

LİPAZ AKTİVİTESİNİN SPEKTROFOTOMETRİK YÖNTEMLE BELİRLENMESİNDE ÇEVRESEL KOŞULLARIN P-NİTROFENİL PROPIYONAT SUBSTRATININ KARARLIĞINA ETKİSİ

Eylem Özarslaner¹, Nedim Albayrak^{*2}

¹Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Van

²Hitit Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Çorum

Geliş tarihi / Received: 20.12.2012

Düzeltilerek Geliş tarihi / Received in revised form: 02.03.2013

Kabul tarihi / Accepted: 30.03.2013

Özet

Lipaz aktivitesinin spektrofotometrik yöntemle ölçülmesinde *p*-nitrofenol esterleri tercih edilmektedir. Yöntem, bu substratlardan lipaz hidrolizi ile açık sarı renkli *p*-nitrofenol (*p*NP) oluşturulmasına dayanmaktadır. Bu çalışmada, lipaz aktivite ölçümünde kullanılan *p*-nitrofenil propiyonat (*p*NPP) substratının kararlılığına ve *p*NP ürününün ışık soğurmasına çevresel koşulların etkisi incelenmiştir. Bekletme sıcaklığı veya süresi arttıkça, daha fazla oranda *p*NPP'nin kendiliğinden parçalandığı görülmüştür. On günlük bir depolama sonunda, 4° C'ye kıyasla 20° C'de 10 katı oranında *p*NPP (0.512 mM) kendiliğinden parçalanmıştır. Birbirini takip edecek şekilde 30, 60 ve 95° C'lerde sırasıyla 90, 20 ve 5 dakika inkübasyon süreleri, dakikada 0.0014, 0.0154 ve 0.0456 absorbans artışlarına neden olmuştur. Öte yandan, oluşan *p*NP ürününün 400nm civarında göstereceği absorbans değeri pH 6-8 aralığında ortam pH'sına oldukça duyarlı iken; tampon kapasitesi arttıkça (0.1-1.0 M) *p*NP ürünün gösterdiği absorbans (404 veya 348 nm) doğrusal olarak en az 2 kat düzeyine çıkmıştır. Bu duyarlılıklar, substratın kendiliğinden hidrolizine neden olacak koşulların azaltılması, pH ve tampon kapasitesinin standardizasyonu ile minimize edilebilmektedir. Buna ilave olarak, enzim hariç tepkime karışımının tüm bileşenlerini içeren bir "paralel kontrol" eşliğinde denemelerin yürütülmesiyle küçük hata kaynaklarının çoğunlukla sınırlandırılabilmesi tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: *p*-nitrofenil propiyonat, lipaz aktivitesi, spektrofotometrik yöntem, kendiliğinden parçalanma

** Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author ;

✉ nedimalbayrak@hitit.edu.tr,

☎ (+90) 364 227 4533 / 1298,

☎ (+90) 364 227 4535

STABILITY of P-NITROPHENYL PROPIONATE SUBSTRATE for SPECTROPHOTOMETRIC MEASUREMENT of LIPASE ACTIVITY

Abstract

p-Nitrophenol alconate esters are preferred substrates for spectrophotometric measurement of lipase activity. The method relies on lipolytic release of chromogenic *p*-nitrophenol (*p*NP) from the substrates. The study aimed to investigate susceptibility of *p*-nitrophenyl propionate (*p*NPP) substrate against non-enzymatic hydrolysis and absorptivity of *p*NP under various conditions. In general, greater amounts of *p*NPP were self-hydrolyzed upon increases in storage temperature or duration. Compared to refrigeration temperature, the storage at room temperature for 10 days resulted in ten-fold increase in spontaneous hydrolysis from 0.512 mM *p*NPP solution. Upon sequential incubation at 30, 60 and 95° C for the corresponding durations of 90, 20 and 5 minutes, the rates of non enzymatic hydrolysis were 0.0014, 0.0154 and 0.0456 absorbans per min, respectively. *p*NP product absorbans at 404 nm was strongly affected by pH between 6 and 8. Also, increasing buffer capacity from 0.1 to 1.0 M resulted in at least twofold linear increase in absorbans at 404 or 348 nm. These susceptibilities may be corrected by avoidance of conditions leading to non-enzymatic hydrolysis as well as standardizations of pH and buffer capacity in the assay medium. Finally to minimize minor errors, the enzyme assay should be carried out along with a "parallel control" which contains all components of assay mixture except for the enzyme.

