



03072

② lej.

03072

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

U.A.C.P. Y P. DEL C.C.H.

MEJORAMIENTO DE LAS CONDICIONES DE PRODUCCION DE LIPASA DE

RHIZOPUS DELEMAR

DESTINADA A LA MODIFICACION DE UN SUSTRATO LACTEO

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA

PRESENTA

Q.F.B. ESPINOSA GUTIERREZ ELVIRA

MEXICO, D.F. 1990

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

INDICE

Introducción.....	1
I Enzimas Lipolíticas.....	4
I.1 Aplicaciones de Lipasas.....	6
I.2 Aplicaciones de Enzimas Lipolíticas en productos Lácteos.....	5
II Producción de Enzima Lipolítica Microbiana.....	9
II.1 Elementos para Elevar los Nivele de Producción de Enzima Microbiana.....	14
II.1.1 Selección de la Cepa.....	14
II.1.2 Factores Físicos y Nutricionales que Afectan la Producción de Enzimas.....	16
II.1.3 Regulación y Mejoramiento Genético.....	19
Justificación.....	22
Objetivo.....	24
.....	
Materiales y Metodos.....	26
I Microorganismo.....	26
II Producción de la Enzima.....	26
III Determinación de Peso Seco.....	29
IV Diálisis.....	29
V Actividad Lipolítica.....	29

VI	Actividad Proteolítica.....	30
VII	Mutagénesis.....	32
VIII	Medios de Selección.....	34
IX	Análisis Estadístico.....	41
	Resultados y Análisis.....	42
I	Factores que Afectan la Producción de Lipasa y Pro- teasas por <u>R. delemar</u>	43
I.1	Efecto Negativo de Glucosa sobre la Síntesis de Lipasa.....	48
I.2	Efecto de la Fuente de Nitrógeno.....	48
I.3	Efecto Positivo de Tween 80.....	51
	Conclusiones de la Primera Etapa del Proyecto.....	55
II	Mutagénesis y Selección.....	57
II.1	Selección de Mutantes.....	58
	Conclusiones de la Segunda Etapa del Proyecto.....	69
	Recomendaciones.....	70
	Bibliografía.....	72

INTRODUCCION

Los microorganismos sintetizan numerosas enzimas, las cuales tienen una función específica durante el crecimiento, metabolismo y autólisis. La mayoría de estas enzimas actúan dentro de la células, en un ambiente protegido, pero algunas de ellas se excretan. La función de las enzimas extracelulares es hacer más accesibles los nutrientes para el microorganismo mediante la hidrólisis de compuestos de alto peso molecular. Debido a que estas enzimas se encuentran en el medio que rodea a la célula, fuera de la protección de la membrana celular, son estables a variaciones físicas y químicas del ambiente que les rodea. Los microorganismos deben producirlas en grandes cantidades debido a los volúmenes en los que llevan a cabo su función. Por todo esto las enzimas extracelulares son atractivas para el uso industrial.

En Oriente el cultivo de microorganismos que producen catalizadores extracelulares ha sido utilizado por cientos de años en la preparación de alimentos y bebidas fermentadas. En un principio la mayoría de estas enzimas eran amilolíticas y proteolíticas, predominantemente producidos por los géneros Aspergillus y Mucor. La fermentación semisólida en el arroz

húmedo fue la forma de obtención de enzimas en pequeña escala; este proceso fue sufriendo modificaciones con base en la experiencia transmitida de generación en generación. Las enzimas microbianas comerciales se introdujeron al Occidente a finales del siglo XIX, cuando científicos japoneses instalaron la primera planta con su propia tecnología.

El desarrollo de la enzimología industrial se ha centrado fundamentalmente en la explotación de las hidrolasas, que se han utilizado para depolimerizar materiales naturales como almidón, materiales estructurales de plantas y proteínas. Las industrias tradicionales que trabajan con este tipo de materiales han aceptado lentamente a estos catalizadores como una forma natural de modificarlos. Las nuevas aplicaciones encontradas para estas mismas enzimas, solas o en combinaciones selectas, han ido ampliando el mercado de las mismas. Se han incrementado las áreas de usos de las mismas, las condiciones de operación se han extendido a sistemas no acuosos y, gracias a técnicas de aislamiento de microorganismos termofílicos, se pueden operar a condiciones extremas de temperatura.

