

29 221



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

## PRODUCCION DE LIPASAS MICROBIANAS EN UN SISTEMA DE FERMENTACION SEMISOLIDA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

JOSE RAUNEL TINOCO VALENCIA

DIRECTOR DE TESIS.

Q.F.B. GERARDO RIVERA MUÑOZ

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

MEXICO, D. F.

1989



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## CONTENIDO

	Página
1) INTRODUCCION.....	1
2) ASPECTOS GENERALES DE LAS LIPASAS.....	4
3) ASPECTOS GENERALES DE LOS SISTEMAS DE FERMENTACION SEMISOLIDA.....	20
4) OBJETIVO.....	30
5) MATERIAL Y METODOS.....	31
6) RESULTADOS Y DISCUSION.....	45
7) CONCLUSIONES.....	75
8) BIBLIOGRAFIA CITADA.....	77

## INTRODUCCION

Las transformaciones biológicas han sido utilizadas por el hombre en forma empírica desde el inicio de las civilizaciones en actividades como la agricultura, panificación, elaboración de vinos, etc., este hecho ha tenido una continuidad histórica paralela a la generación del conocimiento, dando como resultado una amplia gama de tecnologías con las cuales se busca el aprovechamiento óptimo de los organismos vivos.

En la etapa más reciente de este proceso, se ha definido una nueva área de estudio: la Biotecnología, la cual se refiere en un sentido amplio, a la aplicación controlada de agentes biológicos (componentes celulares y células vivas o muertas) en operaciones tecnológicas con el fin de obtener un bien o servicio (8, 73).

La Biotecnología como es concebida actualmente, tuvo sus comienzos con el descubrimiento y posterior industrialización de la penicilina a principios de siglo y después de la II Guerra Mundial se favoreció con el estudio de los biorreactores y con la evolución de las industrias farmacéutica y agroalimentaria.

Los avances en Genética y Biología Molecular edificaron la Biotecnología moderna, la cual es de naturaleza multidisciplinaria y abarca diversas áreas como: Ingeniería Genética,

Tecnología Enzimática, Microbiología, etc. De igual importancia han sido los avances en las áreas de bioprocesos como son la fermentación, separación y purificación, haciendo posible un mayor control de los sistemas biológicos, presentando a la vez un campo sumamente amplio y novedoso, con objetivos y metodologías muy variadas y un enorme potencial aún no explorado (8, 69, 73, 74).

De esta manera, la Biotecnología ha tenido un fuerte impacto en diferentes áreas de producción, además de que sus diversificaciones siguen mostrando un rápido crecimiento, lo que ha generado una gran variedad de productos cuya aplicación se ha manifestado principalmente en las Industrias Farmacéutica, Alimentaria y Química, en la Agricultura y en Tratamiento de Residuos.

En esta consolidación de la Biotecnología, la Tecnología Enzimática ha tenido un papel muy importante en diversos ámbitos de producción, hecho que se ha originado por el descubrimiento de que los procesos biológicos se realizan en gran medida, mediante reacciones catalizadas por enzimas que son compuestos de naturaleza proteica, lo cual presenta un panorama muy vasto de productos con potencialidades de uso.

En nuestros días, el uso de enzimas es muy común en procesos diversos como la cervecera, panificación, elaboración de quesos, productos cárnicos, en el procesamiento de textiles, piel y papel así como en formulaciones de detergentes biológicos. De esta manera, su demanda sigue en aumento, dando lugar para la búsqueda de metodologías que permitan su producción en gran escala.

Tradicionalmente, la obtención industrial de enzimas microbianas se ha realizado a partir de cultivos en medios líquidos (o fermentaciones sumergidas) debido a que las condiciones de cultivo se pueden controlar con mayor facilidad. Una alternativa importante la representan los cultivos en estado sólido (o fermentaciones semisólidas), ya que facilitan los procesos de recuperación del producto, obteniéndose éste en concentraciones mas altas que las que se pueden lograr en los cultivos líquidos (6, 22, 25).

Esta técnica se basa en el crecimiento de microorganismos sobre materiales sólidos en ausencia de agua libre (26), la cual ha sido empleada por las culturas orientales para la elaboración de productos alimenticios fermentados. En 1914, Takamine (78) empleó esta metodología para la obtención de enzimas amilasas a partir del cultivo de *Aspergillus oryzae* sobre salvado de trigo, este trabajo fué la base que permitió descubrir el fuerte potencial que poseen estos sistemas en la obtención de metabolitos de importancia comercial.

## ASPECTOS GENERALES DE LAS LIPASAS.

Desde hace varias décadas, se han utilizado las enzimas en la industria agroalimentaria para mejorar y transformar las propiedades de algunas materias primas. Su aplicación a escala industrial es resultado de la posibilidad de producir enzimas en gran escala, las cuales han sido en gran medida de tipo hidrolasas extracelulares, utilizadas por las células para degradar el sustrato a compuestos asimilables de menor complejidad (6). La producción mundial de este tipo de enzimas representa aproximadamente el 80% de la totalidad de ellas, de éstas el 60% son enzimas proteolíticas usadas principalmente en detergentes, productos lácteos y en el curtido de pieles; el 30% son enzimas amilolíticas de uso en panificación, elaboración de vinos y en las industrias del almidón y textiles; el 3% son enzimas lipolíticas y el porcentaje restante son enzimas especializadas (21).

Aunque la producción de lipasas (Glicerol éster hidrolasas EC 3.1.1.3) representa un pequeño porcentaje, ésta ha ido incrementándose gracias al interés creciente que se ha mostrado en el desarrollo de nuevas aplicaciones, dando como resultado la existencia de lipasas purificadas en forma de polvo (70), así como su inmovilización en soportes hidrofóbicos o hidrofílicos (59) o su microencapsulamiento en polímeros sintéticos (70).

### Definición y Características Estructurales de Lipasas.

Las lipasas son enzimas capaces de catalizar la hidrólisis de triglicéridos, diglicéridos y monoglicéridos liberando ácidos

grasos libres y glicerol. Tanto las lipasas como las esterasas catalizan la hidrólisis de acilgliceroles, pero difieren en su especificidad hacia la forma en que se presenta el sustrato. Las lipasas se caracterizan por su capacidad de catalizar la hidrólisis de acilgliceroles en la interfase establecida entre el sustrato insoluble y una fase acuosa en la que se encuentra disuelta la enzima, siendo éstos sus mejores sustratos, también catalizan la hidrólisis de ésteres solubles en agua pero a una velocidad muy baja (70, 32, 4, 43). Por su parte, las esterasas catalizan la hidrólisis de ésteres hidrosolubles preferentemente a ésteres insolubles en agua (4, 43).

Se ha sugerido que la interacción de las lipasas con su sustrato en la interfase aceite-agua es originada por la elevada proporción de aminoácidos hidrofóbicos presentes en regiones determinadas de la superficie de su molécula, además de que estas secuencias de aminoácidos pueden ser responsables del comportamiento de asociación que muestran algunas lipasas en soluciones acuosas (43).

Generalmente, las lipasas son moléculas glucoproteicas cuyo peso molecular varía entre 20000 y 60000 daltones, identificándose la presencia de carbohidratos en una proporción del 2 al 15%, siendo manosa el mayor residuo glucosídico en la mayoría de los casos. Probablemente estas cadenas laterales de carbohidratos no están asociadas con la actividad enzimática, Semeriva y col. (71) observaron que la lipasa de *Rhizopus arrhizus* puede ser hidrolizada en un glucopeptido de bajo peso molecular sin actividad lipolítica y una fracción proteica libre de azúcares



con elevada actividad. Por otro lado, se piensa que la molécula de azúcar facilita el paso de la enzima a través de la pared celular (32).

#### Factores que influyen en la actividad de las lipasas.

Los principales factores que tienen efecto sobre la actividad de las lipasas son el pH y la temperatura de reacción. Generalmente presentan actividad en un rango muy amplio de pH, aunque la actividad que presentan a valores bajos de pH es considerablemente menor en relación a la que presentan en su valor óptimo, variando éste entre 6 y 9 unidades para la mayoría de las lipasas microbianas. Por otro lado, la mayor actividad de estas enzimas se presenta a una temperatura que varía entre 30 y 50° C (Tabla I).

Se ha visto que las lipasas microbianas son razonablemente estables en soluciones acuosas a temperaturas menores de 40° C, sin embargo, algunos microorganismos producen lipasas resistentes a la inactivación por calor, tal es el caso de *Aspergillus niger*, *Rhizopus japonicus* y *Chromobacterium viscosum* las cuales son estables a 50° C (20, 2, 85).

Otro factor que puede influir en la actividad de las lipasas es la presencia de cofactores como pueden ser los iones  $Mg^{++}$ ,  $Ca^{++}$ ,  $Fe^{++}$  o  $Mn^{++}$ . Nishio y col. (57) observaron que la adición de iones de calcio al sistema de reacción estimuló la actividad en un 6% respecto al control, para la lipasa obtenida de *Pseudomonas fragilis*. Sin embargo, la adición de iones como  $Fe^{++}$  y  $Zn^{++}$ , disminuyeron dicha actividad a menos del 40%.

TABLA I  
 CONDICIONES OPTIMAS DE ACTIVIDAD DE LIPASAS MICROBIANAS.

Microorganismo	pH	Temperatura (°C)	Referencia
<i>Penicillium roqueforti</i>	5-7	30	48
<i>Penicillium caseicolum</i>	6-9	35-40	37
<i>Penicillium camemberti</i>	9-9.5	35-40	5
<i>Penicillium candidum</i>	5.5	42	35
<i>Aspergillus niger</i>	5-6	40	27
<i>Mucor miehei</i>	6-8	50	51
<i>Pseudomonas fragii</i>	8-9	50	57

### Especificidad Hacia el Sustrato.

La especificidad de las lipasas hacia el tipo de sustrato es crucial para su aplicación en los procesos analíticos o industriales. Los sustratos comunmente usados son aceites y grasas naturales como el aceite de olivo y grasa de leche, o glicéridos sintéticos (tricaproína, tricaprilina, etc.), los cuales son hidrolizados de manera diferente dependiendo de la lipasa empleada.

Los estudios relacionados con la especificidad de las lipasas son difíciles de interpretar debido a la formación de diferentes productos de reacción como los diacilglicérols, los cuales varían junto con los ácidos grasos producidos (75). Debido a ello los compuestos que han sido empleados con este fin, son los triglicéridos que contienen un solo tipo de ácidos grasos en su molécula como son la tributirina, tricaprilina, etc.

Se ha demostrado que una elevada proporción de lipasas microbianas hidrolizan preferentemente ésteres de ácidos grasos de cadena corta (Tabla II), por el contrario, se ha reportado que las lipasas de *Chromobacterium viscosum*, *Humicola lanuginosa* y *Rhizopus japonicus* hidrolizan lentamente tributirina, o liberan en bajas proporciones ácido butírico y otros ácidos de cadena corta a partir de grasa de leche ( 76, 39, 2).

La única lipasa para la que se ha demostrado una especificidad muy pronunciada para la hidrólisis de ésteres de un tipo particular de ácidos grasos es la enzima de *Geotrichum candidum*, la cual cataliza la hidrólisis de ésteres de ácidos grasos insaturados de cadena larga con un doble enlace en la

TABLA II  
 SUSTRATOS QUE SON HIDROLIZADOS PREFERENTEMENTE POR ALGUNAS  
 LIPASAS DE ORIGEN MICROBIANO

Microorganismo	Sustrato	Referencias
<i>Penicillium roqueforti</i>	Tricaprina Tributirina	48
<i>Penicillium caseicolum</i>	Tributirina Trioleina Triacetina	37
<i>Penicillium camemberti</i>	Tributirina	5
<i>Penicillium cyclopium</i>	Tricaprina Trioleina Tricaprina	29
<i>Mucor miehei</i>	Tributirina	51

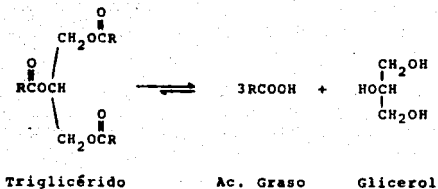
posición 9, liberando preferentemente ácido oleico, palmitoleico, linoleico y  $\alpha$ -linoleico a partir de aceites y grasas (31, 42).

De acuerdo a la posición de corte en la molécula del triglicérido, las lipasas han sido divididas en dos grupos. El primer grupo de ellas, no es específico para alguna posición, de tal forma que libera ácidos grasos de cualquiera de las tres posiciones del triglicérido (Figura 1). Estas enzimas catalizan la hidrólisis completa de triglicéridos y aunque los mono y diglicéridos son intermediarios en la reacción, no se acumulan en niveles elevados, debido a que son hidrolizados más rápido que los triglicéridos (43).

El segundo grupo está formado por las lipasas que liberan ácidos grasos preferencialmente de las posiciones externas 1 y 3 de los triglicéridos (Fig. 1). Estas enzimas liberan ácidos grasos libres, 1,2(2,3)-diglicéridos y 2-monoglicéridos. La velocidad de hidrólisis de triglicéridos normalmente es mayor que la de diglicéridos y por consecuencia hay acumulación de mono y diglicéridos durante la reacción. Como los productos 1,2(2,3)-diglicéridos y 2-monoglicéridos son químicamente inestables, hay migración del grupo acilo, generando 1,3-diglicéridos y 1-monoglicéridos, de tal forma que en tiempos prolongados de reacción, se produce la hidrólisis completa del triglicérido a ácidos grasos libres y glicerol (43).

En la Tabla III, se enlistan los microorganismos para los cuales se ha estudiado el tipo de lipasa que producen siendo pocos los ejemplos que se pueden encontrar en la bibliografía.

1. REACCION CATALIZADA POR LIPASAS NO ESPECIFICAS:



2. REACCION CATALIZADA POR LIPASAS 1,3-ESPECIFICAS:

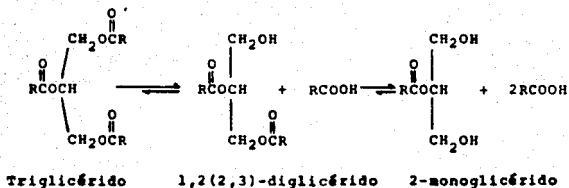


Figura 1. HIDROLISIS DE TRIGLICERIDOS POR ENZIMAS LIPOLITICAS ESPECIFICAS Y NO ESPECIFICAS.

**Fuentes de Obtención de las Enzimas Lipolíticas.**

Las lipasas son producidas por animales, vegetales y diferentes tipos de microorganismos. En animales se han identificado lipasas pancreáticas sintetizadas en las células acinares, esterasas pregastricas, lipasas linguales y lipasas presentes en la leche. Las fuentes más importantes de estas enzimas son preparaciones derivadas del estómago de carneros, corderos y terneros (4). Las lipasas de origen vegetal no han tenido aplicaciones comerciales (43), aunque se han identificado en diversos frutos y semillas tales como trigo, arroz, avena, soya y otras (4); por su parte, se han investigado diversas fuentes microbianas de lipasas, siendo importantes las levaduras de los géneros *Candida* y *Torulopsis*; los hongos filamentosos como *Rhizopus*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Geotrichum* y *Mucor*, así como especies bacterianas de los géneros *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Corinebacterium* y *Propionibacterium* (9, 4).