Keywords: *p*-nitrophenyl propionate, lipase assay, spectrophotometric method, nonenzymatic hydrolysis

GİRİŞ

Lipazlar biyoteknolojik uygulamalarda en önemli enzimler arasındadır (1). Normal koşullarda yağları parçalayarak yağ asitlerini ayıran hidrolazlar olarak bilinmelerine rağmen su yokluğunda esterifikasyon ve transesterifikasyon tepkimelerini de katalizleyebildiğinden biyodönüşüm işlemlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (2-4). Lipaz aktivitesi, enzimin kullanım amacına uygun bir tepkimeden yararlanarak ölçülebilmektedir. Lipaz enziminin hidrolitik aktivitesinin ölçülmesinde titrimetrik ve spektrofotometrik yöntemler kullanılmaktadır (5). Spektrofotometrik yöntemlerle lipaz aktivitesi ölçümünde renk oluşturabilen substratlar arasında özellikle *p*-nitrofenil alkonat esterleri sıklıkla tercih edilmektedir (6). *p*-Nitrofenil esterlerinin enzimatik hidrolizine dayanan spektrofotometrik yöntemin kolay, oldukça kullanışlı ve hassas olduğu belirtilmektedir (7, 8).

Bu çalışmada *Rhizomucor miehei*'ye ait lipaz aktivitesinin belirlenmesinde substrat olarak kullanılan *p*-nitrofenil propiyonat (*p*NPP) esterinin kararlılığına bekleme süresi, sıcaklık, pH ve tampon kapasitesi gibi çeşitli koşulların etkisi incelenmiştir. Yöntem, substrat olarak kullanılan *p*-nitrofenil yağ asidi esterinin lipaz etkisi ile parçalanmasından oluşan açık sarı renkli *p*NP

ürününün 400 nm civarında bir dalga boyunda oluşturduğu absorbansın spektrofotometrik olarak ölçülmesine dayanmaktadır (9-12). Bu yöntemde kullanılan esterler, esterlerin hazırlandığı çözücüler, ölçümün gerçekleştirildiği dalga boyu, enzim aktivitesinin belirlendiği süre, sıcaklık ve pH değerleri farklılık gösterebilmektedir. Lipaz aktivitesinin *p*NPP substratı ile ölçümü sürecinde, kullanılan esterin enzim dışı etmenlerle kendiliğinden parçalanmaya yatkın olduğu gözlenmiştir. Literatürde çeşitli olumsuzları nedeniyle yöntemin dikkatlice uygulanması önerilmiş (13), *p*NP ürününün gösterdiği absorbans değerinin ortam pH'sından etkilendiği tartışılmış (11) ve lipaz içermeyen bir kontrol tepkimesi kullanıldığı gözlenmiştir (14). Ancak, kullanılan *p*-nitrofenil alkanat esterlerinin sıcaklık ve bekleme süresi gibi çevresel faktörlerin etkisi ile kendiliğinden parçalanmaya duyarlılığı incelenmemiştir. Enzim dışı etmenlerle substratın parçalanabilmesi ve oluşan ürüne ait absorbansın değişebilmesi, yöntemin güvenilirliğini doğrudan etkilemektedir. Lipaz enziminin özelliklerinin belirlendiği birçok çalışmada, substratın önemli oranda kendiliğinden hidrolizini katalizleyebilecek derecede uzun süre veya yüksek sıcaklıklarda denemeler yapıldığı; yine kullanılan blank kontrolün koşulları belirtilmeksizin düşük ve yüksek pH düzeylerinin kullanıldığı (2, 13, 15-17) dikkate

alındığında konunun önemi daha da belirginleşmektedir.

