, P. L. A continuous assay for lipases in reverse micelles based on Fourier transform infrared spectroscopy. *Biochemistry*, **1989**, *28*, 3353-3360.
- [69] O'Connor, C.; Cleverly, D.R. Fourier-transform infrared assay of bile salt-stimulated lipase activity in reversed micelles. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **1994**, *61*(3), 209-214.
- [70] Snabe, T.; Petersen, S. Application of infrared spectroscopy (attenuated total reflection) for monitoring enzymatic activity on substrate films. *J. Biotechnol.*, **2002**, *95*, 145-155.
- [71] Wolf, C.; Sagaert, L.; Bereziat, G. A sensitive assay of phospholipase using the fluorescent probe 2-parinaroyllecithin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1981**, *99*, 275-283.
- [72] McGuire, S.O.; James-Kracker, M.R.; Sun, G.Y.; Fritsche, K.L. An esterification protocol for cis-parinaric acid-determined lipid peroxidation in immune cells. *Lipids*, **1997**, *32*(2), 219-226.
- [73] Hingh, Y.; Meyer, J.; Fischer, J.; Berger, R.; Smeitink, J.; Op den Kamp, J.A.F. Direct measurement of lipid peroxidation in submitochondrial particles. *Biochemistry*, **1995**, *34*(39), 12755-12760.
- [74] Beisson, F.; Ferte, N.; Nari, J.; Noat, G.; Arondel, V.; Verger, R. Use of naturally fluorescent triacylglycerols from *Parinari glaberrimum* to detect low lipase activities from *Arabidopsis thaliana* seedlings. *J. Lipid Res.*, **1999**, *40*(12), 2313-2321.
- [75] Dooijewaard-Kloosterziel, A.M.P.; Wuuters, J.T.M. Some properties of the lipase of *Geotrichum candidum* evaluated by a fluorimetric assay technique. *J. Appl. Bacteriol.*, **1976**, *40*(3), 293-297.
- [76] Roy, R.N. Fluorimetric assay of the activity of extracellular lipases of *Pseudomonas fluorescens* and *Serratia marcescens*. *J. Appl. Bacteriol.*, **1980**, *49*(2), 265-271.
- [77] Mathey, M.; Morgan, D. Secretion of extracellular lipases by *Candida lipolytica*. *Biochem. Soc. Trans.*, **1978**, *6*, 426-428.
- [78] Severson, D.L.; Fletcher, T.; Groves, G.; Hurlley, B.; Sloan, S. Hydrolysis of triolein, cholesterol oleate, and 4-methylumbelliferyl stearate by acid and neutral ester hydrolases (lipases) from pigeon adipose tissue: effect of cAMP-dependent protein kinase. *Can. J. Biochem.*, **1981**, *59*(6), 418-429.
- [79] Monpezat, T.L.; Jeso, B.; Butour, J.L.; Chavant, L.; Sancholle, M. A fluorimetric method for measuring lipase activity based on umbelliferyl ester. *Lipids*, **1990**, *25*(10), 661-664.
- [80] Nègre, A.; Salvayre, R.S.; Dagan, A.; Gatt, S. New fluorometric assay of lysosomal acid lipase and its application to the diagnosis of Wolman and cholesteryl ester storage diseases. *Clin. Chim. Acta*, **1985**, *149*, 81-88.
- [81] Nègre, A.; Salvayre, R.S.; Dagan, A.; Gatt, S. Pyrenemethyl laurate, a new fluorescent substrate for continuous kinetic determination of lipase activity. *Biochim. Biophys. Acta-Lipids and Lipid Metabolism*, **1989**, *1006*(1), 84-88.
- [82] Duque, M.; Graupner, M.; Stütz, H.; Wicher, I.; Zechner, R.; Paltauf, F.; Hermetter, A. New fluorogenic triacylglycerol analogs as substrates for the determination and chiral discrimination of lipase activities. *J. Lipid Res.*, **1996**, *37*, 868-876.
- [83] Hermetter, A. Triglyceride lipase assays based on a novel fluorogenic alkyl-diacyl glycerol substrate. In: *Methods in Molecular Biology*; Doolittle, M.; Reue, K; Eds.; Humana Press, Totowa, New Jersey, **1999**; pp. 19-29.
- [84] Gilham, D.; Lehner, R. Techniques to measure lipase and esterase activity *in vitro*. *Methods*, **2005**, *36*, 139-147.
- [85] Del Prado, M.; Hernández-Montes, H.; Villalpando, S. Characterization of a fluorometric method for lipoprotein lipase. *Arch Med Res.*, **1994**, *25*(3), 331-335.
- [86] Jacks, T.J.; Kircher, W. Fluorometric assay for the hydrolytic activity of lipase using fatty acyl esters of 4-methylumbelliferone. *Anal. Biochem.*, **1964**, *21*(2), 279-285.