No obstante que las lipasas de origen animal han sido purificadas y comercializadas ampliamente, su producción se ha ido sustituyendo en gran medida por aquellas de origen microbiano (43). Estas tienen la ventaja de que su producción no depende de variaciones estacionales (como las enzimas de origen vegetal), además de que no se ve limitada por la disponibilidad de vísceras lo cual es el caso de las lipasas de origen animal. Otra característica importante de las lipasas microbianas es que su producción puede controlarse de acuerdo a la demanda que exista en el mercado (9, 43).

TABLA III.

MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE LIPASAS ESPECIFICAS  
Y NO ESPECIFICAS DE ACUERDO A LA POSICION DE CORTE  
EN LA MOLECULA DEL TRIGLICERIDO

<u>Lipasas No Especificas</u>	
Microorganismo productor	Referencia
<i>Geotrichum candidum</i>	31
<i>Propionibacterium acnes</i>	28
<i>Corynebacterium acnes</i>	24
<i>Staphylococcus aureus</i>	81
<u>Lipasas 1,3 Especificas</u>	
Microorganismo productor	Referencia
<i>Aspergillus niger</i>	62
<i>Mucor javanicus</i>	30
<i>Rhizopus arrhizus</i>	82



### Producción de Lipasas Microbianas.

En las últimas dos décadas, los estudios que se han realizado en relación a la producción de este tipo de las lipasas microbianas se han enfocado básicamente a la formulación de un medio de cultivo en el cual se logre obtener la mejor producción, analizando el efecto de diferentes fuentes de carbono y de nitrógeno, así como diferentes tipos de sales, o modificando también las condiciones de cultivo (pH y temperatura).

Las fuentes de carbono analizadas han sido de muy diversos tipos y se ha encontrado que la adición de azúcares como glucosa, galactosa, sacarosa o xilosa al medio de cultivo han estimulado dicha producción de lipasas en los cultivos de algunos microorganismos, (Tabla IV). Por otro lado, los estudios con diferentes fuentes de nitrógeno, han mostrado que las que estimulan la producción de estas enzimas son aquellas de naturaleza compleja como peptona, harina de soya, o hidrolizados de proteína (Tabla IV); en ciertos casos, se ha observado que con la mezcla de algunas de estas fuentes de nitrógeno se ha estimulado su producción (19, 54).

La presencia de algunas sales en el medio de cultivo también ha estimulado la producción de lipasas, principalmente las sales como  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  y  $KH_2PO_4$ , (63, 60). Estas han sido empleadas en la mayoría de las formulaciones de medios de cultivo reportadas en la bibliografía. De igual manera, las sales de sodio, potasio y calcio (cloruros y citratos) han incrementado en un nivel considerable los títulos de producción de estas enzimas (19, 16,17).

TABLA IV

FUENTES DE CARBONO Y NITROGENO CON LAS CUALES SE HAN OBTENIDO MEJORES RENDIMIENTOS DE LIPASAS.

Microorganismo	Fuente de Carbono	Fuente de Nitrógeno	Referencias
<i>Aspergillus wentii</i>	Glucosa Manitol Maltosa	Peptona Harina de Soya	17
<i>Rhizopus nigricans</i>	Glucosa Galactosa Manitol	Peptona	16
<i>Aspergillus niger</i>	Sacarosa Glucosa Fructosa	Nitrato de Amonio o Sodio	63
<i>Penicillium chrysoogenum</i>	Glucosa Maltosa	Peptona Harina de Soya	15
<i>Rhizopus oligosporus</i>	Galactosa Xilosa Glucosa	Hidrolizado de Caseína Extracto de Harina de Soya	54

Por otro lado, cuando se ha analizado el efecto de las condiciones de cultivo para la producción de lipasas, se ha observado que el rango de pH óptimo es de 6.0 a 7.0; la temperatura varía entre 27 y 40°C, así como el tiempo óptimo de cultivo entre 2 a 6 días para los casos que son mencionados en la Tabla V, sin embargo, estas condiciones pueden cambiar dependiendo tanto del microorganismo empleado, como de la formulación del medio de cultivo.

Es importante aclarar que todos estos resultados han sido obtenidos de estudios realizados en medios de cultivo líquidos, siendo aún escasos los reportes bibliográficos relacionados con la caracterización química de las lipasas. Así mismo, la regulación de la síntesis de estas enzimas ha sido muy poco estudiada; en algunos casos, la presencia de aceites o grasas en el medio de cultivo ha inducido dicha síntesis (32, 63).

Sin embargo, en algunas instancias la producción ha sido inhibida con la adición de ciertos aceites. Tal es el caso de la lipasa producida por *Penicillium roqueforti*, cuya síntesis disminuye con la adición de aceite de olivo o aceite de maíz (19). En estudios realizados con *Rhizopus oligosporus* se observó el mismo efecto con la adición de aceites a un medio basal, excepto cuando se usó Tween 80 y Tween 20, los cuales promovieron la producción en cultivos líquidos estáticos y agitados (54).

TABLA V  
CONDICIONES OPTIMAS DE CULTIVO PARA LA  
PRODUCCION DE LIPASAS

Microorganismo	pH	Temperatura (°C)	Tiempo de Cultivo (Días)	Ref.
<i>Aspergillus wentii</i>	6.0	30	3	17
<i>Rhizopus nigricans</i>	6.0	30	6	16
<i>Aspergillus niger</i>	7.0	35	4	63
<i>Penicillium chrysogenum</i>	6.0	30	3	15
<i>Penicillium roqueforti</i>	7.0	27	2	19
<i>Rhizopus oligosporus</i>	6.5	40	3	54'

### Aplicaciones de las Lipasas.

Las lipasas han tenido un papel importante en los procesos de fermentación y otros procesos de preparación de alimentos donde actúan microorganismos, pese a ello, sólo recientemente se ha llegado a producir preparaciones lipolíticas a nivel comercial, las cuales, tradicionalmente se han obtenido a partir del estómago de carneros jóvenes o de terneros. Los principales estudios con estas preparaciones se han realizado con el fin de analizar el papel de las lipasas en la producción de sabor en productos alimenticios, especialmente en la industria de lácteos (70), en donde estas enzimas han mostrado su principal aplicación aunque también han tenido incidencia en otro tipo de industrias, las cuales son señaladas en la Tabla VI.

El uso de productos lácteos lipolizados, se ha difundido en mayor medida en productos de panadería como mezclas para pasteles y galletas o formulaciones de pastas dulces; también en la formulación de algunos productos de confitería como leche con sabor a chocolate, así como en la formulación de botanas como los "dips" de queso y en sustitutos de leche para café (70).

Actualmente se investigan nuevas aplicaciones, las cuales se han enfocado a utilizar la reacción inversa a la de hidrólisis mostrada por estas enzimas; algunos ejemplos son los siguientes:

- a) Resolución de mezclas racémicas de alcoholes (45, 10).
- b) Preparación de ésteres de alcoholes terpénicos de uso en fragancias (56).

- c) Interesterificación de grasas, para la formación de triglicéridos del tipo de cocoa a partir de aceite de coco (82).
- d) Síntesis de péptidos como el N-fenilacetil-L-cisteinil-D-valina, el cual es intermediario en la síntesis de penicilina (47).

TABLA VI  
 APLICACIONES INDUSTRIALES DE LAS ENZIMAS LIPOLITICAS

---

Industria Lechera:

- Elaboración de quesos madurados
- Elaboración de productos lipolizados para uso como saborizantes

Industria de Detergentes:

- Formulaciones de detergentes para aumentar su poder limpiador

Industria Farmacéutica y de Cosméticos:

- Elaboración de ayudas digestivas
- Formulación de cremas para combatir inflamación local en la piel
- Elaboración de shampoos para el cabello

Otras:

- Curtido de pieles
  - Catalizadores en reacciones de interesterificación
-

**ASPECTOS GENERALES DE LOS SISTEMAS DE FERMENTACION SEMISOLIDA.**

Los sistemas de fermentación semisólida (también llamados fermentaciones en estado sólido), se refieren al crecimiento de microorganismos en materiales sólidos sin la presencia de agua libre (50). Es importante aclarar que este término no se refiere a la fermentación de sustratos sólidos en un medio líquido, ni a la fermentación en medios líquidos con niveles elevados de sólidos insolubles. La característica distintiva de estos sistemas de fermentación, es la proporción de agua que pueden retener las materias primas que se emplean (14).

El agua se presenta absorbida dentro de la matriz sólida y la cantidad depende de la capacidad de absorción del sustrato. En la práctica es difícil establecer un límite exacto con respecto a la aparición de agua libre en el sistema; por ejemplo, para la corteza de maple, ésta se alcanza a un nivel del 40% de humedad, para la paja de trigo, a un 75% y para la mayoría de los materiales usados llega a ser aparente a un 80% (11).

Una característica que tiene fuerte impacto sobre la efectividad de estos sistemas, es el tamaño de las partículas del sustrato, el cual debe de estar dentro de un rango limitado. Por ejemplo, son ideales los granos de arroz o de trigo completos, ya que las cavidades que forman, permiten una libre circulación del aire entre la masa de sustrato; este es un parámetro que limita los niveles de humedad que pueden ser empleados, debido a

que los niveles altos de humedad provocan fuerte compactación de el sustrato, limitando el flujo de los gases así como la penetración del microorganismo entre la masa de sustrato (25, 14).

Existen procesos simulados de fermentaciones semisólidas, en los cuales se utilizan materiales sólidos inertes que sirven como soporte para el microorganismo y estos materiales son embebidos con una solución nutritiva. Este sistema nos da libertad en cuanto a la formulación del medio de cultivo, hecho que no ocurre cuando el soporte es también el sustrato (49).

#### **Micoorganismos Empleados en Fermentaciones Semisólidas.**

En la naturaleza, los sustratos sólidos tales como los desechos lignocelulósicos, estiércol, residuos vegetales, madera y frutos, son degradados y transformados mediante varios procesos microbiológicos. Dichos procesos pueden tener una aplicación en la obtención de un producto definido, sin embargo, esto exige en ocasiones que sea implementado con cultivos puros bajo condiciones controladas y empleando el sustrato más adecuado.

Aunque muchos microorganismos pueden crecer en sustratos sólidos, solo los hongos filamentosos poseen la capacidad para degradarlos eficientemente en ausencia de agua libre, por lo que en los estudios que se han realizado para obtener productos de interés industrial, estos microorganismos han sido los más usados. además de que el crecimiento y propagación de organismos unicelulares requiere siempre de agua libre (ii).



En los procesos de composteo y ensilaje, los cuales son tipos particulares de fermentaciones semisólidas crecen bacterias y levaduras a un nivel de humedad de 40-70%. Las bacterias termofílicas crecen principalmente en el primer estadio del composteo, las bacterias ácido-lácticas crecen en los procesos de ensilaje y las levaduras pueden crecer en simbiosis con otros microorganismos en ambos procesos (50).

Entre los hongos filamentosos, tres clases han alcanzado importancia económica: los Phycomycetes tales como los géneros *Mucor* y *Rhizopus*; los Deuteromycetes, principalmente los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* y los Basidiomycetes, especialmente los hongos de raíz blanca, entre ellos, ciertos hongos comestibles como *Pleurotus ostreatus* (50).

#### **Ventajas y Desventajas de las Fermentaciones Semisólidas en Relación a los Sistemas de Fermentación Sumergida.**

Los hongos empleados en fermentaciones semisólidas son microorganismos lisotróficos, es decir, que la digestión del alimento se lleva a cabo extracelularmente debido a la acción de enzimas que liberan a su entorno, esta particularidad los hace atractivos para la obtención de enzimas extracelulares a gran escala.

Otro aspecto importante que hace referencia a la fisiología de los microorganismos, es la forma de crecimiento de los hongos filamentosos que en sustratos como paja, pedazos de madera y granos, está caracterizado por la extensión apical de las hifas sobre la superficie de la matriz sólida, ocupando los intersti-

cios formados en el sustrato (50). De esta manera, las fermentaciones semisólidas permiten el crecimiento del microorganismo sin provocar algún daño en su fisiología como puede suceder en las fermentaciones sumergidas donde la agitación provoca fragmentación micelial, así como a la formación de agregados celulares llamados "pellets" (50).

De manera simplificada, se presenta una lista de las ventajas observadas en un sistema de fermentación semisólida:

- 1) El medio de cultivo es relativamente simple ya que se emplean materiales complejos que pueden ser desechos agroindustriales.
- 2) El espacio requerido por el equipo de fermentación es menor en relación a la producción del metabolito deseado, debido a que el sustrato está más concentrado como consecuencia del uso de menor cantidad de agua.
- 3) El bajo nivel de humedad requerido disminuye considerablemente las posibilidades de contaminación bacteriana, siendo innecesario esterilizar el sustrato, en algunos casos.
- 4) Se requiere menor cantidad de solvente para extraer el producto, disminuyendo considerablemente el problema de generación de aguas residuales.
- 5) Se facilita la recuperación y purificación del producto debido a que se encuentra más concentrado.
- 6) La oxigenación se obtiene más fácilmente gracias a los espacios que existen entre las partículas del sustrato.

Por otro lado, se tienen algunos problemas los cuales se pueden considerar desventajas cuando se pretende hacer uso de este tipo de fermentaciones, éstos son los siguientes:

- 1) Hay una limitación al uso de microorganismos que sean capaces de crecer en condiciones de bajos niveles de humedad.
- 2) La eliminación del calor biológico representa un serio problema cuando se emplean fermentaciones con grandes cantidades de sustrato.
- 3) El monitoreo del contenido de humedad, y de ciertos parámetros como el pH, formación de producto o el crecimiento microbiano, es un problema que requiere de mayores consideraciones técnicas.
- 4) El control y escalamiento del proceso presenta problemas debido a que el sistema es muy heterogéneo.

Estas características han sido consideradas como aquellas que demarcan mayor diferencia entre los dos tipos de fermentaciones (25, 50).

Uno de los principales problemas que muestran las fermentaciones semisólidas es la estimación del crecimiento microbiano, debido en gran parte a la penetración del micelio en el sustrato. Aunado a ello, la elevada heterogeneidad de estos sistemas, dificulta considerablemente la realización de muestreos con una representatividad y confiabilidad adecuadas. Por otro lado, las mediciones directas del crecimiento usadas en los procesos de fermentación sumergida como peso seco o conteos en placa, no pueden ser utilizados en aquellas (50, 66).

Por este motivo se han investigado algunos parámetros que puedan servir como índices de crecimiento, como es el caso de componentes celulares cuyas características indispensables son: 1) deben ser sintetizados desde el inicio del crecimiento, y 2) su formación no debe ser inhibida por la liberación de otros compuestos que resulten del metabolismo o por cambios en el ambiente de fermentación, tales como los cambios de pH y de humedad.