Sonuç olarak, bu çalışmada kolay ve kullanışlı bir yöntem olarak spektrofotometrik yöntemin muhtemel aktivite ölçüm koşullarına duyarlılığı incelenmiş ve yanıtıcı bulgulara yol açmadan bu duyarlılıkların nasıl giderilebileceği tartışılmıştır.

MATERYAL VE YÖNTEM

MATERYAL

Bu çalışmada kullanılan *Rhizomucor miebei* lipazı (RML, Novozym 388) Novozymes (Danimarka), *p*-nitrofenol (*p*NP) ve *p*-nitrofenil propiyonat (*p*NPP) MP Biomedicals, Inc. (Fransa) asetonitril (Merck) firmalarından temin edilmiştir. Spektrofotometrik analizler için Shimadzu UV-1700 marka spektrofotometre kullanılmıştır.

YÖNTEM

Lipaz aktivitesi ölçümü

Lipaz aktivitesi, *p*NPP substratı kullanılarak spektrofotometrik yöntemle belirlenmiştir. *p*NPP substrat çözeltisi %80 oranında potasyum fosfat tamponu (pH 7; 50 mM) ve %20 asetonitril sıvı karışımı (çözücü) kullanılarak 0.512 mM konsantrasyonda hazırlanmıştır (pH: 7.4). Sıvı formdaki enzim solüsyonunun istenen oranlara seyreltilmesinde distile su kullanılmıştır. Reaksiyon mikrosantrifüj tüplerinde gerçekleştirilmiş olup, 1200 µL substrat çözeltisine 200 µL enzim çözeltisi ilave edilmesi ile başlatılmıştır. Tepkime 25 °C'de su banyosunda karıştırma yapılmaksızın gerçekleştirilmiş ve süre sonunda doğrudan 404 nm dalga boyundaki absorbans değerleri elde edilmiştir. Tanık olarak tampon ve asetonitril karışım çözeltisi (çözücü) kullanılmıştır. İnkübasyon sonrası lipaz aktivitesini durdurmak için herhangi bir denatüre edici işlem uygulanmamış ve aksi belirtilmedikçe enzim aktivite ölçümü bu koşullarda gerçekleştirilmiştir.

Çevresel Koşulların Substrata Etkileri

Substratın (*p*NPP) kendi kendine parçalanması üzerine sıcaklık, süre, gün ışığı, pH ve tampon kapasitesi faktörlerinin etkileri incelenmiştir. Aşağıda belirtilen koşullar dışında enzim aktivitesi

ölçüm koşulları veya absorbans belirleme şartları enzim aktivitesi ölçüm yönteminde belirtildiği gibidir. Çözücü ile hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki *p*NP çözeltilerinin absorbanslarından elde edilen standart eğriden yararlanılarak *p*NP ürününün molar absorpsiyon katsayısı ($\epsilon=8736$ L/M.cm) hesaplanmış ve *p*NPP substratının parçalanma oranının belirlenmesinde kullanılmıştır.

Depolama Süresi: Taze hazırlanmış veya oda sıcaklığında 2 hafta depolanmış 1050 µL 0.512 mM *p*NPP çözeltilerine 350 µL lipaz çözeltisi veya aynı miktar fosfat tampon (kontrol) ilave edilmiştir. Sıcaklığı 25° C'de su banyosundaki inkübasyonun 5. ve 30. dakikalarında alınan örneklerin 300-500 nm dalga boyu aralığında spektrofotometrik taramaları elde edilmiştir. Uzun süreli depolamanın *p*NPP'nin kararlılığına etkisini incelemek amacıyla, mikrosantrifüj tüplerindeki substrat çözeltilerinin sırasıyla a) oda sıcaklığında ve ışık görebilen bir konumda; b) oda sıcaklığında; c) 4 °C'de; d) -18 °C'de depolamanın 10. ve 16. günlerinde 404 nm'de absorbans değerleri çözücüye karşı belirlenmiştir.