- [87] MarkerGene™ Fluorescent Lipase Assay Kit. <http://www.markergene.com/ProductDetails.php/M0612> (Accessed December 16, 2011).
- [88] MarkerGene™ Long Wavelength Fluorescent Lipase Assay Kit. <http://www.markergene.com/ProductDetails.php/M1214> (Accessed December 16, 2011).
- [89] Jarvis, G.M.; Thiele, J.H. Qualitative rhodamine B assay which uses tallow as a substrate for lipolytic obligately anaerobic bacteria. *J. Microbiol. Methods*, **1997**, *29*(1), 41-47.
- [90] Jette, J.-F.; Ziomek, E. Determination of lipase activity by a rhodamine-triglyceride-agarose assay. *Anal. Biochem.*, **1994**, *219*, 256-260.
- [91] Kouker, G.; Jaeger, K.-E. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. *Appl. Environ. Microbiol.*, **1987**, *53*(1), 211-213.
- [92] Bumba, J.; Janicek, A. Turbidimetric determination of serum lipase. *Vnitř Lek.*, **1974**, *20*(11), 1116-20.
- [93] Neumann, U.; Knitach, K.W.; Ziegenhorn, J.; Roder, A.; Zwez, W.; Krämer, W. Reagens zur lipasebestimmung und verfahren zu seiner herstellung. German Patent 2 904 305, February 5, 1979.
- [94] Neumann, U.; Kaspar, P.; Ziegenhorn, J. Lipases, turbidimetric method. In: *Methods of Enzymatic Analysis*, vol. 4; Bergmeyer, H.U.; Ed.; Weinheim, Verlag Chemie, **1984**; pp. 26-34.
- [95] Prencipe, L. Turbidimetric kinetic method for rapid determination of pancreatic lipase activity in the serum. *Quad Scavo Diagn.*, **1974**, *10*(3), 437-46.
- [96] Puukka, Puukka, R. Automation of the turbidimetric determination of serum lipase. *Ann. Clin. Biochem.*, **1978**, *15*(6), 326-330.
- [97] Shihabi, Z.K.; Bishop, C. Simplified turbidimetric assay for lipase activity. *Clin. Chem.*, **1971**, *17*(12), 1150-1153.
- [98] Tietz, N.; Shuey, D.; Astles, J. Turbidimetric measurement of lipase activity-problems and some solutions. *Clin. Chem.*, **1987**, *33*(9), 1624-1629.
- [99] Vogel, W.C.; Zieve, L. A rapid and sensitive turbidimetric method for serum lipase based upon differences between the lipases of normal and pancreatitis serum. *Clin. Chem.*, **1963**, *9*, 168-181.
- [100] Arzoglou, P.L.; Ferard, G.; Khalfa, F.; Metais, P. Conditions for assay of pancreatic lipase from human plasma using a nephelometric technique. *Clin. Chim. Acta*, **1982**, *119*(3), 329-335.
- [101] Zinterhofer, L.; Wardlaw, S.; Jatlow, P.; Seligson, D. Nephelometric determination of pancreatic enzymes II. Lipase. *Clin. Chim. Acta*, **1973**, *44*(2), 173-178.
- [102] Kannisto, H.; Lalla, M.; Lukkari, E. Characterization and elimination of a factor in serum that interferes with turbidimetry and nephelometry of lipase. *Clin. Chem.*, **1983**, *29*, 96-99.
- [103] Bourguet, N.; Torrétou, J.-P.; Galy, O.; Arondel, V.; Goutx, M. Application of a specific and sensitive radiometric assay for microbial lipase activities in marine water samples from the lagoon of Nouméa. *Appl. Environ. Microbiol.*, **2003**, *69*(12), 7395-7400.
- [104] Briquet-Laugier, V.; Ben-Zeev, O.; Doolittle, M.H. Determining lipoprotein lipase and hepatic lipase activity using radiolabelled substrates. In: *Methods in Molecular Biology*; Doolittle, M.; Reue, K.; Eds.; Humana Press, Totowa, New Jersey, **1999**; pp. 81-94.
- [105] Kropp, J.; Knapp, R. (Jr.); Weyenberg, A.; McPherson, D.; Ambrose, K.; Callahan, A.; Bergmann, K.; Biersack, H.-J. Evaluation of pancreatic lipase activity by simple urine analysis after oral administration of a new iodine-131-labeled triglyceride. *Eur. J. Nuc. Med.*, **1994**, *21*, 1227-1230.
- [106] Wayne, T. Jr.; Morelli, J. Assays for lipoprotein lipase: Comparison of radiolabeled vs. titration method and of triolein vs. intralipid substrate. *Biochemical Medicine*, **1977**, *17*(3), 248-257.
- [107] Huang, J.; Roheim, P.S.; Sloop, C.H.; Wong, L. A sensitive, inexpensive method for determining minute quantities of lipase activity. *Anal. Biochem.*, **1989**, *179*, 413-417.
- [108] Aoubala, M.; Douchet, I.; Bezzine, S.; Hirn, M.; Verger, R.; De Caro, A. Immunological techniques for the characterization of digestive lipases. In: *Methods Enzymol.* Dennis, E.; Rubin, B.; Eds.; Academic Press, INC, San Diego, **1997**; pp. 126-149.
- [109] De Caro, A.; Bezzine, S.; Lopez, V.; Aoubala, M.; Daniel, C.; Verger, R.; Carrière, F. Immunological characterization of digestive lipases. In: *Methods Mol. Biol.*; Doolittle, M.; Reue, K.; Eds.; Humana Press, Totowa, New Jersey, **1999**; pp. 239-256.
- [110] Doolittle, M.; Ben-Zeev, O. Immunodetection of lipoprotein lipase: antibody production, immunoprecipitation, and western blotting techniques. In: *Methods Mol. Biol.*; Doolittle, M.; Reue, K.; Eds.; Humana Press, Totowa, New Jersey, **1999**; pp. 215-237.