En la tabla 1 se presenta información sobre la evolución del mercado de enzimas en relación a otros productos biotecnológicos. se debe destacar el hecho de que es un mercado en crecimiento. Entre las aplicaciones explotadas en forma más reciente se encuentran el tratamiento de residuos, la extracción de pigmentos y colorantes, así como la síntesis de productos químicos de alto

Tabla 1 Valor del mercado de enzimas en en las últimas dos décadas en comparación con otros productos obtenidos por vía fermentativa.

MILLONES DE DOLARES (1960)					
PRODUCTO	AÑO				
	1960	1970	1980	1985	1990
AMINOACIDOS	35	120	400	580	800
ENZIMAS	185	340	432	1200	2000
ANTIBIOTICOS	1680	2840	5345	7960	15800

Datos basados en el reporte de US Trade Comission, 1984
Godfrey, 1986

valor agregado. Hace varios años que, gracias al conocimiento de la acción de proteasas y lipasas, se practican modificaciones específicas a las grasas y proteínas tanto de productos lácteos como de alimentos para mascotas para conferir, intensificar o mejorar su sabor. Esta es un área todavía en desarrollo por las posibilidades de creación que ofrecen las enzimas de origen microbiano. La introducción al mercado de muchas de ellas está en fase de desarrollo, pues hay que tomar en cuenta que para que una nueva enzima llegue a ser un éxito económico se requiere de una demanda grande, que el producto posea propiedades que satisfagan los requerimientos técnicos y económicos del proceso, además de que deben vigilarse aspectos toxicológicos y estabilidad de la preparación. El valor final del catalizador depende de varios factores, uno de los más importantes es el de costo de producción. A este respecto cabe destacar la relevancia del diseño del medio, pues la materia prima que lo constituye contribuye de un 40% a un 60% del costo de un proceso de fermentación de enzimas (Bartholomew, 1979). Por otra parte, como se explica más adelante, es uno de los factores que pueden afectar el rendimiento del producto por fenómenos regulatorios.

I. Enzimas Lipolíticas

El 80% de las enzimas que se producen en Estados Unidos son hidrolasas y de éstas las enzimas lipolíticas representan el 3% (Godfrey y Reichelt, 1983).

Las glicerol éster hidrolasas (E C 3.1.1.3) o lipasas son un grupo de enzimas que hidrolizan enlaces éster presentes en tri, di, y monoglicéridos en la interfase aceite agua. Actúan sobre una gran variedad de grasas y aceites; además pueden hidrolizar micelas en el mismo grado que a partículas emulsificadas.

Las lipasas son producidas por animales, vegetales y diferentes tipos de microorganismos. En animales se han identificado lipasas pancreáticas, esterases pregástricas, 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 (Faith et. al., 1971), muchas de las cuales han sido purificadas y comercializadas (Newmark, 1988). Las lipasas de origen vegetal se han identificado en diversos frutos y semillas tales como trigo, arroz, avena, soya y otras; no obstante, su comercialización es casi nula. La producción actual de lipasas contiene un elemento creciente de origen microbiano (Kilara, 1985). Estas últimas tienen la ventaja de que su producción no depende de variaciones estacionales, además de que no se ven limitadas por la disponibilidad de vísceras, de las que se extraen las enzimas de origen animal (Faith et. al., 1971).

La investigación sobre los diversos microorganismos productores de lipasas ha conducido al establecimiento de condiciones de fermentación a nivel industrial en varios casos. En las últimas décadas se ha incrementado el interés en el desarrollo de nuevas

aplicaciones de esta enzima en productos y procesos, particularmente en los campos de detergentes, grasas y aceites, y lácteos. El alto número de microorganismos productores de lipasas (Tabla 2) permite tener una amplia gama de posibilidades de catálisis, lo que resulta en una gran diversidad de aplicaciones.