Depolama Sıcaklığı: Kısa inkübasyon sürelerinin substrat kararlılığına etkisini belirlemek için, birbiri ardı sıra artan sıcaklık derecelerinde, belli süreler inkübe edilen aynı substrat çözeltisinde gözlemlenen parçalanma düzeyi incelenmiştir. Mikrosantrifüj tüplerine 1050 µL konulan substrat çözeltisine (3 gün depolanmış) herhangi bir enzim içermeyen 350 µL çözücü ilave edilmiştir. Su banyosunda 30 °C'de 90 dak inkübasyon ardından, sıcaklık 60 °C'ye çıkarılarak inkübasyona 20 dak devam edilmiş ve son olarak sıcaklık 95 °C'ye yükseltilerek 5 dak inkübasyon uygulanmıştır. Farklı sıcaklıklarda toplamda 115 dak devam eden inkübasyon sürecinde alınan örneklerin absorbans ölçümleri yapılmıştır.

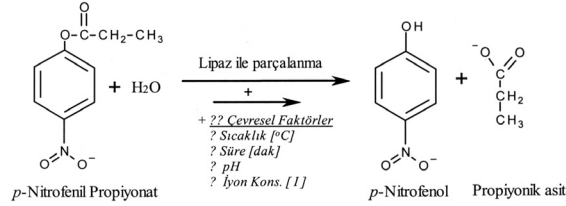
pH: Substrat çözeltisi absorbans düzeyine pH'nın etkisini belirlemek için 0.1 N NaOH veya HCl kullanılarak substrat çözeltileri (0.256 mM) 6-8 aralığında belirlenen pH'lara getirilmiştir. Herhangi bir enzim ilavesi veya inkübasyon yapılmaksızın pH'sı ayarlanan çözeltilerin 404 ve 348 nm dalga boylarında çözücüye karşı absorbans ölçümleri yapılmıştır.

Tampon Kapasitesi: Mikrosantrifüj tüplerine 1200 µL ilave edilen *p*NPP çözeltisine 200 µL lipaz çözeltisi veya fosfat tamponu (kontrol) ilave edilerek 25 °C'deki su banyosunda 5 dak

inkübe edilmiştir. Substrat çözeltisi (0.256 mM *p*NPP) çözücü (%20 Asetonitril ve %80 oranında 0.1-1.0 M aralığında (pH 7) fosfat tamponu) ile hazırlanmıştır.

BULGULAR ve TARTIŞMA

Spektrofotometrik yöntem, substrat olarak kullanılan *p*NPP esterinin lipazın etkisiyle parçalanması sonucu oluşan açık sarı renkli *p*NP ürününün oluşturduğu absorbans belirlenmesine dayanmaktadır. Bu çalışmada yapılan deneylerle lipaz etkisine benzer şekilde, çeşitli çevresel faktörlerin substratın kendiliğinden parçalanmasına etkisi incelenmiştir (Şekil 1).

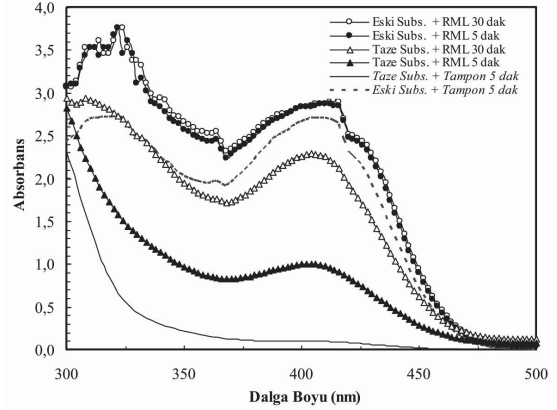


Şekil 1. *p*-Nitrofenil propiyonat substratının hidrolizi ile *p*-nitrofenol (pKa 7.2) ve propiyonik asit oluşumu.
Figure 1. Hydrolysis of *p*-nitrophenyl propionate to *p*-nitrophenol (pKa 7.2) and propionic acid.