- [111] Grenner, G.; Deutch, G.; Schmidtberger, R.; Dati, F. A highly sensitive immunoassay for the determination of pancreatic lipase. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, **1982**, *20*, 515-519.
- [112] Hayakawa, T.; Kondo, T.; Shibata, T.; Kitagawa, M.; Ono, H.; Sakai, Y.; Kiriya, S. Enzyme immunoassay for serum pancreatic lipase in the diagnosis of pancreatic diseases. *Gastroenterol. Jpn.*, **1989**, *24*, 556-560.
- [113] Ingen, H.E.; Sanders, G.T.B. Clinical evaluation of a pancreatic lipase mass concentration assay. *Clin. Chem.*, **1992**, *38*, 2310-2313.
- [114] Kawamura, M.; Gotoda, T.; Mori, N.; Shimano, H.; Kozaki, K.; Harada, K.; Shimada, M.; Inaba, T.; Watanabe, Y.; Yazaki, Y. Establishment of enzyme-linked immunosorbent assays for lipoprotein lipase with newly developed antibodies. *J. Lipid Res.*, **1994**, *35*, 1688-1697.
- [115] Moller-Petersen, J.; Klaerke, M.; Dati, F.; Toth, T. Immunochemical qualitative latex agglutination test for pancreatic lipase in serum evaluated for use in diagnosis of acute pancreatitis. *Clin. Chem.*, **1985**, *31*, 1207-1210.
- [116] Singhbist, A.; Maheux, P.; Azhar, S.; Chen, Y.D.I.; Komaromy, M.C.; Kraemer, F.B. Generation of antibodies against a human lipoprotein lipase fusion protein. *Life Sci.*, **1995**, *57*, 1709-1715.
- [117] Sternby, B.; Nilsson, A.; Melin, T.; Borgström, B. Pancreatic lipolytic enzymes in human duodenal contents: radioimmunoassay compared with enzyme activity. *Scand. J. Gastroenterol.*, **1991**, *26*, 859-866.
- [118] Sternby, B.; Akerstrom, B. Immunoreactive pancreatic colipase, lipase and phospholipase A2 in human plasma and urine from healthy individuals. *Biochim. Biophys. Acta*, **1984**, *789*, 164-169.
- [119] Uhl, W.; Malfertheiner, P.; Drosdat, H.; Martini, M.; Buechler, M. Determination of pancreatic lipase by immunoactivation technology: a rapid test system with high sensitivity and specificity. *Int. J. Pancreatol.*, **1992**, *12*, 253-261.
- [120] Vannier, C.; Deslex, S.; Pradines-Figueres, A.; Ailhaud, G. Biosynthesis of lipoprotein lipase in cultured mouse adipocytes. I. Characterization of a specific antibody and relationships between the intracellular and secreted pools of the enzyme. *J. Biol. Chem.*, **1989**, *264*, 13199-13205.
- [121] Vilella, E.; Joven, J. *In vitro* measurement of lipoprotein and hepatic lipases. *Methods Mol. Biol.*, **1998**, *110*, 243-251.
- [122] Zsigmond, E.; Lo, J.; Smith, L.; Chan, L. Immunochemical quantitation of lipoprotein lipase. *Methods Enzymol.*, **1996**, *263*, 327-333.
- [123] ABO-Biotechnology. <http://www.medicin-kit.com/medicin-kit/human%20ELISA%20reagent%20case/Human-Lipase-ELISA-Kit/> (Accessed December 16, 2011).
- [124] ALPCO Immunoassays. <http://www.alpco.com/pdfs/47/47-LPLHU-E01.pdf> (Accessed December 16, 2011).
- [125] Antibodies. <http://www.antibodies-online.com/kit/627172/Hormone+Sensitive+Lipase+ELISA/> (Accessed December 16, 2011).
- [126] Alpha Diagnostic Int. <http://www.4adi.com/objects/catalog/product/extras/1310.pdf> (Accessed December 16, 2011).
- [127] Bio-Equip. <http://www.bio-equip.cn/en/showequip.asp?equipid=4140&division=2535> (Accessed December 16, 2011).
- [128] DRG International Inc. <http://www.drg-international.com/ifu/eia-4459.pdf> (Accessed December 16, 2011).
- [129] MyBioSource. [http://www.mybiosource.com/datasheet.php?products\\_id=720741](http://www.mybiosource.com/datasheet.php?products_id=720741) (Accessed December 16, 2011).
- [130] Iizumi, T.; Nakamura, K.; Fukase, T. Purification and characterization of a thermostable lipase from newly isolated *Pseudomonas sp.* KWI-56. *Agric. Biol. Chem.*, **1990**, *54*, 1253-1258.
- [131] Ballot, C.; Favre-Bonvin, G.; Wallach, J.M. Lipase assay in duodenal juice using a conductimetric method. *Clin. Chim. Acta*, **1984**, *143*(2), 109-114.
- [132] Ballot, C.; Saizonou-Manika, B.; Mealet, C.; Favre-Bonvin, G.; Wallach, J.M. Conductimetric measurements of enzyme activities. *Anal. Chim. Acta*, **1984**, *163*, 305-308.
- [133] Ballot, C.; Favre-Bonvin, G.; Wallach, J.M. Conductimetric assay of a bacterial lipase using triacetin as a substrate. *Anal. Letters*, **1982**, *15*(B13), 1119-1129.
- [134] Fuchs, B.; Süß, R.; Teuber, K.; Eibisch, M.; Schiller, J. Lipid analysis by thin-layer chromatography-A review of the current state. *Journal of Chromatography A*, **2011**, *1218*, 2754-2774.