Los compuestos que comúnmente han sido estimados como índices de crecimiento son componentes celulares como la quitina, el componente mayoritario de la pared celular en la mayoría de los hongos (67); las proteínas, medidas como la cantidad de nitrógeno precipitable con ácido tricloroacético (83), o el contenido de ergosterol, éste es el esteroles predominante en muchos hongos (46, 58). También se han realizado estimaciones de compuestos extracelulares, principalmente se han ensayado enzimas hidrolíticas como  $\alpha$ -amilasa, amiloglucosidasa (1, 60), o la actividad de lacasa extracelular (84). Sin embargo, los métodos más atractivos y de mayor divulgación, son aquellos en que se cuantifica la liberación de  $\text{CO}_2$ , o el consumo de oxígeno, debido a la rapidez, facilidad y representatividad con que pueden efectuarse, incluso, se han formulado modelos matemáticos como los presentados por Carrizales (12) o los propuestos por Okazaki (61), los cuales tienen como fundamento la descripción de la generación de dióxido de carbono producida por el metabolismo de los microorganismos empleados en la fermentación.

Cabe destacar que para seleccionar el método de cuantificación de crecimiento en fermentaciones semisólidas, se debe tener mucho cuidado en la elección del parámetro a determinar, lo cual dependerá principalmente en el tipo de sustrato y las características del microorganismo empleados, de igual importancia es la instrumentación que se tenga disponible para ello.

#### **Procesos en los que se han Implementado Sistemas de Fermentación Semisólida.**

Una de las áreas en las que se ha recurrido con mayor frecuencia al uso de sistemas de fermentación semisólida es en el enriquecimiento con proteína microbiana de materiales lignocelulósicos y desechos de origen vegetal con un bajo contenido proteico, a fin de que posteriormente sean usados como alimento de ganado (Tabla VII), en estos casos, el producto de la fermentación es un complejo sustrato residual-biomasa del que no se requiere eliminar grandes cantidades de agua.

Las fermentaciones semisólidas también han sido empleadas en la producción de ácidos orgánicos como el ácido cítrico (40), y el ácido giberélico (36), ambos de gran interés industrial. En la producción de combustibles como el etanol a partir de remolacha azucarera (33) y la producción de biogas a partir de paja de trigo (53). Otras aplicaciones han sido en la producción de esporas de hongos (44), así como de algunos tipos de micotoxinas (25, 38).

Un área en la que dicha metodología puede tener una importante función es en la producción de diferentes tipos de enzimas

TABLA VII

ENRIQUECIMIENTO PROTEICO DE DESECHOS DE  
ORIGEN VEGETAL

Organismo	Sustrato	Referencia
<i>Aureobasidium pullulans</i> NRRL Y-6220	Paja de Centeno	(23)
<i>Trichoderma viride</i> GH9414 <i>Rhizopus oligosporus</i> CBS-324.35	Vaina de algarrobo	(34)
<i>Monascus ruber</i> <i>Chaetomium cellulolyticum</i> ATCC 32319	Serrín de maple	(54)
<i>Abortiporus biennis</i> <i>Lenzites betulina</i> <i>Pleurotus serotinus</i> <i>Trametes hirsuta</i> <i>Ganoderma applanatum</i> <i>Pleurotus ostreatus</i> <i>Pleurotus sajor caju</i>	Paja de trigo	(86)
<i>Chaetomium cellulolyticum</i>	Paja de trigo	(78)
<i>Trichoderma lignorum</i> <i>Aspergillus niger</i> GH-2	Rastrojo de maiz Estiércol Cáscara de naranja	(68)

por esta razón esta área es donde se han realizado el mayor número de trabajos. Las enzimas de mayor interés han sido amilazas, celulasas, pectinasas y xilanasas, aunque puede localizarse reportes aislados sobre la producción de otro tipo de enzimas (Tabla VIII).

Existen muy pocos reportes en la bibliografía con relación a la producción de lipasas microbianas empleando sistemas de fermentación semisólida; en este sentido, solo se localizaron dos publicaciones, en la primera (6) se menciona una patente registrada en Estados Unidos en 1949 en la cual utilizan salvado de trigo y harina de soya como sustrato para la producción de lipasas; en la otra (79), utilizaron una composición de medio sólido a base de salvado de trigo (100%), agua (70%) y  $\text{CaCO}_3$  (15%), empleando una fermentación semisólida con *Aspergillus niger* a  $30^\circ\text{C}$  por tres días, en esta publicación se menciona que la composición del medio de cultivo así como las condiciones de fermentación fueron obtenidas de un artículo publicado por Fukumoto et al (20).

Con base en estos artículos, se eligió el sustrato utilizado en este trabajo para la producción de lipasas, las demás condiciones de fermentación se eligieron con base a los datos publicados para los cultivos de tipo sumergido.

## TABLA VIII

## PRODUCCION DE ENZIMAS POR FERMENTACION SEMISOLIDA

Enzimas	Microorganismo	Sustrato	Ref.
AMILASAS	<i>Aspergillus oryzae</i>	Salvado de Trigo	(77)
	<i>Aspergillus oryzae</i>	Arroz	(51)
	<i>Aspergillus niger</i>	Harina de Yuca	(3)
	<i>Termitomyces clypeatus</i>	Bagazo de Caña	(72)
CELULASAS	<i>Trichoderma reesei</i> QM 9414	Salvado de Trigo	(52)
	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Salvado + Soya	(52)
	<i>Corioidius versicolor</i> R 105	Rastrojo de Maiz	(52)
	<i>Pestalopsis versicolor</i>	Paja de Arroz	(65)
PECTINASAS	<i>Trichoderma reesei</i> QM 9414	Salvado de Trigo	(52)
	<i>Penicillium capsulatum</i>	Pulpa de Remolacha	(18)
PROTEASAS	<i>Aspergillus oryzae</i> var <i>bruneus</i>	Arroz	(55)
XILANASAS	<i>Termitomyces clypeatus</i>	Aserrin Fibra de Coco	(72)
	<i>Polyporus sp-A-336</i>	Paja de Avena	(7)
LIPASAS	<i>Aspergillus niger</i>	Salvado de Trigo	(20)



### OBJETIVO

En base a lo anteriormente expuesto, este trabajo se realizó con el objeto de evaluar la posibilidad de emplear un sistema de fermentación semisólida para la producción de enzimas lipolíticas a partir del cultivo de hongos filamentosos, las cuales pudieran ser empleadas para la modificación de un sustrato lácteo.

## MATERIAL Y METODOS

### SELECCION DE LOS MICROORGANISMOS DE MAYOR PRODUCCION DE ENZIMAS LIPOLITICAS.

#### Microorganismos Empleados.

Se emplearon 19 cepas de hongos filamentosos que comprenden un total de 13 especies, las cuales se muestran en la Tabla IX.

#### Preservación de las Microorganismos.

Los microorganismos fueron mantenidos a 4°C en tubo inclinado con tapón de rosca de 16X150 mm con medio de cultivo de Fapa-Dextrosa-Agar (PDA).

#### Medio de cultivo para la Obtención del Inóculo.

Para obtener el inóculo se crecieron los microorganismos en placas de PDA, sembradas por estria e incubadas a 29°C durante 6 días, tiempo en que han esporulado. Este medio de cultivo se sustituyó por el Medio "A" en el que los microorganismos produjeron mayor cantidad de esporas facilitando la obtención del inóculo. Este medio de cultivo fue formulado en el laboratorio a base de maíz quebrado, tamizado en malla # 20:

#### MEDIO "A":

Maiz quebrado tamizado	40.0g
Agar-Agar	20.0g
Solución Salina	40,0ml
Agua Destilada	1000,0ml

## Composición de la solución salina:

$K_2HPO_4$	13.48	g/l
$KH_2PO_4$	16.63	g/l
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5	g/l
Soln. Elem. Traza	1.0	ml/l

## Solución de elementos traza

reportada por Ceferi (13):

$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	439.0	mg/l
$Fe(NO_3)_2$	723.0	mg/l
$MnSO_4 \cdot 7H_2O$	203.0	mg/l

El inóculo empleado consistió de una suspensión de esporas en la solución salina con una densidad óptica de 0.06, leída a 540nm en un espectrofotómetro Bausch & Lomb, Spectronic 21.

**Medio de Cultivo Sólido para Producción de Lipasas (Medio "B").**

En todos los casos, las lipasas se obtuvieron del cultivo de los microorganismos en salvado de trigo que fue usado como única fuente de carbono y de nitrógeno, adicionando además una solución de sales diseñada en el laboratorio, tomando en consideración el tipo de sales que han sido reportadas en la bibliografía como necesarias para la producción de lipasas en medios líquidos. Este medio sólido fue establecido en el laboratorio, de la manera siguiente:

Salvado de trigo 20.0g

Solución salina 20.0ml

Todas las fermentaciones se efectuaron en matraces Erlenmeyer de 250ml e incubadas a 29°C en incubadora de ambiente controlado New Brunswick Scientific.

TABLA IX

MICROORGANISMOS EMPLEADOS PARA ANALIZAR SU PRODUCCION DE  
LIPASAS EN FERMENTACION SEMISOLIDA

Microorganismos	Origen
<i>Aspergillus oryzae</i> -SS	Colección IIBM-UNAM
<i>Aspergillus niger</i>	Colección IIBM-UNAM
<i>Geotrichum candidum</i> -LL	Lacto Lab
<i>Geotrichum candidum</i>	C. E. L.
<i>Mucor miehei</i>	Colección IIBM-UNAM
<i>Penicillium blanc</i>	G. Roger Co.
<i>Penicillium camemberti</i>	CNRZ
<i>Penicillium candidum</i>	G. Roger Co.
<i>Penicillium caseicolum</i>	Facultad de Química, UNAM
<i>Penicillium chrysogenum</i> -IAM	Lacto Lab
<i>Penicillium chrysogenum</i> -SS	Colección IIBM-UNAM
<i>Penicillium glaucum</i>	Lacto Lab
<i>Penicillium roqueforti</i> -CNRZ	CNRZ
<i>Penicillium roqueforti</i> -LL	Lacto Lab
<i>Penicillium roqueforti</i> -Milano	C. E. L.
<i>Penicillium roqueforti</i> -I	Aislado de Queso Cabrales
<i>Penicillium roqueforti</i> -II	Aislado de Queso Cabrales
<i>Rhizopus arrhizus</i>	CINVESTAV
<i>Rhizopus delemar</i>	Facultad de Química, UNAM

IIBM  
CINVESTAV

Inst. de Investigaciones Biomédicas, UNAM  
Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados,  
IPN

Lacto Lab  
CNRZ

Laboratorios Lácticos, Francia  
Centro Nacional de Investigación Zoológica,  
Francia

G. Roger Co.  
C. E. L.

Laboratorios G. Roger, Francia  
Centro Experimentale Lattero, Milano, Italia.

El medio de cultivo "B" se ajustó a un pH de 7.0 mediante la adición de un amortiguador de fosfatos (pH 7.0, 0.02M) incluido en la solución salina y un contenido de humedad cercano al 50%. El tiempo de incubación para los experimentos de selección del microorganismo fue de 6 días, debido a que en este tiempo se observó el comienzo de la esporulación en las cepas usadas; en los experimentos para analizar las curvas de producción de enzimas durante el tiempo de cultivo, se cosechó un matraz cada 24 horas durante 11 días.

#### **Obtención del Extracto Enzimático Crudo.**

Para obtener el extracto enzimático crudo, se adicionaron 50 ml de una solución amortiguadora de succinatos (0.02M, pH 6.0) al cultivo ya crecido; el cual fue agitado y guardado a 4°C por 12 hr; posteriormente se separó la masa de sustrato filtrando con ayuda de gasa, obteniéndose el extracto enzimático crudo en tubos de ensaye de 20X150mm.

#### **MÉTODOS ANALÍTICOS**

##### **Medición del pH del Medio "B".**

Para medir el pH del Medio "B" se tomaron muestras de 4.0g de medio sólido fermentado que se resuspendieron en 20 ml de agua destilada. Luego de agitar durante 20 minutos, se midió el pH en un potenciómetro Beckman digital modelo 3500.

##### **Análisis del Contenido de Humedad del Medio "B".**

En la medición del contenido de humedad se utilizaron vasos de precipitados de 100 ml, puestos a peso constante. En ellos,

se tomó una muestra de peso conocido del medio "B" húmedo, para secarse a  $60^{\circ}\text{C}$  en estufa de vacío Thelco mod. 19. Luego de dejar enfriar en desecador, se pesaron en balanza analítica Sartorius 2432; con los datos obtenidos se calculó el porcentaje de humedad.

#### Determinación de la Actividad Lipolítica.

La actividad lipolítica fue medida de acuerdo a la técnica reportada por Hoffelman (27) modificando la forma de cuantificar la acidez generada, que en el presente trabajo consistió en observar el cambio de pH en el sistema de reacción que contenía:

12.5 ml de amortiguador de succinatos (0.02M, pH 6.0)

1.0 ml de tributirina como sustrato para las enzimas y

1.0 ml de extracto enzimático crudo,

la mezcla de reacción se agitó con una barra magnética para obtener una pseudocemulsión, manteniendo la temperatura a  $37^{\circ}\text{C}$  en un baño de agua.

Los valores obtenidos fueron interpolados en una curva patrón de pH contra concentración de ácido butírico (Figura 2), observando el cambio de pH al adicionar cantidades crecientes de ácido butírico a un sistema con el mismo amortiguador de succinatos (0.02M, pH 6.0). El resultado se reporta como los micromoles de ácido butírico liberados en el tiempo de reacción por mililitro de extracto enzimático. El blanco de comparación fue un extracto de salvado de trigo que no fue inoculado, el cual no mostró actividad.

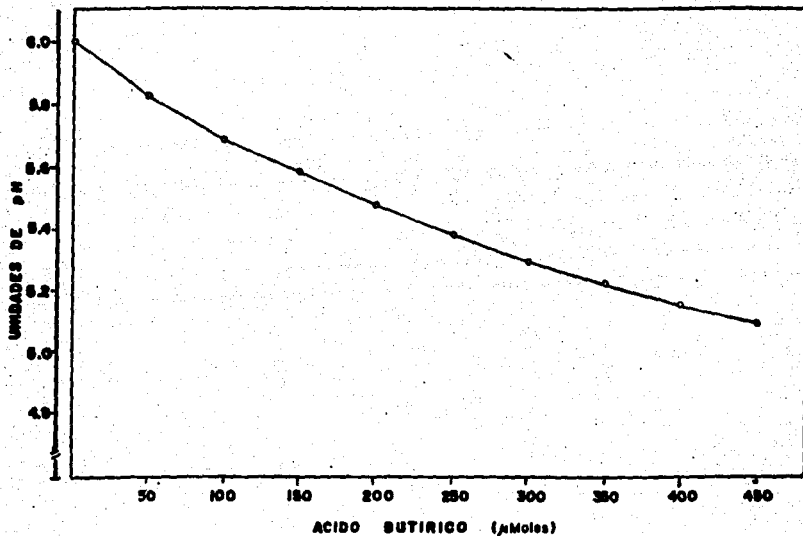


FIGURA 2. CURVA PATRON DE ACIDO BUTIRICO ADICIONADO A UN AMORTIGUADOR DE SUCCINATOS (0.02M, pH 6.0) A TEMPERATURA DE 37°C.