Depolama Süresi ve Sıcaklığı

İlk olarak, taze hazırlanan substrat çözeltisine kıyasla oda sıcaklığında iki hafta bekletilmiş (eski) substrat çözeltisinin lipaz aktivitesinin ölçümünde kullanılabilme olanağı incelenmiştir. Şekil 2'de taze ve eski substratların lipaz veya tampon etkisi ile parçalanma düzeyleri kıyaslamalı olarak verilmiştir. Lipaz ilave edilen taze *p*NPP substratının (renksiz) etki süresiyle doğru orantılı bir şekilde hidrolize olduğu ve *p*NP ürünün giderek arttığı görülmektedir. Ancak aynı enzim eski substratta neredeyse aktivite gösterememektedir. Sonuç olarak, substrat oda sıcaklığında bekletildikçe, giderek parçalanmakta, doğal olarak enzim aktivitesine karşı duyarsız hale gelmekte ve normal bir aktivite ölçümü mümkün görünmemektedir.

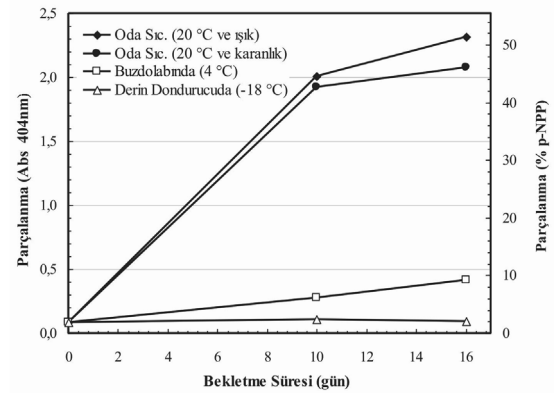
Hazırlanmış bir substrat çözeltisinin uzun süreli bekletilmesi sürecinde substratın kendiliğinden parçalanmasına ortam sıcaklığı ve ışığın etkisi Şekil 3'de gösterilmiştir. Herhangi bir enzim olmaksızın substratın oda sıcaklığında (20 °C) 10 gün bekletilmesi ile absorbans düzeyi 0.1'den 2.0'ye yükselmiştir. Oda sıcaklığına kıyasla sıcaklık



Şekil 2. Taze hazırlanmış ve eski (iki hafta oda sıcaklığında bekletilen) substrat çözeltisinin 30 °C'lik su banyosunda RM lipazı ile parçalanmasının 5. ve 30. dakikalardaki spektrofotometre taramaları.

Figure 2. Spectrophotometric scans of RM lipase reaction mediums with a freshly prepared and an old (incubated for two weeks at room temperature) substrate solutions after 5 and 30 minutes of incubation at 30 °C.

düşükçe parçalanma hızı da düşmektedir. Ancak, 4 °C'de bile aynı süre içerisinde başlangıçtaki seviyenin 3 katı bir absorbans artışı görülmüştür. Substratın dondurularak muhafaza edildiği koşullarda (-18 °C) herhangi bir absorbans artışı gerçekleşmemiştir. Işık, sıcaklık kadar olmasa da parçalanma düzeyini artırmaktadır.