- [135] Ruiz-Larrea, M.F.; Galdiz-Valdovinos, B.; Rodríguez-Fernández, C. Kinetic study of hepatic triglyceride lipase from rat liver soluble fraction. *Enzyme*, **1982**, *27*, 215-219.
- [136] Kulkarni, N.; Gadre, R.V. Simple gas chromatography method for lipase assay. *Biotechnol. Techniques*, **1998**, *12*(8), 627-628.
- [137] Ergon, F.; André, G. Simple high performance liquid chromatography methods for monitoring lipase reactions. *Lipids*, **1989**, *24*(1), 76-78.
- [138] Mingarro, I.; González-Navarro, H.; Braco, L. Direct HPLC monitoring of lipase activity in reverse micellar media. *J. Liquid Chromatogr.*, **1995**, *18*(2), 235-244.
- [139] Hao, G., Yang, L., Mazsaroff, I., Lin, M. Quantitative determination of lipase activity by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrometry*, **2007**, *18*, 1579-1581.
- [140] IUPAC. *Compendium of Chemical Terminology*, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by McNaught, A. D.; Wilkinson, A.; Blackwell Scientific Publications, Oxford, **1997**.
- [141] Minakshi; Pundir, C.S. Construction of an amperometric enzymic sensor for triglyceride determination. *Sensors and Actuators B*, **2008**, *133*, 251-255.
- [142] Narang, J.; Minakshi; Bhambi, M.; Pundir, C.S. Fabrication of an amperometric triglyceride biosensor based on PVC Membrane. *Anal. Letters*, **2009**, *43*(1), 1-11.
- [143] Pundir, C. S.; Singh, B.S.; Narang, J. Construction of an amperometric triglyceride biosensor using PVA membrane bound enzymes. *Clin. Biochem.*, **2010**, *43*(4-5), 467-472.
- [144] Narang, J.; Minakshi; Bhambi, M.; Pundir, C.S. Determination of serum triglyceride by enzyme electrode using covalently immobilized enzyme on egg shell membrane. *Int. J. Biol. Macromolecules*, **2010**, *47*(5), 691-695.
- [145] Narang, J.; Pundir, C.S. Construction of a triglyceride amperometric biosensor based on chitosan-ZnO nanocomposite film. *Int. J. Biol. Macromolecules*, **2011**, *49*, 707-715.
- [146] Dhand, C.; Solanki, P.; Sood, K.N.; Datta, M.; Malhotra, B.D. Polyaniline nanotubes for impedimetric triglyceride detection. *Electrochem. Communications*, **2009**, *11*, 1482-1486.
- [147] Fernandez, R.E.; Hareesh, V.; Bhattacharya, E.; Chadha, A. Comparison of a potentiometric and a micromechanical triglyceride biosensor. *Biosens. Bioelectron.*, **2009**, *24*, 1276-1280.
- [148] Vijayalakshmi, A.; Tarunashree, Y.; Baruwati, B.; Manoramab, S.V.; Narayana, B.L.; Johnson, R.E.C.; Rao, N.M. Enzyme field effect transistor (ENFET) for estimation of triglycerides using magnetic nanoparticles. *Biosens. Bioelectron.*, **2008**, *23*, 1708-1714.
- [149] Mirsky, V.M.; Krause, C.; Heckmann, K.D. Capacitive sensor for lipolytic enzymes. *Thin Solid Films*, **1996**, *284-285*, 939-941.