### Determinación de la Actividad Proteolítica.

Una parte del extracto enzimático fué dializada durante 24 horas a 4 ° C contra cuatro cambios de agua destilada con un volumen de 15 litros, en tubo para diálisis Spectrapor con un rango de exclusión de 12,000-14,000, con el fin de eliminar sales de amonio y aminoácidos libres que puedan interferir en la medición tanto de la actividad proteolítica como de la proteína extracelular.

La actividad proteolítica fue medida en un sistema de reacción que contenía:

2.0 ml de una solución de caseína al 2% en amortiguador de fosfatos (0.2M, pH 7.0), y 1.0 ml de extracto enzimático dializado. La reacción fue llevada a cabo en baño de agua a 37 ° C durante 30 minutos y fue detenida mediante la adición de 4 ml de ácido tricloroacético al 5%.

Posteriormente, los tubos de reacción se centrifugaron a 6500 rpm en una centrifuga Lourdes modelo AA-C, durante 15 minutos con el propósito de separar la proteína no hidrolizada. En el sobrenadante fue medida la cantidad de tirosina liberada por acción enzimática, utilizando el método de Lowry et al (41) para la cuantificación de proteína, el cual se describe posteriormente. Los datos obtenidos fueron interpolados en una curva patrón de tirosina (Figura 3).

### Cuantificación del Contenido de Proteína Extracelular

La cuantificación de proteína extracelular se realizó siguiendo el método de Lowry et al (41). Para lo cual



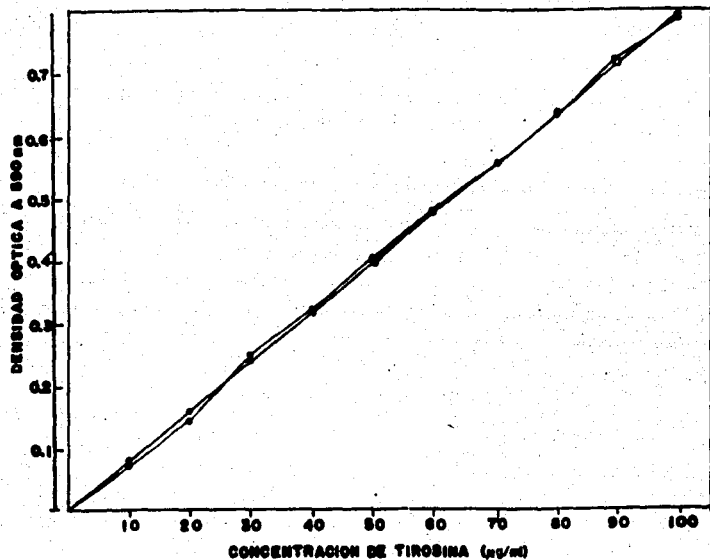


FIGURA 3. CURVA PATRON DE TIROSINA  
(●) CURVA EXPERIMENTAL  
(○) CURVA TEORICA CON UN FACTOR DE CORRELACION  
 $r=0.999$  Y PENDIENTE  $0.00797$ .

se prepararon dos soluciones:

**Solución A:**

Solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 2% en NaOH 0.1 N

Solución de tartrato de Na y K al 1% en agua destilada

Solución de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  al 0.5% en agua destilada

en una proporción de 10:0.1:0.1 en el orden presentado.

**Solución B:**

Reactivo de Folin-Ciocalteu diluido en agua 1:3

Las alícuotas de las muestras y de la solución patrón (de Albúmina Sérica Bovina) se llevaron a un volumen final de 1.0ml con agua destilada. Se les adicionó 5.0ml de la solución A agitando rápidamente. Se dejó reposar durante 10 minutos y se agregaron 0.5ml de la solución B. Luego de agitar rápidamente, se dejó reposar la mezcla por 30 min. Estos tubos de reacción se leyeron a 590nm en un espectrofotómetro contra un blanco de agua destilada que lleva el mismo tratamiento.

Los datos obtenidos se interpolaron en una curva patrón de Albúmina Sérica Bovina obtenida al manejar una cantidad creciente de esta proteína de la misma manera ya explicada para todas las muestras (Figura 4).

## **MODIFICACION ENZIMATICA DE CREMA DE LECHE COMERCIAL.**

### **Cinética de Lipólisis de Crema.**

Para llevar a cabo la cinética de lipólisis de crema, se utilizaron los filtrados enzimáticos de *P. candidum*, *P. camemberti* y *N. miehei*. Mediante la adición de agua destilada, se ajustó la actividad lipolítica de estos filtrados de manera

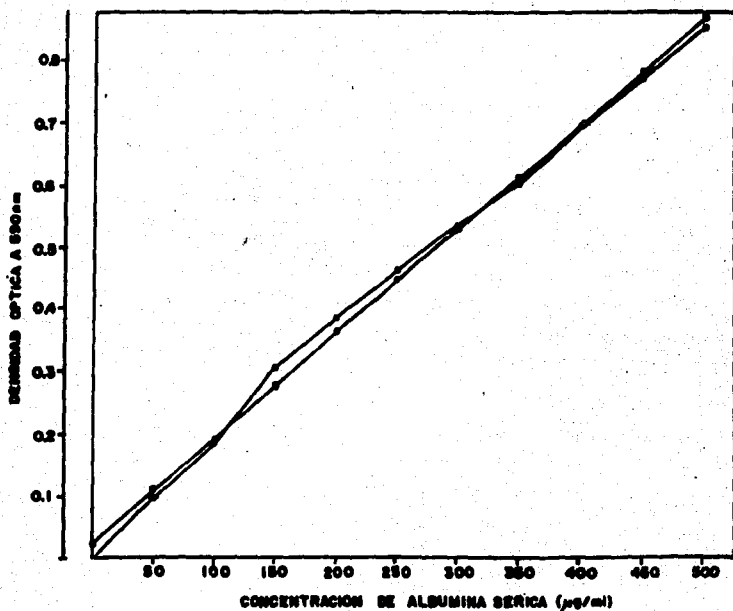


FIGURA 4. CURVA PATRON DE ALBUMINA SERICA BOVINA  
 (●) CURVA EXPERIMENTAL  
 (○) CURVA TEORICA CON UN FACTOR DE CORRELACION  
 $r = 0.997$  Y PENDIENTE  $0.0016$ .

que liberaran 5.0 micromoles de Ac. Butírico/ml min. en el sistema de reacción con tributirina. Se usaron 3.0ml de este filtrado por cada 100.0 g de crema de leche, con un contenido de grasa del 30%. La mezcla de crema y enzima se realizó en un solo lote de 200.0g de crema con la finalidad de garantizar una mezcla homogénea, la cual fue incubada a 37 °C luego de ser dividida en frascos pequeños de boca ancha, tomando 10.0g en cada uno. La acidez generada fue medida titulando las muestras con NaOH 0.1N hasta pH 7.0.

Se utilizó un control que consistió de la mezcla de 200.0g de crema con 6.0ml de agua destilada, la cual fue tratada de la misma manera que los lotes experimentales.

#### **PREPARACION DEL LIPOLIZADO DE CREMA PARA EVALUARLO EN PRUEBA PANEL DE PREFERENCIA.**

##### **Tratamiento de los Extractos Enzimáticos.**

Los extractos enzimáticos se dializaron en un volúmen de 12.0l de agua destilada durante 24 hrs con 4 cambios de agua, usando tubos para diálisis Spectrapor. Posteriormente se filtraron en papel Whatman # 1 y finalmente fueron pasados a través de membranas Millipore de un tamaño de poro de 0.45 micras. Después de este tratamiento, se les midió la actividad lipolítica con el fin de calcular el volúmen necesario para la lipólisis de crema.

##### **Lipólisis de Crema y Tratamiento del Lipolizado.**

Para la lipólisis de crema fueron empleados 800.0 g de crema mezclados perfectamente con los filtrados enzimáticos

usando un Braun Multipractic, los cuales fueron incubados a 37 °C en frascos lecheros por un tiempo determinado para cada extracto, este fue establecido en base a la acidez que generaron en el experimento anterior en el que se siguió la cinética de lipólisis de la crema de leche.

Al término de la lipólisis, las muestras presentaron 2 fases por lo que fueron homogenizadas nuevamente durante 2 min. con un Braun Multipractic, para después ser pasteurizadas a una temperatura de 72 °C durante 10 minutos y enfriadas en un baño de hielo durante 30 minutos.

Para todos los lipolizados, se tomó una muestra antes y después de pasteurizar, las cuales fueron tituladas con NaOH 0.1N hasta pH 7.0 con el fin de observar si se modifica la acidez con este tratamiento térmico.

#### **Prueba Panel de Preferencia.**

Se realizó una prueba panel de preferencia para olor y sabor de la crema lipolizada. En ella participaron 30 panelistas no entrenados a quienes se les dió las muestras de crema en vasos de plástico transparente etiquetados con un número clave para cada extracto enzimático, se les pidió contestaran los cuestionarios anexos (cuestionarios I y II).

#### **Prueba Panel de Descripción de Sabor.**

Se realizaron dos pruebas de descripción de sabor, la primera utilizando la crema lipolizada madurada en refrigeración durante 9 días y la segunda, con la misma crema pero madurada 10

días a 4°C. En ambas, participaron 11 panelistas seleccionados de entre los 30 anteriores, debido a que ellos emitieron alguna opinión en el cuestionario anterior acerca del sabor que les recordaba la crema lipolizada. Para ambas pruebas se les pidió que contestaran el cuestionario anexo III.

#### ESTABILIDAD DE LAS LIPASAS ALMACENADAS EN CONGELACION.

Los extractos enzimáticos fueron almacenados en congelación con el fin de evaluar la estabilidad de las enzimas en el tiempo de almacenamiento. Para ello, fue medida la actividad lipolítica en estos extractos mensualmente durante 3 meses.

#### COMPARACION ENTRE FERMENTACION SEMISOLIDA Y LIQUIDA PARA LA PRODUCCION DE LIPASAS.

##### Composición del Medio de Cultivo.

En estos experimentos se analizó la producción de lipasas por *F. candidum* en ambos tipos de fermentaciones. Se empleó el medio de cultivo "B" modificando las cantidades de la siguiente manera:

<u>Fermentación Semisólida.</u>		<u>Fermentación Líquida.</u>	
Salvado de trigo	10.0g	Salvado de trigo	5.0g
Inóculo (solución salina + esporas)	10.0ml	Inóculo (solución salina + esporas)	10.0ml
		Agua destilada	90.0ml

##### Condiciones de Fermentación.

Se siguió la curva de producción diaria de lipasas durante siete días para ambas fermentaciones, las cuales se realizaron

a pH inicial de 7.0, con una temperatura de 29 °C sin agitación para el caso de la fermentación semisólida y con agitación de 160 rpm para los cultivos líquidos en una cámara de ambiente controlado.

#### **Obtención del Extracto Enzimático de la Fermentación Semi-sólida.**

A los cultivos fermentados se les adicionó 90.0 ml de agua destilada, mezclándose perfectamente, después de guardarlos por 12 hrs a 4 °C fueron filtrados con ayuda de una gasa, obteniendo en tubos de ensaye de 20x150 mm, el extracto enzimático al cual fue medida la actividad lipolítica.

#### **Obtención del Extracto Enzimático de la Fermentación Líquida**

Los cultivos ya crecidos fueron guardados a 4 °C durante 12 hrs después de las cuales fueron filtrados a través de una gasa, para la posterior medición de actividad lipolítica de estos filtrados.

ANEXO I

PRUEBA DE RANGO DE PREFERENCIA

Nombre \_\_\_\_\_  
 Fecha \_\_\_\_\_

Producto: CREMA MODIFICADA Prueba de: OLOR.

Instrucciones: Pruebe las muestras en el orden presentado, de izquierda a derecha. Después de haberlas probado todas, usted puede volver a probar la muestra que desee. Enliste el número codificado de cada muestra en el orden de su preferencia. USTED DEBE ESTABLECER UN ORDEN DE PREFERENCIA. Si le gustaron las muestras ordénelas empezando por la que más le haya gustado. Si ninguna le gustó, de todas maneras ordénelas empezando por la que más prefiera. Este no es un panel de aceptabilidad.

En el renglón de observaciones le agradeceríamos indicara todas las características que pueda identificar en el producto, y que indique a qué producto lácteo le recuerda.

ORDEN DE PREFERENCIA	CODIGO	OBSERVACIONES
Primera preferencia	_____	_____ _____
Segunda preferencia	_____	_____ _____
Tercera preferencia	_____	_____ _____
Cuarta preferencia	_____	_____ _____



ANEXO II

PRUEBA DE RANGO DE PREFERENCIA

Nombre \_\_\_\_\_

Fecha \_\_\_\_\_

Producto: CREMA MODIFICADA Prueba de: SABOR.

Instrucciones: Pruebe las muestras en el orden presentado, de izquierda a derecha. Después de haberlas probado todas, usted puede volver a probar la muestra que desee. Enliste el número codificado de cada muestra en el orden de su preferencia. USTED DEBE ESTABLECER UN ORDEN DE PREFERENCIA. Si le gustaron las muestras ordénelas empezando por la que más le haya gustado. Si ninguna le gustó, de todas maneras ordénelas empezando por la que más prefiera. Este no es un panel de aceptabilidad.

En el renglón de observaciones le agradeceríamos indicara todas las características que pueda identificar en el producto, y que indique a qué producto lácteo le recuerda.

ORDEN DE PREFERENCIA	CODIGO	OBSERVACIONES
Primera preferencia	_____	_____ _____
Segunda preferencia	_____	_____ _____
Tercera preferencia	_____	_____ _____
Cuarta preferencia	_____	_____ _____

ANEXO III

DESCRIPCION DE SABOR DE CREMA MODIFICADA

INSTRUCCIONES:

- 1) Favor de leer el cuestionario antes de probar las muestras
- 2) Probar las muestras en el orden presentado
- 3) Llenar el cuestionario. Favor de no indicar ninguna cualidad relacionada con olor o textura.

SECCION I:

Favor de marcar con una cruz en cada muestra el sabor del producto lácteo que le recuerde cada muestra. SOLO MARCAR UNA OPCION PARA CADA CASO.

Número de muestra	_____	_____	_____	_____
Queso	_____	_____	_____	_____
Mantequilla	_____	_____	_____	_____
Crema	_____	_____	_____	_____
Yogur	_____	_____	_____	_____

SECCION II:

Señalar con una cruz las cualidades que percibe en cada muestra:

Número de muestra	_____	_____	_____	_____
Amargo	_____	_____	_____	_____
Rancio	_____	_____	_____	_____
Acido	_____	_____	_____	_____
Jabonoso	_____	_____	_____	_____
Picante	_____	_____	_____	_____
Otra	_____	_____	_____	_____

SECCION III:

En general, el producto le resulta:

Agradable	_____	_____	_____	_____
Desagradable	_____	_____	_____	_____

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Formulación del Medio "B" y Establecimiento de las Condiciones de Cultivo.