I.1 Aplicaciones de lipasas

La lipasa es una enzima con aplicaciones actuales y potenciales en industrias tan diversas como la alimentaria, farmacéutica y química (Tabla 3). El factor limitante para llegar a la fase de producción es el alto precio de venta, pues alcanza hasta cuatro veces el valor de enzimas con gran volumen de mercado, como la proteasa (aproximadamente 80 dólares por kilogramo, Enmex, 1989). El área con mayor desarrollo es la generación de sabores, aunque recientemente se han incrementado las referencias en cuanto a síntesis de productos químicos, e incluso tratamiento de desechos (Macrae, 1985). Por otra parte el alto precio internacional de la enzima limita el desarrollo de productos a los de alto valor agregado; esto en el país se agudiza, al tener que importarla ya que no existe producción local.

Tabla 2. Microorganismos productores de Lipasas

Bacterias	Hongos	Levaduras
<i>Chromobacter lipolyticum</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Candida cylindracea</i>
<i>Alcaligenes faecalis</i>	<i>A. lipolyticus</i>	<i>C. parapsilofitica</i>
<i>Bacillus cereus</i>	<i>A. niger</i>	<i>Pichia sp.</i>
<i>B. eugoides</i>	<i>Eusarium oxysporum</i>	<i>Sporobolomyces sp</i>
<i>B. subtilis</i>	<i>Geotrichum candidum</i>	<i>Torulopsis sp.</i>
<i>Corynebacterium acnes</i>	<i>Hemicela lanuginosa</i>	<i>Trichosporon sp.</i>
<i>Chromobacterium viscosum</i>	<i>Mucor japonicus</i>	
<i>Leptospira pomona</i>	<i>M. lipolyticus</i>	
<i>Mycobacterium freudenreichii</i>	<i>M. miehei</i>	
<i>M. lipolyticus</i>	<i>Penicillium candidum</i>	
<i>M. raistracensis</i>	<i>P. cyclosporum</i>	
<i>M. phlei</i>	<i>P. roqueforti</i>	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Rhizopus arrizus</i>	
<i>P. fluorescens</i>	<i>R. delenar</i>	
<i>P. fragi</i>	<i>R. stromboli</i>	
<i>P. gladioli</i>	<i>R. japonicus</i>	
<i>P. nitroreducens</i>	<i>R. oligosporus</i>	
<i>Serratia sp.</i>	<i>Sclerotinia liza</i>	
<i>Stachylococcus aureus</i>		

Sztajer y Maliszewska, (1988)
 Orozco M.A., et. al., (1989)

Tabla 3 Aplicaciones de las Lipasas

	APLICACIONES*
Panificación y Cereales	Harinas para pastel, pie de queso
Productos de Confitería	Leches con sabor a chocolate, cremas, caramelos, chiclosos y chicles
Productos Lácteos y similares	Margarinas, sopas, aderezos para ensalada, salsas
Productos Cárnicos	Embutidos, curados de carnes
Fermentaciones Tradicionales	Desarrollo de sabores en arroz, leche de soya, fermentación alcohólica
Industria de Grasas y Aceites**	Interesterificación, síntesis de ésteres, hidrólisis inversa
Farmacía y Cosmología	Cremas, permanentes, encapsulamiento de productos granulados, facilitación en la asibilación de un fármaco. Elaboración de pastas dentífricas
Otros	Encurtidos, maduración: pescado. Tratamiento de residuos

Seitz, (1974)†

Macrae, (1965)††

1.2 Aplicación de Enzimas Lipolíticas en Productos Lácteos

Se ha mencionado ya que una de las áreas de aplicación de lipasas que continúa en investigación es la generación de sabor en productos lácteos. Este campo resulta de importancia para México ante la grave escasez de leche, ante la demanda de una población creciente y para responder a las necesidades del consumidor local en el uso de ingredientes naturales derivados de enzimas. El desarrollo de sabor en un producto lácteo depende de la formación de compuestos específicos a partir de carbohidratos, lípidos y proteínas de la leche. Esto se lleva a cabo por acción de iniciadores lácticos, de la flora endógena de la leche o de enzimas adicionadas, entre las que destacan las proteasas y lipasas (Fig. 1).