- [150] Rejeb, I.; Arduini, F.; Amine, A.; Gargouri, M.; Palleschi, G. Amperometric biosensor based on Prussian Blue-modified screen-printed electrode for lipase activity and triacylglycerol determination. *Anal. Chim. Acta*, **2007**, *594*(1), 1-8.
- [151] QSENSE. <http://www.q-sense.com/proteins> (accessed December 16, **2011**).
- [152] Arima, K., Ichibangase, T., Ohba, Y., Kishikawa, N., Kuroda, N. Simple and rapid chemiluminescence assay for lipase activity in pharmaceutical preparations using proenhancer substrate. *Bunseki Kagaku*, **2006**, *55*, 307-311.
- [153] Morak, M., Schmidinger, H., Krempl, P., Rechberger, G., Kollroser, M., Birner-Gruenberger, R., Hermetter, A. Differential activity-based gel electrophoresis for comparative analysis of lipolytic and esterolytic activities. *J. Lipid Research*, **2009**, *50*, 1281-1292.
- [154] Karmetová, J.; Matějů, J.; Řezanka, T.; Procházka, P.; Nohýnek, M.; Rokos, J. Estimation of lipase activity by the diffusion plate method. *Folia Microbiologica*, **1984**, *29*(4), 346-347.
- [155] Samad, M.Y.A.; Razak, C.N.A.; Salleh, A.B.; Yunus, W.M.Z.W.; Ampon, K.; Basri, M. A plate assay for primary screening of lipase activity. *J. Microbiol. Methods*, **1989**, *9*(1), 51-56.
- [156] Ladefoged, C.; Cagna, A.; Gormsen, E. Lipase activity as a function of interfacial tension using the rising drop method on a new oil drop tensiometer. *Ann. New York Acad. Sci.*, **2006**, *750*(1), 202-208.
- [157] Nury, S.; Piéroni, G.; Rivière, C.; Gargouri, Y.; Bois, A.; Verger, R. Lipase kinetics at the triacylglycerol-water interface using surface tension measurements. *Chem. Phys. Lipids.*, **1987**, *45*(1), 27-37.
- [158] Menon, G.; Ghadially, R.; Williams, M.; Elias, P. Lamellar bodies as delivery systems of hydrolytic enzymes: implications for normal and abnormal desquamation. *Br. J. Dermatol.*, **1992**, *126*, 337-45.
- [159] Murata, F.; Yokota, S.; Nagata, T. Electron microscopic demonstration of lipase in the pancreatic acinar cells of mice. *Histochemistry and Cell Biology*, **1968**, *13*(3), 215-222.
- [160] Balashev, K.; Jensen, T.R.; Kjaer, K.; Bjørnholm, T. Novel methods for studying lipids and lipases and their mutual interaction at interfaces. Part I. Atomic force microscopy. *Biochemistry*, **2001**, *8*(5), 387-97.
- [161] Nielsen, L.; Risbo, C.T.; Bjørnholm, T. Lag-burst kinetics in phospholipase A2 hydrolysis of DPPC bilayers visualized by atomic force microscopy. *Biochim. Biophys. Acta*, **1999**, *1420*, 266-271.
- [162] O'Connor, C.; Petricevic, S.; Coddington, J.; Stanley, R. An NMR assay for quantitating lipase activity in biphasic macroemulsions. *J. Amer. Oil Chemists' Soc.*, **1992**, *69*(4), 295-300.