La formulación del medio "B" utilizado para la producción de lipasas fue establecida en base a formulaciones existentes en bibliografía para la obtención de lipasas en fermentaciones líquidas, debido a la falta de literatura al respecto, para fermentaciones semisólidas. En estas composiciones de medios de cultivo, se han incluido diferentes tipos de sales, sin embargo, el fosfato de potasio, sulfato de magnesio y nitrato de sodio han sido mayormente empleadas (53, 19, 16, 17), de tal forma que fueron incluidas en el medio "B", a excepción del nitrato de sodio ya que el salvado de trigo fue empleado como única fuente de carbono y de nitrógeno. De la misma manera, son necesarios los elementos como el Zn, Fe, y Mn, los cuales fueron adicionados en cantidades traza (19, 53).

Las condiciones de pH y Temperatura del cultivo también fueron elegidas en base a bibliografía. Para algunos microorganismos, las condiciones óptimas son de 29 °C y pH de 7.0 mientras que para algunos otros, se obtiene una producción no menor del 85% con respecto del nivel máximo alcanzado (19, 63).

Para lograr un pH 7.0 en el medio de cultivo fue necesario incluir un amortiguador de fosfatos (0.2M, pH 7.0), así como esterilizar por separado el salvado de trigo y la solución salina,

ya que al esterilizarlos juntos, se observaron fuertes cambios de pH aún cuando se emplearon amortiguadores de pH mas elevados, lo cual pudo ser originado por la liberación de azúcares reductores contenidos en el salvado de trigo. Con estas consideraciones se logró conservar el pH muy cercano a 7.0 como puede verse en la Tabla X.

Cuando se evaluó la capacidad del salvado de trigo para absorber agua, se observó que 10.0 g de salvado esterilizado retuvieron una cantidad de agua de 30.0 ml que corresponden a un 74.4% de humedad (Figura 5B), sin presentarse agua libre en el sistema. Sin embargo, para el salvado no esterilizado, el agua libre ya fue aparente a partir de este nivel de humedad, por lo que éste se consideró como el límite de humedad para ser empleado en la fermentación.

Se midió el volumen específico para el salvado esterilizado observándose que disminuye de acuerdo a la cantidad de agua adicionada (en el intervalo de humedad manejado). En base a ello, se decidió emplear un sistema con un contenido de humedad del 50% con el cual se obtuvo el mayor volumen específico que fue de  $75 \text{ cm}^3 / 10 \text{ g}$  de salvado (Figura 5A), ya que se consideró que en estas condiciones, el sistema presentaría mejores características de aereación a la vez que permitiría la penetración del micelio para la colonización completa de la masa de sustrato. A diferencia del sistema con un volumen específico de  $55 \text{ cm}^3 / 10 \text{ g}$  de salvado, en el cual se observó una fuerte compactación del salvado por lo que el crecimiento de los microorganismos estaría limitado a la superficie externa del sustrato.

TABLA X

pH FINAL DEL MEDIO DE CULTIVO 'B' ANTES Y DESPUES  
DE ESTERILIZAR

	pH antes de esterilizar	pH después de esterilizar
Medio Completo	6.0	6.0
	7.0	6.30
	8.0	6.50
Medio Separado	6.0	6.33
	7.0	6.93
	8.0	7.20

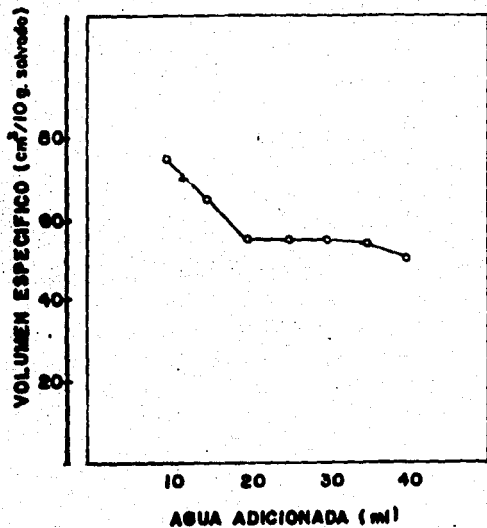


Figura 5A. VOLUMEN ESPECIFICO DEL SALVADO NO ESTERILIZADO CON DIFERENTE CONTENIDO DE AGUA.

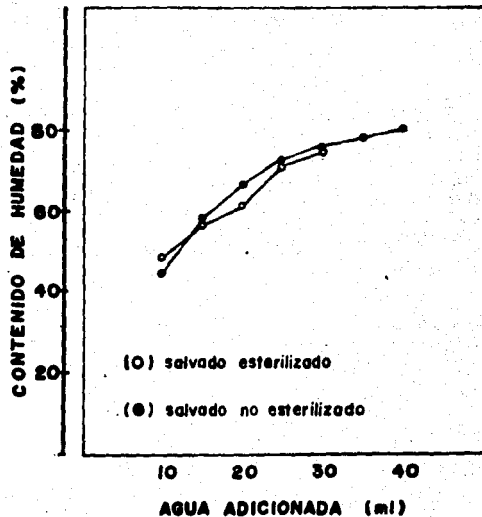


Figura 5B. CONTENIDO DE HUMEDAD DEL SALVADO (10 g) CON DIFERENTE CANTIDAD DE AGUA.

## Selección de los Microorganismos para la Producción de Lipasas.

Se estudiaron 19 cepas de hongos filamentosos de especies reportadas en Bibliografía como productores de lipasas, y se seleccionaron aquellas que presentaran alta producción de lipasas y baja producción de proteasas, debido a que éstas últimas generan sabores no deseados cuando se emplean en la modificación de sustratos lácteos.

En la figura 6 se presentan los resultados obtenidos cuando esos microorganismos fueron crecidos en el medio "B" durante 6 días incubados a 29°C. Se muestra la actividad lipolítica a un tiempo de reacción de 15 minutos, así como la actividad proteolítica sobre caseína y el contenido de proteína extracelular. Puede observarse que *F. candidum*, *M. miehei* y *P. camemberti* presentaron la máxima actividad lipolítica, liberando 543.0, 380.1 y 366.4 micromoles de ac. butírico/ml respectivamente, en las condiciones de reacción ya mencionadas; los coeficientes de variación calculados para todas las mediciones de actividad lipolítica siempre fueron menores del 6.0%. Se puede observar que *P. candidum* generó 2.33 veces la actividad mostrada por *P. chrysogenum*-SS, que presentó una actividad lipolítica de 233.5 micromoles de ac. butírico/ml, siendo este el cuarto microorganismo mejor productor.

Para los tres extractos enzimáticos con mayor actividad lipolítica, la actividad proteolítica que mostraron fue muy baja, siendo de 2.79, 2.44 y 2.32 mg de tirosina/ml para *M. miehei*, *P. camemberti* y *P. candidum* respectivamente.

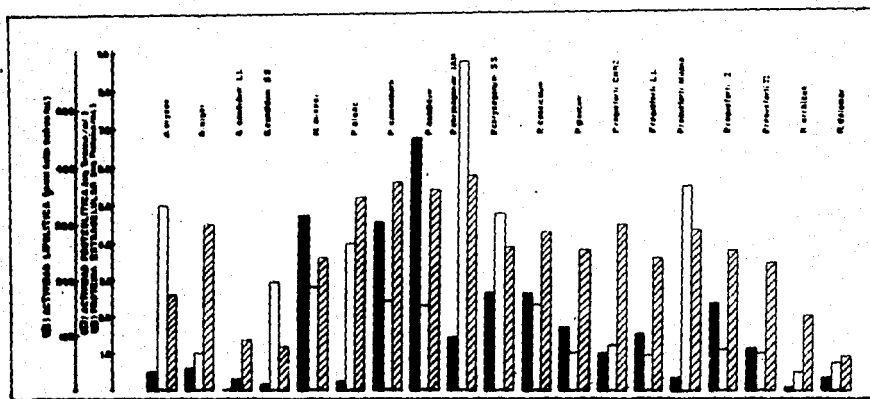


Figura 6. PRODUCCION DE LIPASAS, PROTEASAS Y PROTEINA EXTRACELULAR POR LOS MICROORGANISMOS CRECIDOS EN EL MEDIO "B", A 37°C, EN 6 DIAS DE FERMENTACION.

■ LIPASAS  
 □ PROTEASAS  
 ▨ PROTEINA EXTRACELULAR



La actividad proteolítica presentada por *M. miehei* fue 3.15 veces menor que el presentado por *P. chrysogenum*-IAM, que fue el microorganismo con la actividad proteolítica mas alta, liberando 8.79 mg de tirosina/ml. Además de *P. chrysogenum*-IAM, otras cuatro cepas mostraron mayor actividad proteolítica que la observada en *M. miehei*, *P. camemberti* y *P. candidum*. En estas mediciones, el coeficiente de variación fue inferior al 9.0%.

Por otro lado, con los datos de proteína extracelular se calculó la actividad específica de los extractos enzimáticos, estos valores se muestran en la tabla XI; la cual muestra que *M. miehei*, *P. candidum* y *P. camemberti* presentaron la mayor actividad lipolítica específica, esto puede sugerir un alto nivel de pureza de las lipasas dentro del espectro de proteínas secretadas al medio. Además, para estos microorganismos se calcularon valores de actividad proteolítica específica razonablemente bajos, lo cual representa una ventaja para emplear estos extractos enzimáticos en la modificación de sustratos lácteos, debido a que una alta actividad proteolítica genera sabores no deseables en el producto.

En los casos en que se obtuvieron valores de actividades específicas bajos, como en el caso de *Rizopus arrhizus* y *Geotrichum candidum*, puede afirmarse que posiblemente las lipasas y proteasas fueron secretadas en baja proporción en relación a otro tipo de enzimas no analizadas, como pueden ser las enzimas amilolíticas.

TABLA XI

ACTIVIDADES ENZIMATICAS ESPECIFICAS MOSTRADAS POR  
LAS 19 CEPAS DE MICROORGANISMOS EMPLEADAS

Microorganismo	Actividad específica	
	LIPOLITICA mol ac. but./mg proteína	PROTEOLITICA mg tirosina/mg prot.
<i>Aspergillus oryzae</i>	15.64	1.95
<i>A. niger</i>	10.80	0.22
<i>Geotrichum candidum</i> -LL	2.0	0.23
<i>G. candidum</i> -SS	11.53	0.25
<i>Mucor miehei</i>	104.13	0.76
<i>Penicillium blanc</i>	3.60	0.76
<i>P. camemberti</i>	62.20	0.43
<i>P. candidum</i>	101.11	0.43
<i>P. caseicolum</i>	49.03	0.53
<i>P. chrysogenum</i> -IAM	19.46	1.50
<i>P. chrysogenum</i> -SS	59.41	1.22
<i>P. glaucum</i>	35.54	0.27
<i>P. roqueforti</i> -CNRZ	17.99	0.27
<i>P. roqueforti</i> -LL	34.03	0.26
<i>P. roqueforti</i> -Milano	6.24	1.26
<i>P. roqueforti</i> -I	49.76	0.28
<i>P. roqueforti</i> -II	26.62	0.28
<i>Rhizopus arrhizus</i>	3.20	0.41
<i>R. delemar</i>	32.11	0.81

Es importante señalar la dificultad de establecer comparaciones entre los datos aquí obtenidos y aquellos disponibles en bibliografía debido a que no hay homogeneidad en la presentación de los mismos, asimismo, cada autor reporta actividades enzimáticas de muy distinta manera y las condiciones de medición de las enzimas son diferentes unas de otras.

#### **Cinéticas de Hidrólisis de Tributirina.**

Para todos los microorganismos se siguió la cinética de hidrólisis de tributirina en las condiciones de reacción ya mencionadas, con el fin de establecer el tiempo de reacción a considerarse en todas las mediciones posteriores.

En la Figura 7, se muestran las cinéticas obtenidas para las tres cepas de mayor producción de lipasas, en donde puede verse que a los 15 minutos la cinética de reacción de estas enzimas aunque ya no están en velocidad inicial, sí dan valores altos de actividad lo cual es un indicio de que estas enzimas aún no se ven afectadas por el cambio de pH provocado por el incremento en la concentración de ácido butírico liberado a partir de la tributirina, ni se encuentra limitada por sustrato, por esta razón, se decidió tomar este tiempo para la realización de las mediciones de actividad lipolítica.

Al final de estos experimentos se seleccionaron las cepas de *P. candidum*, *M. miehei* y *F. camemberti* ya que presentaron las mas altas actividades lipolíticas así como actividades proteolíticas razonablemente bajas en relación a las demás cepas de microorganismos utilizadas.

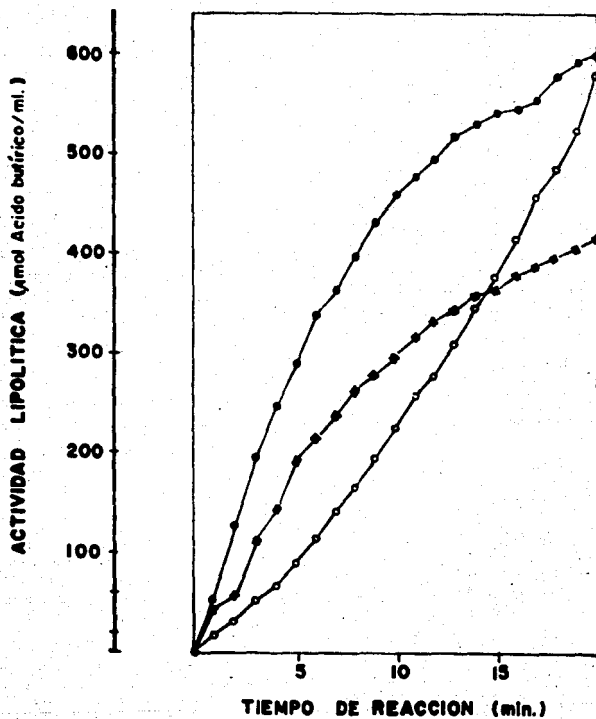


Figura 7. CINETICAS DE HIDROLISIS DE TRIBUTIRINA POR LOS FILTRADOS ENZIMATICOS DE: *P. candidum* (●); *P. camemberti* (■); *H. miehei* (○); BAJO LAS CONDICIONES DE REACCION YA MENCIONADAS.

### Curvas de Producción de Enzimas.

El seguimiento de las curvas de producción de enzimas se realizó con el fin de manejar como otro criterio de selección la productividad de enzima de los tres microorganismos preseleccionados; es decir, su producción por unidad de tiempo de fermentación, buscando la mayor producción en el menor tiempo posible. Para ello, los microorganismos fueron crecidos en el medio "B" de la forma ya descrita, tomando muestras cada 24 horas durante 11 días.

Los resultados se muestran en las Figuras 8, 9 y 10. En donde se observa que los cultivos de *P. candidum* y *F. camemberti* mostraron comportamientos muy semejantes. En ambos cultivos la producción tanto de actividad lipolítica como proteolítica, comenzó a partir de las 48 horas. La actividad lipolítica mostró incrementos muy grandes hasta las 144 horas, habiendo generado estos microorganismos 692.32 y 678.5 micro-moles de  $\text{ac. but./ml}$  respectivamente, en tanto que la actividad proteolítica mostró incrementos considerables hasta las 120 horas, habiendo generado 2.71 y 2.56 mg tirosina/ml respectivamente. En el caso del contenido de proteína extracelular, se observó que el medio en sí, contiene una cantidad notoria de proteína (aproximadamente 1.0 mg/ml), la cual se incrementa desde las 72 horas, hasta un máximo a las 120 horas, manteniéndose en este nivel casi hasta el final del cultivo y mostrando un incremento hacia las últimas 24 horas.