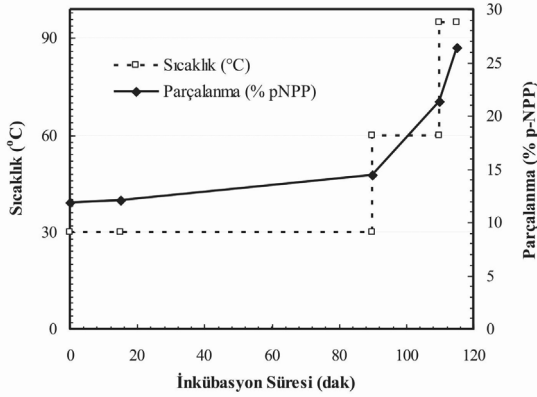


Şekil 3. Düşük sıcaklıklarda uzun süreli bekletmenin substratın kendiliğinden parçalanması üzerine etkisi

Figure 3. The effect of various storage temperatures for longer periods on the stability of substrate against self-hydrolysis.

Kısa süreli sıcaklık uygulamalarının sonuçları incelendiğinde (Şekil 4), sıcaklığı 30 °C'ye ayarlanmış su banyosunda bekletilen substrat çözeltisinde örneğin 15 dak süresince küçük bir absorbans artışı (~%2) olurken sürenin 90

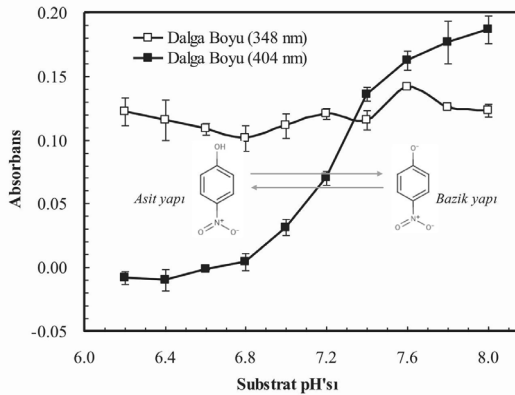
dakikaya çıkması ile başlangıç düzeyine kıyasla abs seviyenin %20 arttığı görülmektedir. Parçalanma oranı hesaplandığında 30, 60 ve 95 °C'lerde, dakikada 0.0014, 0.0154 ve 0.0456 absorbans artışları olduğu görülmektedir. Ortam sıcaklığındaki artış kendiliğinden parçalanma hızını arttırmaktadır.



Şekil 4. Birbiri ardı sıra artan sıcaklık derecelerinde belli süreler inkübe edilen substrat çözeltisinde (0.512 mM pNPP, 3 gün depolanmış) gözlemlenen parçalanma düzeyi. *Figure 4. Non enzymatic hydrolysis of pNPP substrate (0.512 mM, stored for 3 days) subjected to sequential incubations at increasing temperatures.*

pH ve Tampon Kapasitesi

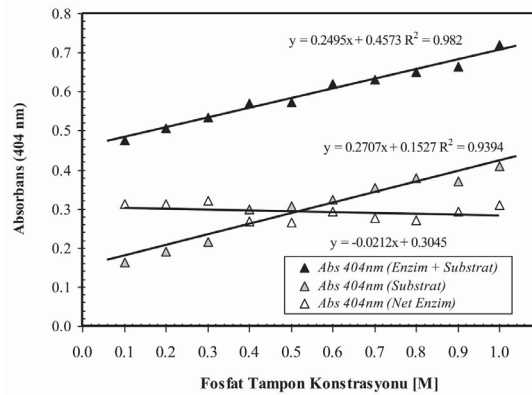
Şekil 5'de pH 6 ile 8 aralığında farklı pH'lardaki substrat çözeltisi bünyesindeki pNP'nin 348 ve 404 nm dalga boylarında gösterdiği absorbansın düzeyleri görülmektedir. 404 nm dalga boyunda substrat içerisinde var olan pNP'nin gösterdiği absorbans pH arttıkça sigmoidal olarak arttığı görülmektedir. Yani, pH 6.8 ile 7.8 aralığında şekil



Şekil 5. Substrat çözeltisi (0.256 mM pNPP, % 20 asetonitril ve % 80 oranında 50 mM pH 7 potasyum fosfat içeren çözücü ile hazırlanmış) üzerine pH değişiminin etkisi. *Figure 5. The effect of pH on the substrate solution (0.256 mM pNPP prepared with a mixture of acetonitrile (20%) and potassium phosphate 50 mM pH 7 (80%).*

üzerinde gösterilen pNP'nin (pKa 7.2) iyonlaşması 404 nm dalga boyunda gözlemlenen absorbansı etkilenmektedir. Buna karşın, 348 nm dalga boyunda elde edilen absorbans değerleri pH değişiminden önemli düzeyde etkilenmemektedir.