# Nanostructured Sensor for Rapid Lipases Activity Determination

J.A. León<sup>1</sup>, M. Stoytcheva<sup>1</sup>, R. Zlatev<sup>1</sup>, G. Montero<sup>1</sup>, B. Valdez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California

Bldv. Benito Juárez y Calle de la Normal S/N, Col. Insurgentes Este, 21280 Mexicali, México

Jose.leon30@uabc.edu.mx; margarita@iing.mx1.uabc.mx; gmontero@uabc.edu.mx

BIOSENSORS2012

15-18 May 2012 • Cancun, Mexico

## Introduction

The main use of lipases (triacylglycerol acylhydrolases, EC 3.1.1.3) is the hydrolysis of triglycerides to fatty acids and glycerol [1]. This has caused them to become valuable catalysts in various industrial applications such as additives in the formulation of detergents, in the food industry for the elaboration of dietary products with low fat and cholesterol, in the paper industry in order to remove the wax from the paper pulp, in the pharmaceutical industry in the production of bioactive molecules as well as in chemical synthesis processes for obtaining optically pure compounds, modification of fats and other lipids by hydrolysis and esterification [2].

The identification of new sources of lipases with unique patterns of selectivity for each reaction remains a strategic objective of the studies of lipase [3]. Thus, with the discovery of new enzymes or changes in the properties of enzymes, there is an overriding interest in the development of screening tools that can be used to find the best performance based on a specific property [4], as is the enzyme activity.

Several tests to determine the activity of the lipase have been published, among them, the spectrophotometric methods one of the most commonly used. Para-nitrophenyl palmitate (p-NPP) is often used as substrate for the enzyme catalyzed hydrolysis. The analytical signal measured is the absorbance of para-nitrophenol (p-NP) released by the reaction [5-7]. Depending on the applications, emulsions of soybean oil and olive oil as substrates have been used for visible spectrophotometric assays; the released fatty acids are dissolved in isooctane, and are quantified using a spectrophotometer at 715 nm [8-9]. The principal disadvantage of these methods is that they are time consuming, and need special laboratory instrumentation. In this work is presented a nanostructured sensor for rapid sensor lipase activity determination, based on the lipases catalyzed degradation of olive oil.

## Experimental

The experimental protocol involves:

1. Sensor fabrication by coating a transparent plastic strip with a layer of olive oil covered with carbon nanoparticles used for signal amplification.
2. Immersion of the strip into a photometric cell containing a phosphate buffer solution pH 7.
3. Background absorbance measurement at 720 nm.
4. Lipase solution addition to the spectrophotometric cell.
5. Measurement of the absorbance change due to lipase catalyzed oil degradation, accompanied by nanoparticles release.
6. Lipase activity determination evaluating the slope of the curve absorbance vs. time.

The sensor was fabricated spreading uniformly a drop of olive oil onto a plastic strip and dispersing carbon nanoparticles. In order to confirm the adhesion of the particles onto the olive oil layer, the strip was put into the cell with distilled water, and the absorbance was measured. If the particles are correctly added, the absorbance must not vary.

## Result and discussion

At first the influence of the dispersion of the nanoparticles onto the test strip has been studied. Initially, a mixture of olive oil and carbon nanoparticles was prepared with 15 minutes sonication. Subsequently a portion of the mixture was spread onto the test strip. The results of these experiments are shown in Figure.01.

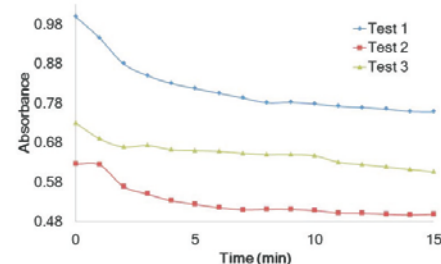


Figure 01. Absorbance versus time. Mixture of olive oil and carbon nanoparticles stirred by sonic agitation.

Absorbance varied as a function of the amount of the deposited nanoparticles in each strip. The enzyme activity was evaluated calculating the slope of the line in the first minutes of the reaction. The results were 0.059, 0.055, 0.04 (U/min) for tests 1, 2 and 3 respectively. In the search for reproducible dispersion, olive oil was spread onto the strip, and then carbon nanoparticles were added through a mesh, with the purpose of obtaining a uniform distribution.

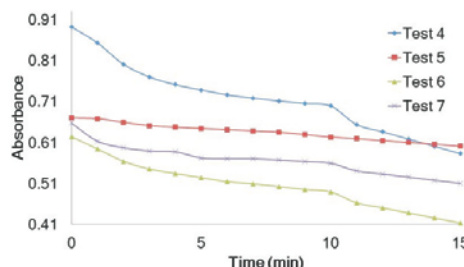


Figure 02. Absorbance versus time. Particles added using a mesh.

The use of the mesh produced a very uniform dispersion of the particles; as shown in Fig. 02, the absorbance ranges were closer in the tests 2, 3 and 4. The calculated lipase activities were 0.039, 0.009, 0.03, 0.044 (U/min) for test 4, 5, 6 and 7 respectively. At this point, the experiments were performed at room temperature. The influence of the temperature was also studied and tests were performed at 25, 30 and 35°C.

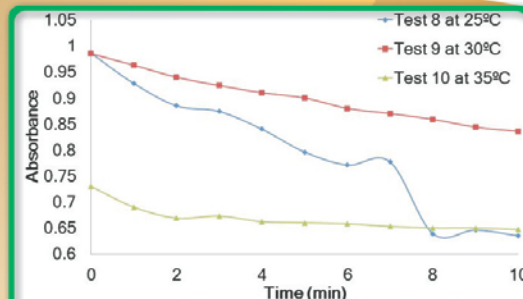


Figure 03. Absorbance versus time at different temperatures.