Los principales productos responsables del sabor son el ácido láctico, el diacetilo, el acetaldehído, ácidos grasos y cetonas derivadas de los mismos, aminoácidos y péptidos. El sabor de los diferentes productos lácteos variará de acuerdo a la proporción de estos compuestos en cada uno. En el proceso de elaboración de cada derivado lácteo se pueden generar interacciones que pueden alterar el balance de estos compuestos. Por ejemplo, durante la manufactura de queso se requiere de proteasa ácida (quimosina o renina) para la coagulación de proteínas de la leche; sin embargo

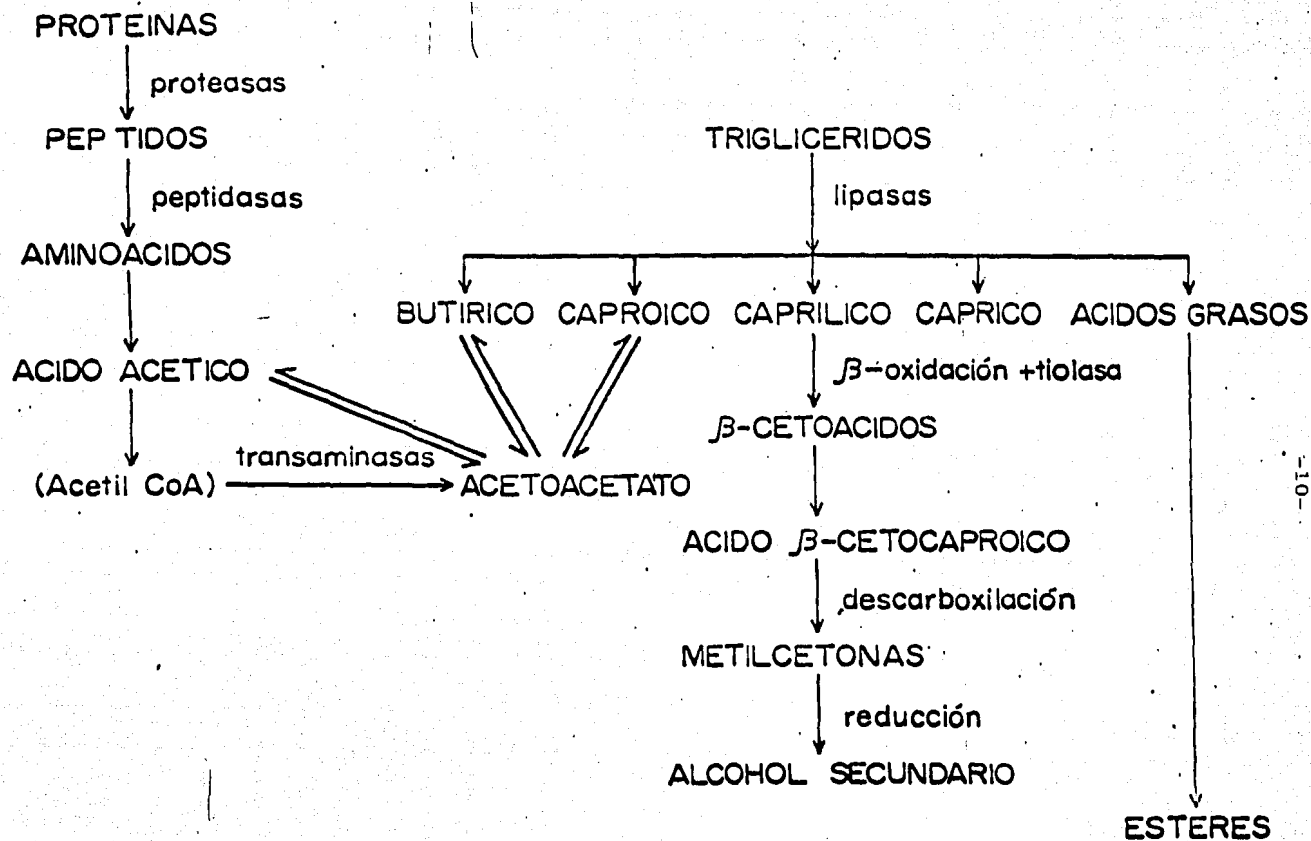


Fig. 1 Algunos Mecanismos de Formación de Compuestos Generadores de Sabor en Productos Lácteos Mediante la Acción de Lipasas. Lau, (1984)

una proteólisis excesiva posterior puede provocar la aparición de sabores amargos, debida a la liberación de péptidos de bajo peso molecular con aminoácidos hidrofóbicos presentes en los extremos, así como la pérdida de firmeza en el producto (Law, 1984).