El cultivo de *M. miehei* (figura 10) mostró un comportamiento particular; la producción de actividad lipolítica comenzó

después de las primeras 24 horas, presentando un incremento de manera casi constante hasta los 10 primeros días de fermentación sin que se observara un cambio drástico en el patrón de producción. La proteína extracelular también mantuvo un incremento continuo sin presentar cambios considerables durante todo el curso de la fermentación. Sin embargo, la actividad proteolítica comenzó a producirse a las 24 horas, presentando un nivel máximo de 2.94 mg tirosina/ml a las 168 horas y decayendo hacia el final del cultivo.

Estos resultados demuestran que el tiempo óptimo de cultivo para la obtención de lipasas es de 144 horas para los tres microorganismos, ya que el incremento posterior no es significativo en relación al tiempo necesario para lograrlo. En este tiempo, la actividad lipolítica específica fue de 161.75, 162.71 y 221.92 micromoles ác. but./mg de proteína para *P. candidum*, *P. camemberti* y *M. miehei* respectivamente; los valores de actividad proteolítica específica calculados fueron de 0.63, 0.61 y 1.10 mg tirosina/mg proteína respectivamente. Se observa que para *P. candidum* y *P. camemberti* se obtuvieron valores muy semejantes, difiriendo mucho de aquellos calculados para *M. miehei* que mostró ambas actividades enzimáticas específicas muy elevadas, lo cual sugiere que la fracción de estas enzimas en relación al total de proteína extracelular es mayor en *M. miehei* que en los otros 2 organismos. Por otro lado, el criterio de productividad de enzimas no permitió seleccionar alguno de los microorganismos empleados ya que no mostraron una diferencia importante, por lo que se decidió evaluarlos en base a su capacidad para lipolizar una crema comercial de leche.

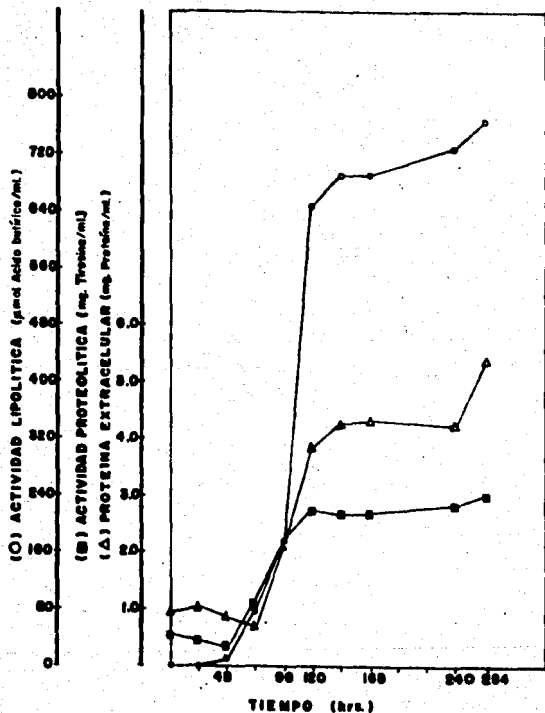


Figura 8. CURVAS DE PRODUCCION DE ACTIVIDAD LIPOLITICA (O); ACT. PROTEOLITICA (■) Y PROTEINA EXTRACELULAR (Δ) POR *P. candidum* CRECIDO EN EL MEDIO "B" A 25°C.

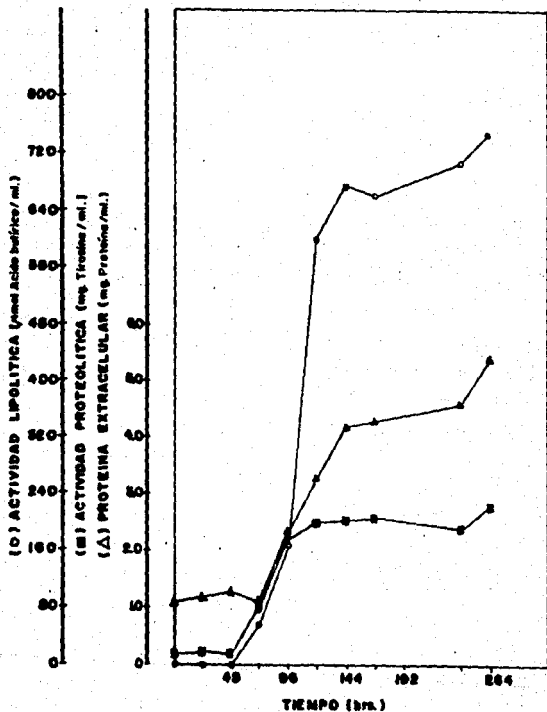


Figura 9. CURVAS DE PRODUCCION DE ACTIVIDAD LIPOLITICA (O); ACT. PROTEOLITICA (■) Y PROTEINA EXTRACELULAR (Δ) POR *P. camemberti* CECIDO EN EL MEDIO "B" A 29°C.



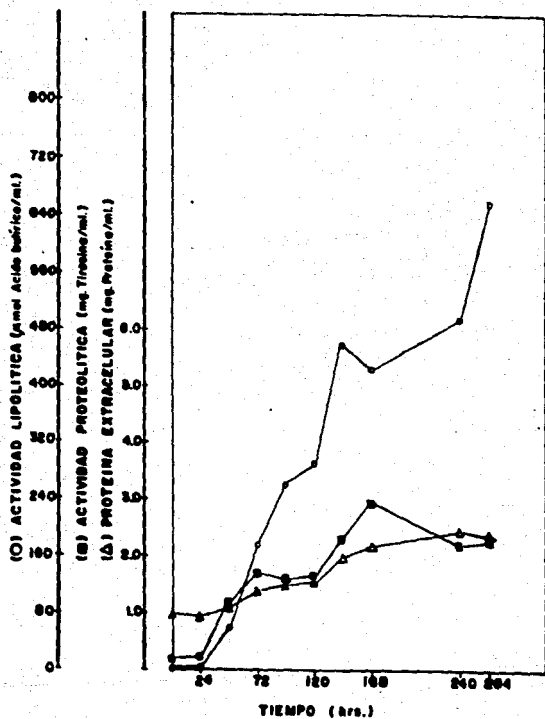


Figura 10. CURVAS DE PRODUCCION DE ACTIVIDAD LIPOLITICA (○); ACT. PROTEOLITICA (■) Y PROTEINA EXTRACELULAR (△) POR *H. michei* CRECIDO EN EL MEDIO "B" A 29°C.

### Cinéticas de Lipólisis Enzimática de Crema Comercial.

Para el seguimiento de las cinéticas de lipólisis enzimática de crema, se igualó la actividad lipolítica en los extractos empleados en estos experimentos, utilizando diferentes volúmenes de ellos, y llevándolos a un volumen final de 3.0 ml mismos que se usaron para modificar 100 g de crema. En estos extractos se calculó una actividad de 5.0 micromoles de ácido butírico/ml min., para ello, se requirió de los volúmenes de extracto enzimático presentados en la Tabla (XII). Observándose que la menor cantidad de extracto adicionado fue para el caso de *P. candidum*; existiendo una diferencia notoria en relación a la cantidad empleada para *M. miehei*.

Bajo estas condiciones se realizaron las cinéticas de lipólisis enzimática de crema, la cual fue medida titulando la acidez generada en las muestras, con una solución de NaOH 0.1N, los resultados obtenidos son presentados en la Figura II. Puede observarse que la acidez generada por las muestras del control (sin adición de enzimas), es muy baja en relación a aquella generada en los sistemas adicionados con enzimas.

Las enzimas de *P. candidum* y *M. miehei* generaron una alta acidez en las primeras 48 horas de incubación, llegando a una acidez máxima titulable con 9.0 ml de NaOH 0.1N. Las enzimas de *P. camemberti* también mostraron alta actividad al inicio de la incubación, pero la velocidad de lipólisis de crema fue menor, de la misma manera, los títulos de acidez generada por este microorganismo son menores, alcanzando un máximo titulable con 7.2 ml de NaOH 0.1N a las 48 horas.

TABLA XII

## VOLUMENES DE FILTRADO PARA LIPOLIZAR CREMA DE LECHE

Microorganismos	Actividad Lipolítica		Vol. de Filtrado 100 g de Crema	Vol. de Agua 100 g Crema
	A	B		
<i>P. candidum</i>	548.4	36.5	0.40	2.60
<i>P. camemberti</i>	426.4	28.4	0.51	2.49
<i>M. miehei</i>	325.8	21.7	0.67	2.33

A: Expresada en micromoles A. Butírico/ml liberados en 15 min.

B: Expresada en micromoles A. Butírico/ml liberados en 1 min.

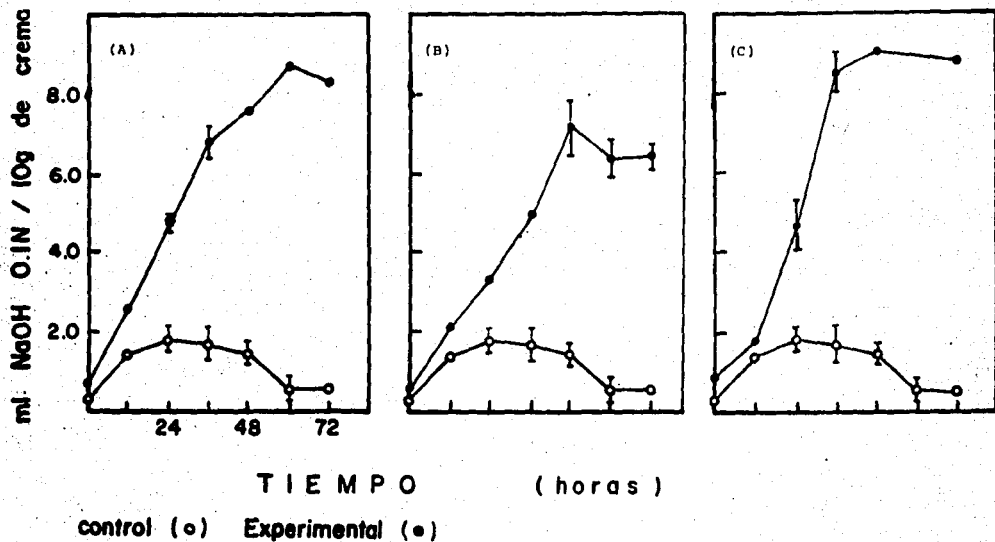


Figura 11. CINÉTICAS DE LIPOLISIS ENZIMÁTICA DE CREMA DE LECHE  
 POR *P. candidum* (A); *P. camemberti* (B); *Y.H. michelii*  
 (C); A 37°C.

En este sentido, los mejores extractos enzimáticos para la lipólisis de crema, fueron aquellos obtenidos de *F. candidum* y *M. miehei* ya que generaron mayor acidez en menor tiempo de incubación, sin embargo, la diferencia entre los tres microorganismos empleados no es muy obvia, considerando que para *P. camemberti* se utilizó menor cantidad de extracto enzimático que el utilizado para *M. miehei*. Después de estos experimentos, se decidió realizar una prueba panel de preferencia de los productos lipolizados, considerando los extractos enzimáticos de estos tres microorganismos.

#### **Pruebas Panel de Preferencia de Crema Lipolizada.**

Los resultados anteriores fueron la base para elegir los tiempos de incubación requeridos para obtener muestras de crema lipolizada que presentaran una acidez similar, esta consideración fue hecha con el fin de evitar que en la evaluación sensorial influyera el tener cremas lipolizadas con diferente nivel de acidez. En la Tabla (XIII) se presentan las condiciones en que fueron usadas las muestras para la realización de la prueba panel de preferencia. Cabe destacar que el proceso de pasterización de la crema lipolizada ocasiona una pérdida de acidez, debido a la liberación de ácidos grasos volátiles.

La Figura 12 muestra los resultados de la prueba panel de preferencia para sabor y olor de la crema lipolizada. En ella se señala que los productos generados por *F. candidum* y *P. camemberti* fueron clasificados por los panelistas en los primeros órdenes de preferencia, por el contrario, la crema lipolizada por las enzimas de *M. miehei*, fue colocada en el último

TABLA XIII

## CONDICIONES DE LAS MUESTRAS PARA PANEL

Microorganismos	Tiempo de Incubación (hr)	Acidez* Observada	Acidez* después de pasteurizar
<i>P. candidum</i>	24	2.75	2.65
<i>P. camemberti</i>	30	2.85	2.55
<i>M. miehei</i>	24	4.65	4.25

\* Expresada como el gasto de NaOH 0.1N hasta la neutralización

orden de preferencia por un porcentaje muy elevado de los panelistas (50%).

En el caso de la prueba de olor, solo la crema lipolizada por *F. camemberti* mostró una tendencia a ser aceptada, ya que el 38% de los panelistas lo colocaron en primer orden. La crema lipolizada por *F. candidum*, fue colocada en tercer orden, mientras que para el producto lipolizado por *M. miehei* no fue clara una inclinación hacia algún orden de preferencia. Sin embargo, es necesario destacar que el parámetro determinante es el sabor del producto y no tanto el olor que genera.

En este sentido, no se demostró diferencia significativa entre los productos lipolizados de *F. candidum* y *F. camemberti*, pero si en relación al producto generado por *M. miehei*, el cual fue clasificado en el cuarto orden de preferencia, hecho que se explica por una presumible alta liberación de ácido butírico ya que la lipasa producida por este microorganismo libera preferentemente este ácido graso en la lipólisis de grasa de leche (5), así como por una elevada actividad proteolítica que pudo haber generado un sabor amargo.