The higher reaction rate was observed at 25°C. Reaction rates at 30°C and 35°C were lower and did not differ considerably, as shown in Figure 03. Determined activities were 0.05, 0.02, 0.04 (U/min) for test 8, 9 and 10 respectively; consistent with data presented in Figure.03: the enzyme activity at a temperature of 25°C is higher than in the tests at other temperatures.

## Conclusion

Although further work is needed in the homogeneous dispersion of the nanoparticles and the distribution of olive oil in the test strips, the work introduced here proves that the suggested sensor can be used to determine the enzymatic activity of lipases in a fast and simple way, the measurement of the activity remaining of paramount importance in different applications in bioengineering.

## Acknowledgements

We are very grateful to the Autonomous University of Baja California (UABC) for allowing us work on their facilities and the National Council for Science and Technology (CONACYT) for the financial support.

## References

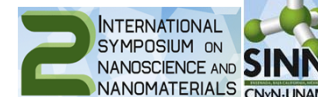
1. A. Sali, E. Sanjust, V. Solinas, M. Monduzzi. "Commercial lipase immobilization on Accurel MP1004 porous polypropylene", *Biocatalysis and Biotransformation*, vol.23, pp 381-386, Oct.2005.
2. J. Coca, O. Hernández, R. Berrio, S. Martínez, E. Díaz, J.C. Dustet, "Producción y caracterización de las lipasas de *Aspergillus niger* y *A. fumigatus*", *Biología Aplicada*, vol.18, pp 216-220, 2001.
3. P. Pinskirodrom, K. L. Parkin. "Lipolytic Enzymes" *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 2001 C3.1.1-C3.1.13.
4. R. Gupta, P. Rath, N. Gupta, S. Bradoo, 2003. Lipase assays for conventional and molecular screening: an overview. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 37, 63-71.
5. A.M. Farnet, L. Qasemian, L. Goujard, G. Gil, D. Guiral, F. Ruaudal, E. Ferre, "A modified method based on p-nitrophenol assay to quantify hydrolysis activities of lipases in litters", *Soil Biology & Biochemistry*, vol.42, pp 386-389, 2010.
6. Y. Teng, Y. Xu, "A modified para-nitrophenyl palmitate assay for lipase synthetic activity determination in organic solvent", *Analytical Biochemistry*, vol.363, pp 297-299, Ene.2007.
7. L. Goujard, P. Villeneuve, B. Barea, J. Lecomte, M. Pina, S. Claude, J. Le Petit, E. Ferré, "A spectrophotometric transesterification-based assay for lipases in organic solvent", *Analytical Biochemistry*, vol.385, pp 161-167, 2009.
8. J. H. Lee, S. B. Kim, C. Park, S. W. Kim, "Effect of a buffer mixture system on the activity of lipases during immobilization process", *Bioresource Technology*, vol.101, pp 66-70, 2010.
9. D. Y. Kwon, J. S. Rhee, "A Simple and Rapid Colorimetric Method for Determination of Free Fatty Acids for Lipase Assay", *JAACS*, vol.63, no.1, pp 89-92, Ene.1986



# NANOPARTICLES MODIFIED QCM BASED SENSOR FOR HYDROLASES ACTIVITY DETERMINATION

M. Stoytcheva<sup>a</sup>, R. Zlatev<sup>b</sup>, G. Montero<sup>c</sup>, J.-A. Leon<sup>d</sup>, M. Arredondo<sup>e</sup>

<sup>1</sup>Universidad Autónoma de Baja California, Instituto de Ingeniería, Mexicali, México  
<sup>a</sup>margarita.stoytcheva@uabc.edu.mx, <sup>b</sup>roumen@uabc.edu.mx, <sup>c</sup>gmontero@uabc.edu.mx,  
<sup>d</sup>angel\_x-y@hotmail.com, <sup>e</sup>michelle.arredondo@gmail.com



## Introduction

Enzyme that catalyze the cleavage of C-O, C-N, C-C and other bonds by reactions involving the addition or removal of water[1].

The natural role of most hydrolases is digestive to break down nutrients into smaller units[2]. Two of the most important hydrolases are lipases and trypsin due their important role into the digestive system.

The main use of lipases (triacylglycerol acylhydrolases, EC 3.1.1.3) is the hydrolysis of triglycerides to fatty acids and glycerol [3]. This has caused them to become valuable catalysts in various industrial applications such in the formulation of detergents, in the food industry, paper industry pharmaceutical industry, modifying fats and other lipids by hydrolysis and esterification [4].