Farklı konsantrasyonlardaki fosfat tamponunun enzim aktivitesine etkisi Şekil 6'da gösterilmiştir. Aynı oranda lipaz içeren ve aynı süre inkübe edilen örneklerde, tampon kapasitesi arttıkça gözlemlenen absorbans düzeyi artmaktadır. Ancak, enzim yerine kontrol amaçlı fosfat tampon ilave edilen örneklerin de absorbansları benzer oranda artmaktadır. Dolayısıyla, gözlemlenen absorbans artışı, pNP ürününün (404 veya 348 nm dalga boylarında) absorbans değerinin tampon konsantrasyonuna bağlı olarak arttığını göstermektedir. Burada enzimatik hidrolizin etkisini net olarak ortaya çıkarmak için, enzimatik hidroliz ile oluşan absorbans değerlerinden, kontrol substratın (başlangıçtan gelen veya inkübasyon sürecinde oluşan) otohizolizini ve ortamdaki iyon konsantrasyonundan etkilenmesini yansıtan absorbans değerleri elimine edildiğinde, sadece enzim etkisi ile olan hidrolizi yansıtan (Net ürün, Şekil 6) ve beklendiği üzere yatay bir doğru oluşturacak şekilde sıralanan absorbans düzeyleri elde edilebilmiştir.



Şekil 6. Substrat tampon kapasitesinin enzim aktivitesi ölçümü üzerine etkisi.

Figure 6. The effect of buffer capacity on the enzyme assay measurements.

SONUÇ

Bu çalışmada lipaz aktivitesinin ölçümünde kullanılan pNPP substratı ve pNP ürününün normal enzim aktivitesi ölçüm koşullarından nasıl etkilendikleri incelenmiştir. Substratın maruz kaldığı sıcaklık veya süre arttıkça daha yüksek

oranda kendiliğinden parçalanmaya uğradığı görülmüştür. Buna ilave olarak oluşan *p*NP ürününün absorbansının ortam pH'sı ve tampon kapasitesine bağlı olarak değişebildiği tespit edilmiştir.

Dolayısıyla, bu tür substratlarla aktivite ölçümünde;

(a) *p*NP substrat çözeltisi taze hazırlanmalıdır. Hazırlanan çözeltinin kısa süreli depolamalarda buzdolabı sıcaklığı kullanılabilir, ancak uzun süreli depolamalarda dondurularak saklanması gereklidir.

(b) Substratla aktivite ölçümünde lipaz ile olan etkileşim süresi mümkün olduğunca kısa tutulmalıdır.

(c) Absorbans ölçümü 400 nm civarında yapılacak ise nötr veya tercihan alkali pH tercih edilmelidir.

(d) Ürün absorbans değerleri sabit bir pH değerinde ve tampon konsantrasyonunda yapılmalıdır.

(e) Denemeler enzim içermeyen bir "paralel kontrol" eşliğinde yürütülmelidir.

Paralel kontrol, enzim hariç tepkime karışımının tüm bileşenlerini (substrat dâhil) içermeli ve tepkime süresince uygulanan işlemlere maruz kalmalıdır. Bu paralel kontrolün absorbans ölçümünde tanık olarak kullanılması ile oluşabilecek kendiliğinden parçalanma kısmen elimine edilebilecektir.

Bu sınırlamalar dikkate alındığında, *p*NP alkonat esterleri ile literatürde belirtildiği gibi hızlı ve kolayca lipaz aktivitesi izlenebilmektedir.