#### Pruebas Panel de Descripción de Sabor.

Con los resultados anteriores, la elección del microorganismo más promisorio para la obtención de un producto lipolizado de sabor agradable, se centró entre *F. candidum* y *F. camemberti*, así que para poder seleccionar alguno de estos dos microorganismos, se realizaron las pruebas panel de descripción de sabor para la misma crema lipolizada pero madurada a

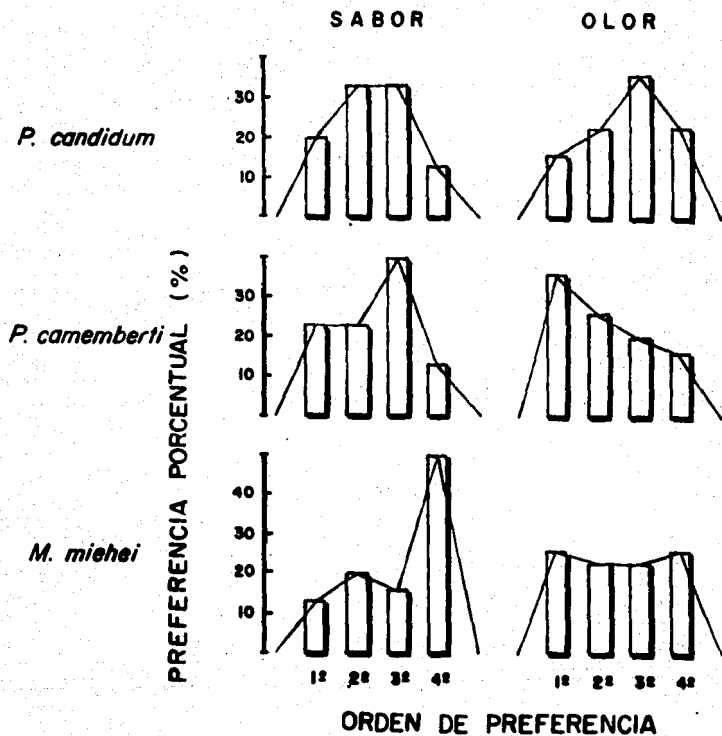


Figura 12. RESULTADOS DE LA PRUEBA PANEL DE PREFERENCIA PARA LA CREMA LIPOLIZADA.



4 C durante nueve y diez días, las cuales permitieran obtener mayor información acerca de las características de los productos obtenidos.

Las Figuras 13 y 14 muestran los resultados de estas pruebas. Como puede verse, los productos obtenidos con los filtrados de *P. candidum* y *P. camemberti* madurada por 9 días, presentaron sabor a mantequilla. Estos microorganismos generaron un producto de sabor agradable, por lo tanto, los otros atributos asignados resultan sin mucha relevancia. En estas pruebas el producto lipolizado por *M. miehei* permaneció siendo desagradable para el 90% de los panelistas.

Las muestras reposadas por 10 días (Figura 14), mostraron características similares, excepto para la obtenida por *P. candidum* en el cual se acentuó más un sabor a queso, en tanto que el obtenido por *P. camemberti* volvió a presentar el sabor a mantequilla. El producto generado por estos dos microorganismos fue agradable para un porcentaje muy elevado de los panelistas (90%), en tanto que se conservó la consideración hecha para el producto de *M. miehei* siendo desagradable para el 80% de ellos.

En base a estos resultados, los cuales se resumen en la Tabla XIV, se ha seleccionado a *P. candidum* como el microorganismo de mejores características tanto para la producción de lipasas en fermentación semisólida, como para la modificación de un producto lácteo, en este caso, crema de leche.

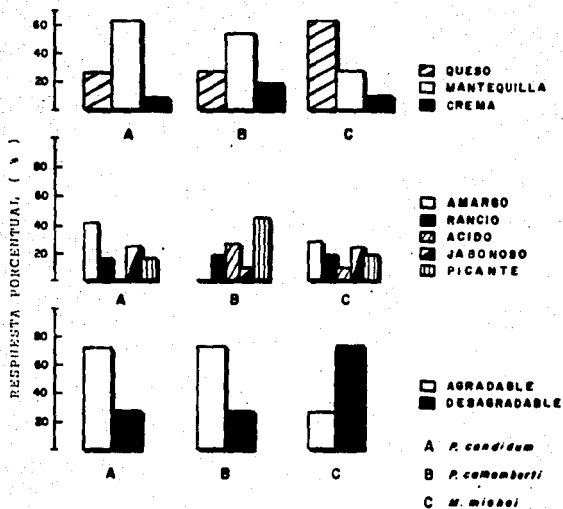


Figura 13. PRUEBA PANEL DE DESCRIPCION DE SABOR PARA CREMA LIPOLIZADA, MADURADA A 4°C POR 9 DIAS.

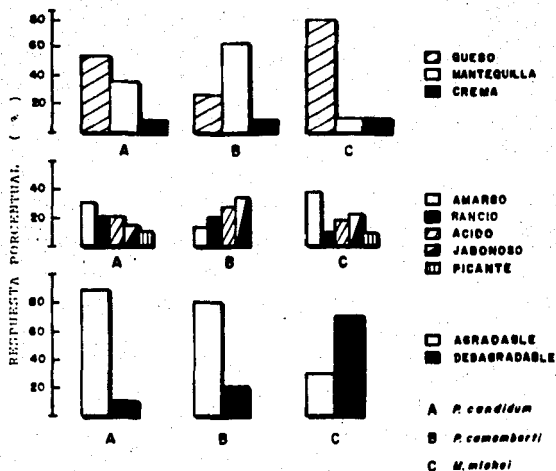


Figura 14. PRUEBA PANEL DE DESCRIPCION DE SABOR PARA CREMA LIPOLIZADA, MADURADA A 4°C POR 10 DIAS.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

TABLA XIV

CRITERIOS DE SELECCION

## ACTIVIDAD LIPOLITICA EN LOS DIFERENTES EXPERIMENTOS:

Microorganismos	Exp. Selección	Curva de producción	Lipólisis
<i>P. candidum</i>	543.0	649.6	548.4
<i>P. camemberti</i>	366.4	602.7	426.4
<i>M. miehei</i>	380.1	393.2	325.8

## CONDICIONES PARA LIPOLISIS DE CREMA:

Microorganismos	Vol. filtrado 100 g crema	Tiempo de Lipólisis	Acidez ml NaOH 0.1N
<i>P. candidum</i>	0.40 ml	24 hr	2.60
<i>P. camemberti</i>	0.51 "	30 hr	2.55
<i>M. miehei</i>	0.67 "	24 hr	4.25

## CARACTERISTICAS DEL PRODUCTO LIPOLIZADO:

Microorganismos	Características		
<i>P. candidum</i>	Queso	Amargo	Agradable
<i>P. camemberti</i>	Mantequilla	Acida	Agradable
<i>M. miehei</i>	Queso	Amargo	Desagradable

### **Estabilidad de las Lipasas en el Tiempo de Almacenamiento.**

Se evaluó la estabilidad de las enzimas al ser almacenadas en congelación durante tres meses, para los extractos enzimáticos de todas las cepas empleadas midiendo la actividad lipolítica en periodos de tiempo de un mes, sin embargo, a manera de resumen solo se presentan los resultados para los tres microorganismos de mayor producción de lipasas (Figura 15).

Los extractos enzimáticos presentaron actividad lipolítica en todo el tiempo que duró el experimento, mostrando mayor actividad después del primer mes de ser almacenadas, lo cual pudo ser originado por la descomposición de algún compuesto que pudiera estar ejerciendo un efecto inhibitorio para las enzimas.

### **Comparación Entre Fermentación Semisólida y Líquida para la Producción de Lipasas.**

Bajo la premisa de que la diferencia básica entre los sistemas de fermentación semisólida y líquida es la cantidad de agua empleada en cada una de ellas (26), se planteó un experimento final para comparar la producción de lipasas en una fermentación líquida con agitación y una fermentación semisólida estática, utilizando la misma cantidad de sustrato (5.0 g de salvado de trigo) pero con diferente contenido de agua como se explicó en material y métodos. Al término de la incubación, se igualó la cantidad de agua adicionando 90.0 ml en los cultivos semisólidos para recuperar las enzimas, de manera que la cantidad total de agua fue de 100.0 ml para ambas fermentaciones, eliminando un efecto de dilución que podría darse en los extractos enzimáticos.

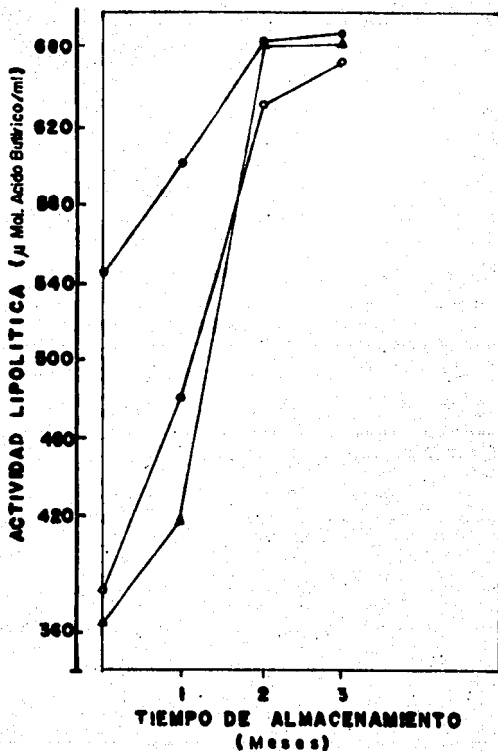


Figura 15. ESTABILIDAD DE LAS LIPASAS EN EL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO A  $-4^{\circ}\text{C}$ .

- (●) *Penicillium candidum*
- (△) *Penicillium camemberti*
- (○) *Mucor miehei*

Los resultados se muestran en la Figura 16, donde se observa que en fermentación semisólida las lipasas comenzaron a producirse a las 43 hrs alcanzando un máximo a un tiempo de 120 hrs, después del cual la producción se estabilizó. En cambio, en la fermentación líquida, la producción de lipasas comenzó a las 72 hrs obteniéndose un máximo a las 129 hrs. A partir de este tiempo, la producción disminuyó drásticamente hasta un nivel notablemente bajo (10.0 micromoles de ac. butírico/ml). Este comportamiento en la producción de lipasas es característico de una fermentación líquida y ha sido publicado por diferentes autores (15, 19, 44, 63).

Cuando se comparó la producción de enzimas extracelulares en ambos sistemas, se observó que en fermentación semisólida esta no decayó durante el tiempo de fermentación. Chahal (14), observó este fenómeno en la producción de celulasas por *Trichoderma reesei*; de la misma manera, esto se ha reportado para la producción de enzimas amilolíticas en un cultivo de *Aspergillus niger* (3). En estas publicaciones, la producción de dichas enzimas por fermentación líquida, disminuyó hacia el final de la fermentación.

Aunado a lo anterior, los títulos de lipasas obtenidos en fermentación semisólida son significativamente mayores que los observados en fermentación líquida por lo que las fermentaciones semisólidas presentan mejores perspectivas como sistemas de producción de estas enzimas.

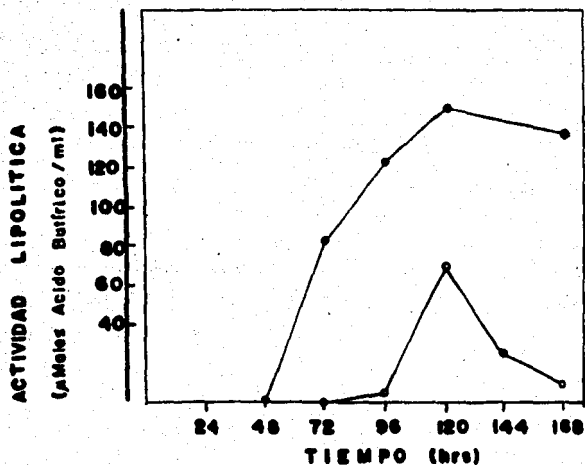


Figura 16. PRODUCCION DE LIPASAS POR *Penicillium candidum* EN UNA FERMENTACION LIQUIDA (○) CON AGITACION Y UNA FERMENTACION SEMISOLIDA (●) SIN AGITACION, EMPLEANDO SALVADO DE TRIGO COMO SUSTRATO, INCUBADAS A 29°C.



## CONCLUSIONES

- 1) El salvado de trigo utilizado en una fermentación semisólida fue capaz de retener un 74.4% de humedad sin que se presentara agua libre, mostrando mejores características de volumen específico a niveles de humedad del 50%.
- 2) El tiempo de reacción para la cuantificación de actividad lipolítica en el sistema de reacción con tributirina como sustrato fue fijado en 15 minutos ya que a este tiempo los sistemas en que se emplearon los extractos enzimáticos de *P. camemberti* y *P. candidum* dejaron de estar en velocidad inicial.
- 3) De entre un total de 19 cepas de hongos filamentosos, *P. candidum*, *P. camemberti* y *M. miehei* fueron los tres microorganismos que mostraron mejores características de producción de enzimas: alta actividad lipolítica liberando 540.0, 366.4 y 360.1 micromoles de ac. butírico/ml respectivamente, así como una relativa baja actividad proteolítica, calculada en 2.32, 2.44 y 2.79 mg de tirosina/ml, respectivamente.
- 4) En fermentación semisólida a base de salvado de trigo, empleando estos tres microorganismos, se observó que el tiempo óptimo de cultivo fue de 144 horas a 29°C, para la producción de lipasas.
- 5) Los filtrados enzimáticos obtenidos de *P. candidum* y *M. miehei* presentaron mejores características en la lipólisis de crema de leche en base a la acidez generada en el

- menor tiempo de incubación, habiendo producido una acidez titulada con 9.0 ml de NaOH 0.1N a las 48 hrs a 37<sup>o</sup> C.
- 6) La crema comercial lipolizada por los extractos enzimáticos de *M. miehei* mostró características de sabor no agradable para un porcentaje muy elevado de participantes en las tres pruebas panel realizadas.
  - 7) Los extractos enzimáticos de *P. candidum* y de *P. camemberti* generaron una crema lipolizada con sabor a queso y a mantequilla, respectivamente. Ambos productos fueron clasificados como agradables en las pruebas panel.
  - 8) Las lipasas de los extractos enzimáticos de estos microorganismos conservan su actividad por un periodo mayor a 3 meses de almacenamiento.
  - 9) Al final de estos experimentos se seleccionó la cepa de *P. candidum* debido a su alta actividad lipolítica, baja actividad proteolítica y a la generación de un producto lipolizado con las mejores características organolépticas.
  - 10) Los sistemas de fermentación semisólida presentaron mejores características para la producción de lipasas por *P. candidum* en relación a las fermentaciones líquidas, eliminándose el posible efecto de dilución.

### BIBLIOGRAFIA CITADA

- 1.- Aldoo, K. E., R. Hendry y B. Wood. (1981). Estimation of fungal growth in a solid-state fermentation system. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 12: 6-9.
- 2.- Aisaka, K. y O. Terada. (1980). Purification and properties of lipoprotein lipase from *Rhizopus japonicus*. *Agr. Biol. Chem.* 44: 799-805.
- 3.- Alazard, D. y M. Raimbault. (1981). Comparative study of amyolytic enzymes production by *Aspergillus niger* in liquid and solid-state cultivation. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 12: 113-117.
- 4.- Arnold, G. R., M. Shanani y B. Dwivedi. (1975). Application of lipolytic enzymes to flavor development in dairy products. *J. Dairy Sci.* 58(8):1127-1143.
- 5.- Auberger, B., G. Lamberet y J. Lenoir. (1983). Les activités enzymatiques de *Penicillium camemberti*. *Le Lait.* Oct.-Nov. 540-544.
- 6.- Aunstrup, K. (1979). Production, isolation and economics of extracellular enzymes. *Appl. Biochem. Bioeng.* 2(2):27-69.
- 7.- Bone, D.H. y E. Levonen-Muñoz. (1984). Solid-state fermentation of oat straw by *Polyperus sp* A-336 and the effect of added sugars. *Biotechnol. Lett.* 6(10):657-662.
- 8.- Bu'lock, J. D. (1987). Introduction to Basic Biotechnology. En: *Basic Biotechnology* (Bu'lock, J. y Kristiansen, B. eds). Academic Press, N.Y. pp 1-10.
- 9.- Brockerhoff, H. y R. Jensen. (1974). Lipases. En: *Lipolytic Enzymes*. (Brockerhoff, H. y R. Jensen, eds). Academic Press, N.Y. pp 25-175.
- 10.- Cambou, B. y A. Klivanov. (1987). Comparison of different strategies for the lipase-catalyzed preparative resolution of racemic acids and alcohols: Asymmetric hydrolysis, esterification and transesterification. *Biotech. and Bioeng.* 26:1449-1454.
- 11.- Cannel, E. y M. Moo-Young. (1980). Solid-state fermentation systems. *Procc. Biochem.* Jun.-Jul. 2-7.
- 12.- Carrizales, V., H. Rodriguez e I. Sardina. (1981). Determination of the specific growth of molds on semi-solid cultures. *Biotech. and Bioeng.* 23:321-333.