Trypsin (EC 3.4.21.4) is an enzyme of the class of the serine proteases, found in the human digestive system. It is produced by the pancreas as trypsinogen (inactive enzyme) and is then activated in the duodenum by the intestinal enterokinase to trypsin (active enzyme) by proteolytic cleavage. It seems to be the most sensitive test for diagnosis of acute pancreatitis[5].

Nanoparticles as an efficient signal amplifier were deposited onto the surface of a quartz crystal microbalance (QCM) together with the enzyme substrate to create a simple biosensing platform for the sensitive hydrolases activity determination. The suggested approach was successfully applied for the determination of the activity of the enzymes lipase and trypsin, respectively.

## Experimental

Enzyme activity U and QCM frequency change with time, recorded applying the approach subject of the present work, were correlated using the following equation:

$$U = - \left( \frac{1}{KM} \frac{\Delta f}{\Delta t} + \frac{A \Delta n_{NP}}{M \Delta t} \right)$$

The experimental procedure for each kind of enzyme studied is presented below:

1. On the electrode surface of the quartz crystal microbalance is placed 10 $\mu$ L of substrate and let it dried.
2. Once the substrate is bonded, is placed into the measuring cell of the microbalance and add 180 $\mu$ L of buffer solution (PBS 0.1 M, pH 8).
3. The equipment is stabilized by 3 minutes and add 20 $\mu$ L of enzyme solution.

The substrates employed were gelatin/Ag nanoparticles and olive oil/SiO<sub>2</sub> nanoparticles for trypsin and lipase assays respectively

Principle of the method

1. Substrate thin-film specific degradation by enzymes.
2. Film degradation monitoring using QCM.
3. Signal amplification due to the incorporation of nanoparticles into the substrate film.

## Result and discussion

The loss of mass on the surface of the microbalance affects its frequency of vibration, this being a direct measure of the mass and loss of enzyme activity.

The results and discussion for each kind of enzyme studied is presented below:

Trypsin

Frequency augmentation dependence on protease activity was investigated under various experimental conditions, QCM sensor response to proteolytic digestion for different trypsin concentrations.

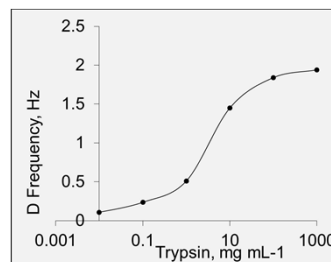


Figure 01. Calibration curve for trypsin determination. PBS 0.1 M pH 8, 500 rpm, 26°C

Lipase

With the purpose of amplifying the frequency augmentation of the tests it was decided to use nanoparticles of silicon dioxide (SiO<sub>2</sub>, 99.8%, 10-20 nm, surface modified, super-hydrophobic and oleophilic) integrated into the substrate. Enzyme activity was determined for different concentrations, achieving the following calibration curve.

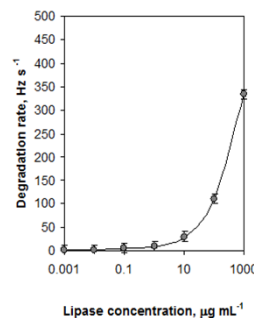


Figure 02. Calibration curve for quantifying the lipase activity (0.1 M PBS, pH 8; 25°C; olive oil / SiO<sub>2</sub> nanoparticles)

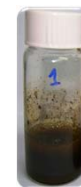


Figure 03. Ag Nanoparticles



Figure 04. QCM



Figure 05. QCM cell

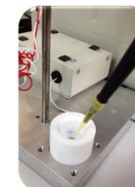


Figure 06. Enzyme solution addition



Figure 06. Signal registration equipment

## Conclusion

In this work a sample nanoparticles modified QCM based sensor is reported allowing the rapid hydrolase activity determination. The effective application is demonstrated for both kind of enzyme, admitting the future use of the method in routine assays .

## Acknowledgements

We are very grateful to the Autonomous University of Baja California (UABC) for allowing us work on their facilities and the National Council for Science and Technology (CONACYT) for the financial support

## References

1. PAC, 1992, 64, 143. Glossary of chemists of terms used in biotechnology (IUPAC Recommendations 1992).
2. Bornscheuer, Uwe Theo, Kazlauskas, Romas Joseph, "Hydrolases in Organic Synthesis", pp1, Nov 2005
3. A. Salis, E. Sanjust, V. Solinas, M. Monduzzi. "Commercial lipase immobilization on Accurel MP1004 porous polypropylene", Biocatalysis and Biotransformation, vol.23, pp 381-386, Oct.2005.
4. J. Coca, O. Hernández, R. Berrio, S. Martínez, E. Díaz, J.C. Dustet, "Producción y caracterización de las lipasas de Aspergillus niger y A. fumigatus", Biología Aplicada, vol.18, pp 216-220, 2001.
5. Heinrich, h.; Gabbe, E.; F. J. Mol. Medicine 1979, 57, 1237-1238.