TEŞEKKÜR

Bu araştırma Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı (Proje No 2007-ZF-B36) ve TÜBİTAK (Proje No: MAG- 107M487) tarafından desteklenmiştir. Çalışmaların yürütülmesinde desteklerinden dolayı Prof. Dr. Nahit AKTAŞ ve Doç. Dr. Mehmet Bora KAYDAN'a teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Jaeger KE, Eggert T. 2002. Lipases for biotechnology. *Curr Opin Biotech*, 13, 390-397.
2. Bastida A, Sabuquillo P, Armisen P. 1998. A single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. *Biotechnol Bioeng*, 58, 486-493.
3. Paiva AL, Balca VM, Malcata FX. 2000. Kinetics and mechanisms of reactions catalysed by immobilized lipases. *Enzyme Microb Tech*, 27, 426-446.
4. Shimada Y, Watanabe Y, Sugihara A, Tominaga Y. 2002. Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. *J Mol Catal B-Enzym*, 17, 133-142.
5. Schmidt M, Bornscheuer UT. 2005. High-throughput assays for lipases and esterases. *Biomol Eng*, 22, 51-56.
6. Furutani T, Su R, Ooshima H, Kato J. 1995. Simple screening method for lipase for transesterification in organic solvent. *Enzyme Microb Tech*, 17, 1067-1072.
7. Gupta R, Rathi P, Gupta N, Bradoo S. 2003. Lipase assays for conventional and molecular screening: An overview. *Biotechnol Appl Bioc*, 37, 63-71.
8. Palomo JM, Ortiz C, Fernández-Lorente G, Fuentes M, Guisán JM, Fernández-Lafuente R. 2005. Lipase-lipase interactions as a new tool to immobilize and modulate the lipase properties. *Enzyme Microb Tech*, 36, 447-454.
9. Pizarro C, Fernandez-Torroba MA, Benito C, Gonzalez-Saiz JM. 1997. Optimization by experimental design of polyacrylamide gel composition as support for enzyme immobilization by entrapment. *Biotechnol Bioeng*, 53, 497-506.
10. Helistö P, Korpela T. 1998. Effects of detergents on activity of microbial lipases as measured by the nitrophenyl alkanoate esters method. *Enzyme Microb Tech*, 23, 113-117.
11. Dalmau E, Montesinos J, Lotti M, Casas C. 2000. Effect of different carbon sources on lipase production by *Candida rugosa*. *Enzyme Microb Tech*, 26, 657-663.

12. de la Casa RM, Guisán JM, Sánchez-Montero JM, Sinisterra JV. 2002. Modification of the activities of two different lipases from *Candida rugosa* with dextrans. *Enzyme Microb Tech*, 30, 30-40.
13. Beisson F, Tiss A, Riviere C, Verger R. 2000. Methods for lipase detection and assay: a critical review. *Eur J Lipid Sci Tech*, 102, 133-153.
14. Bañó MC, González-Navarro H, Abad C. 2003. Long-chain fatty acyl-CoA esters induce lipase activation in the absence of a water-lipid interface. *Biochim Biophys Acta*, 1632, 55-61.
15. Pencreac'h G, Leullier M, Baratti JC. 1997. Properties of free and immobilized lipase from *Pseudomonas cepacia*. *Biotechnol Bioeng*, 56, 181-189.
16. Abramic M, Lescic I, Korica T, Vitale L, Saenger W, Pigac J. 1999. Purification and properties of extracellular lipase from *Streptomyces rimosus*. *Enzyme Microb Tech*, 25, 522-529.
17. Palomo JM, Fuentes M, Fernández-Lorente G, Mateo C, Guisan JM, Fernández-Lafuente R. 2003. General trend of lipase to self-assemble giving bimolecular aggregates greatly modifies the enzyme functionality. *Biomacromolecules*, 4, 1-6.