- 13.- Ceferi, E. y D. Fergus. (1971). *Mycologia* 63 (5): 1030-1045.
- 14.- Chahal, D. S. (1983). Solid state fermentation with *Trichoderma reesei* for cellulose production. *Appl. Env. Microb.* Jun. 205-210.
- 15.- Chander, H., S. Sannabhatti, J. Elias y B. Ranganathan. (1977). Factors affecting lipase production by *Penicillium chrysogenum*. *J. Food Sci.* 42(6): 1677-1678.
- 16.- Chander, H., V. Batish, D. Ghodekar y R. Srinivasan. (1981). Factors affecting lipase production in *Rhizopus nigricans*. *J. Dairy Sci.* 64:193-196.
- 17.- Chander, H., V. Batish, S. Sannabhatti y R. Srinivasan. (1980). Factors affecting lipase production in *Aspergillus wentii*. *J. Food Sci.* 45:598-600.
- 18.- Considine, P., T. Hackett y M. Coughlan. (1987). Solid-state cultivation of *Penicillium capsulatum* on beet pulp. *Biotechnol. Lett.* 9(2):131-134.
- 19.- Eitenmiller, R., R. Vakil y K. Shanani. (1970). Production and properties of *Penicillium roqueforti* lipase. *J. Food Sci.* 35:130-133.
- 20.- Fukumoto, J., M. Iwai y Y. Tsujisaka. (1964). Studies on lipase. I. Purification and crystallization of a lipase secreted by *Aspergillus niger*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 9:353-351.
- 21.- Godfrey, T. y J. Reichelt. (1983). Industrial Enzymology. The application of enzymes in industry. The Nature Press, N.Y. pp 1-7.
- 22.- Goldstein, E. W. (1987). Enzymes as bulk products. En: *Basic Biotechnology* (Bu'lock J. y B. Kristiansen eds). Academic Press, N.Y. pp 385-405.
- 23.- Han, Y. W. y A. Anderson (1975). Semisolid fermentation of ryegrass straw. *Appl. Microbiol.* 30:930-934.
- 24.- Hassing, G. S. (1971). Partial purification and some properties of a lipase from *Corynebacterium acnes*. *Biochim. et Biophys. Acta.* 242:361-394.
- 25.- Hesseltine, C. W. (1977). Solid state fermentations. *Biochem. and Bioeng.* 25:517-532.
- 26.- Hesseltine, C. W. (1977). Solid state fermentations. *Process. Biochem.* Julio-Agosto, 24-27.
- 27.- Hofelman, M., J. Hartman, A. Zink y P. Schereier. (1985). Isolation, purification and characterization of lipase isoenzymes from technical *Aspergillus niger* enzyme. *J. Food Sci.* 50:1721-1725.

- 28.- Ingham, E., K. Holland, G. Gowland y W. Cunliffe. (1981). Partial purification and characterization of lipase from *Propionibacterium acnes*. *J. Gen. Microbiol.* 124:393-401.
- 29.- Isobe, K., T. Akiba y S. Yamaguchi. (1988). Crystallization and characterization of lipase from *Penicillium cyclopium*. *Agr. Biol. Chem.* 52(1):41-47.
- 30.- Ishikawa, I., H. Okuyama, H. Ikezawa y S. Tejima. (1975). Studies on lipase from *Mucor javanicus*. I. Purification and properties. *Biochim. et Biophys. Acta.* 388:413-422.
- 31.- Jensen, R. G. (1974). Characteristics of the lipase from the mold *Geotrichum candidum*: a review. *Lipids.* 18:650-657.
- 32.- Kilara, A. (1985). Enzyme-modified lipid food ingredients. *Proc. Biochem. Abstr.* 35-45.
- 33.- Kirby, K. D. y C. Mardon. (1980). Production of fuel ethanol by solid-phase fermentation. *Biotech. and Bioeng.* 22:2425-2427.
- 34.- Kokke, R. (1977). Improvement of carob pods as feed by solid-substrate fermentation. *J. Appl. Bacteriol.* 43:303-307.
- 35.- Kornacki, K., L. Stepaniak, I. Adamic, J. Graska y K. Wrona. (1979). Characteristic of lipolytic mould preparations as compared to hog pancreas lipase. *Milchwissenschaft.* 34(6):340-343.
- 36.- Kumar, P. K. y B. Lonsane. (1987). Gibberelic acid by solid state fermentation: Consistent and improved yields. *Biotechnol. and Bioeng.* 30:267-271.
- 37.- Lamberet, G. y J. Lenoir. (1976). Les caractères du système lipolytique de l'espèce *Penicillium caseicola*. Purification et propriétés de la lipase majeure. *Le Lait.* Nov.-Dic. 522-644.
- 38.- Lindenfelser, L. A. y A. Ciegler. (1975). Solid substrate fermentor for ochratoxin "A" production. *Appl. Microb.* 29:323-327.
- 39.- Liu, W. H., T. Beppu y K. Arima. (1973). Substrate specificity and mode of action of the lipase of thermophilic fungus *Humicola lanuginosa* S-38. *Agr. Biol. Chem.* 37:1349-1355.
- 40.- Lockwood, L. B. (1975). Organic acid production. En: *Filamentous Fungi* Vol. I (Smith, J. E. y D. Berry eds). Londres, 140-157.
- 41.- Lowry, O. J., Nira, A. Rosebrough, A. Lewis y R. Randall. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.

- 42.- Macrae, A. R. (1983). Extracellular microbial lipases. En: *Microbial Enzymes and Technology* (Fogarty, W. ed.) Applied Science, Londres. pp 225-250.
- 43.- Macrae, A. R. y A. Hammond. (1985). Present and future applications of lipases. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 3:193-217.
- 44.- Maheva, E., G. Djelveh, C. Larroche y J. Gros. (1984). Sporulation of *Penicillium roqueforti* in solid substrate fermentations. *Dev. Ind. Microb.* 23: 327-405.
- 45.- Marlet, C., G. Langrand, C. Triantaphylides y J. Baratti. Esther synthesis in organic solvent catalyzed by lipases immobilized on hydrophilic supports. (1985). *Biotechnol. Lett.* 7(9):647-650.
- 46.- Matcham, S. E., E. Jordan y D. Wood. (1985). Estimation of fungal biomass in a solid-substrate culture by three independent methods. *Appl. Microb. Biotech.* 21: 106-112.
- 47.- Matos, R. J., B. West y C. Wong. (1987). Lipase catalyzed synthesis of peptides: preparation of a penicillin G precursor and other peptides. *Biotechnol. Lett.* 9(4):232-236.
- 48.- Menassa, A. y G. Lambert. (1982). Contribution a l'etude du système lipolytique de *Penicillium roqueforti*. *Le Lait*. 62:32-47.
- 49.- Meyrath, J. (1966). *Process Biochem.* 1(4):274-276
- 50.- Moo-Young, M., R. Moreira y R. Tengerdy. (1983). Principles of solid-substrate fermentation. En: *The filamentous fungi* Vol. IV. (J. Smith, D. Berry y B. Kristiansen eds.) Gran Bretaña. pp 117-143.
- 51.- Moskowitz, J., T. Shen, R. West, R. Cassaigne y L. Feldman. (1977). Properties of the esterase produced by *Mucor mieheito* develop flavor in dairy products. *J. dairy Sci.* 60:1260-1265.
- 52.- Mudgett, R., J. Nash y R. Rufner. (1981). Controlled gas environments in solid substrate fermentations. *Dev. Ind. Microb.* 23:397-405.
- 53.- Müller, H. W. y W. Trosch. (1986). Screening of white-rot fungi for biological pretreatment of wheat straw for biogas production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 24:180-185.
- 54.- Nahas, E. (1988). Control of lipase production by *Rhizopus oligosporus* under various growth conditions. *J. Gen. Microb.* 134:227-233.

- 55.- Narahara, H., Y. Koyama, T. Yoshida, S. Fichangkura, R. Veda y H. Taguchi. (1982). Growth and enzyme production in a solid-state culture of *Aspergillus oryzae*. *J. Ferment. Technol.* 60(4):311-319.
- 56.- Nishio, T., K. Takahashi, T. Yoshimoto, Y. Kodera, Y. Saito y Y. Inada. *Biotechnol. Lett.* 9 (3): 187-190.
- 57.- Nishio, T., T. Chikano y M. Kamimura. (1987). Purification and some properties of lipase produced by *Pseudomonas fragi*-22.39B. *Agri. Biol. Chem.* 51(1): 181-186.
- 58.- Nout, H. R., T. Bonants-van Laurhoven, P. Jongh y P. Koster. (1987). Ergosterol content of *Rhizopus oligosporus* NRRL-5905 grown in liquid and solid substrates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 26:456-461.
- 59.- Norin, M., J. Boutelje, E. Holmberg y K. Hult. (1988). Lipase immobilized by adsorption. Effect of support hydrophobicity on the reaction rate of ester synthesis in cyclohexane. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 28: 527-530.
- 60.- Okazaki, N. y S. Sugama. (1979). A new apparatus for automatic growth estimation of mold cultured on solid media. *J. Ferment. Technol.* 57(5):413-417.
- 61.- Okazaki, N., S. Sugama y T. Tanaka. (1980). Mathematical model for surface culture of koji mold. *J. Ferment Technol.* 58(5):471-476.
- 62.- Okumura, S., M. Iwai y Y. Tsujisaka. (1976). Positional specificities of four kinds of microbial lipases. *Agri. Biol. Chem.* 40:855-860.
- 63.- Pal, N., S. Das y K. Kundu. (1978). Influence of culture and nutritional conditions on the production of lipase by submerged culture of *Aspergillus niger*. *J. Ferment. Technol.* 56(6):593-598.
- 64.- Pamment, N., C. Robinson, J. Hilton y M. Moo-Young. (1978). Solid-state cultivation of *Chaetomium cellulolyticum* on alkali-pretreated sawdust. *Biotechnol. and Bioeng.* 20:1735-1744.
- 65.- Rag, M., B. Mithal, R. Thakkur y K. Sastry. (1983). Solid-state fermentation for cellulase production by *Pestalotopsis versicolor*. *Biotechnol. and Bioeng.* 25:669-672.
- 66.- Rathbun, B. L. y M. Shuler. (1983). Heat and mass transfer effects in static solid-substrate fermentations: Design of fermentation chambers. *Biotechnol. and Bioeng.* 25:929-938.

- 67.- Ride, J. P. y R. Drysdale. (1972). A rapid method por the chemical estimation of filamentous fungi in plant tissue. *Physiol. Plant. Pathol.* 2(1):7-15.
- 68.- Rodriguez, J. A., J. Echevarria, F. Rodriguez, N. Sierra, A. Daniel y O. Martinez. (1985). Solid state fermentation of dried citrus peel by *Aspergillus niger*. *Biotechnol. Lett.* 7(12):577-580.
- 69.- Scriban, F. (1985). *Biotechnologia*. El Manual Moderno. Mexico, 1-7 pp.
- 70.- Seitz, W. E. (1973). Industrial application of microbial lipases: A review. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 51:12-16.
- 71.- Semeriva, M., G. Benzocana y F. Desnuelle. (1969). Some properties of a lipase from *Rhizopus arrhizus*: Separation of a glycopeptide bound to the enzyme. *Biochim. et Biophys. Acta.* 19:598-610.
- 72.- Sengupta, J., A. Naskar y M. Jana. (1984). Saccharification of untreated agrowastes during mycelial growth of mushroom *Termitomyces clypeatus* on solid beds. *Biotechnol. and Bioeng.* 26:188-190.
- 73.- Shanel, E. R. (1985). *Biotechnology: The new growth industry. USA today: Consulting Resources Corporation.* Marzo. pp 38-41.
- 74.- Stanley, D. (1985). Forecasting new chemical markets: *Biotechnology. USA today: Consulting Resources Corporation, Septiembre.* pp 1-8.
- 75.- Sugiura, M. y M. Isobe. (1975). Effects of temperature and state of substrate on the rate of hydrolysis of glycerydes by lipase. *Chem. and Pharm. Bull.* 23: 661-682.
- 76.- Sugiura, M. y M. Isobe. (1975). Studies on the lipase of *Chromobacterium viscosum*. Substrate specificity of a low molecular weight lipase. *Chem. and Pharm. Bull.* 23:1226-1230.
- 77.- Takamine, J. (1914). *Ind. Eng. Chem.*, 6, 824-828 pp
- 78.- Tengerdy, R. P., V. Murphy y M. Wissler. (1983). Solid-state fermentation of cellulosic residues. *Annals New York Academy of Sciences.* 413:469-472.
- 79.- Tsujisaka, Y., M. Iwai y Y. Tominaga. (1972). A comparative study on some properties of fungal lipases. *Ferment. Technol. Today.* 23:315-320.
- 80.- Ueno, S., M. Miyama, Y. Ohashi, M. Izumiya e I. Kusaka. (1987). Secretory enzyme production and condiation of *Aspergillus oryzae* in submerged liquid culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 26:273-276.



- 81.- Vadehra, D. V. (1974). Staphylococcal lipases. *Lipids* 9:158-165.
- 82.- Wisdom, R. A., P. Dunill y M. Lilly. (1987). Enzymic interesterification of fats: Laboratory and pilot-scale studies with immobilized lipase from *Rhizopus arrhizus*. *Biotechnol. and Bioeng.* 29:1081,1085.
- 83.- Wissler, M. D., R. Tengerdy y V. Murphy. (1982). Biomass measurement in solid-state fermentations using N mass spectrometry. *De. Ind. Microbiol.* 24:14-20
- 84.- Wood, D. A. (1979). A method for estimating biomass of *Agaricus bisporus* in a solid substrate, composted wheat straw. *Biotechnol. Lett.* 1:255-260.
- 85.- Yamaguchi, T., N. Muraya, M. Isobe y H. Sugiura. (1973) Production and properties of lipase from a newly isolated *Chromobacterium*. *Agr. Biol. Chem.* 37:999-1005.
- 86.- Zadrazil, F. y H. Brunnert. (1981). Investigation of physical parameters important for the solid state fermentation of straw by white rot fungi. *Eur. J. Appl. Microb. Biotechnol.* 11:183-188.