La lipasa es importante en generación de sabores por dos razones:

a) genera ácidos grasos volátiles que imparten notas de sabor típico especialmente en quesos italianos, durante las diferentes etapas de maduración (tabla 4).

b) estos compuestos, mediante transformaciones no enzimáticas posteriores, generan lactonas y cetonas que confieren sabores característicos, particularmente a quesos tipo azul y Roquefort (Arbige et. al., 1986; Law, 1984).

Los productos obtenidos tras la adición del catalizador se denominan ingredientes modificados enzimáticamente (IME) y tienen una amplia gama de usos en el sector alimentario como constituyentes de sopas, salsas, aderezos, botanas y, principalmente, de quesos procesados. Este último aspecto reviste especial importancia para México, dadas las limitantes en producción local de leche, así como la variabilidad en los lotes de leche producidos y la creciente demanda de quesos. Las lipasas y proteasas pueden ser utilizadas, además, en la maduración acelerada de quesos; se logra un sabor intenso en poco tiempo, lo que repercute en una disminución de los costos de

Tabla 4 Evaluacion de sabor y contenido de ácidos grasos libres en quesos

Italianos modificados con lipasa de Cabra

Contenido de ácidos grasos libres (mg/100 g)				Comentarios
Acético	Propiónico	Butírico	Ácidos de cadena larga	
Provolone				
74	30	1074	177	Bien balanceado, limpio, ligeramente irritante.
167	23	1099	162	Fuerte, irritante, típico
117	14	833	177	Rancio, bueno.
Romano				
301	84	1203	363	Típico, muy buen sabor
257	58	1192	332	Limpio, jabonoso
133	68	661	418	Ácido, picante.

Arnold, 1975.

almacenamiento en frío. Esta última aplicación no tiene gran relevancia en el país ya que la preferencia de los consumidores mexicanos está orientada hacia sabores suaves, que se logran con tiempos de maduración cortos.

Como se ha expuesto, se puede trabajar con lipasa, proteasa o con ambas enzimas para la obtención de productos lácteos modificados; del balance entre ambas depende el sabor y textura del producto final (Arbige, et. al., 1986; El Soda, 1986). Por los aspectos señalados en torno al papel de la proteólisis en la generación de sabor es de particular interés que el microorganismo productor de lipasa destinada al desarrollo de sabores no presente una actividad proteolítica alta, en ocasiones es difícil de lograr ya que, frecuentemente, la producción de ambas enzimas es simultánea. En las lipasas de origen animal también se presenta este fenómeno.

II Producción de Enzima Lipolítica Microbiana.

II.1 Elementos para Elevar los Niveles de Producción de Enzimas Microbianas.

La selección de la cepa, el manejo de las condiciones ambientales y de mecanismos de regulación, así como programas de mejoramiento genético representan armas clave para la obtención de altos rendimientos en la producción de un metabolito a partir de microorganismos.

II.1.1 Selección de la Cepa

El valor económico de una cepa industrial productora de enzimas depende no solamente de los rendimientos obtenidos en la fermentación, sino de diversos factores que se señalan en la tabla 5, destacando la estabilidad y seguridad toxicológica (Eveleigh y Montenecourt, 1980; Fogarty y Kelly, 1980; Cheetham, 1987). En el caso de cepas destinadas a la modificación de sabor será muy importante analizar concomitantemente a la producción de la enzima aspectos como: el tipo de sabor generado, la aceptación por los consumidores y el perfil de ácidos grasos producido.

Tabla 5 Características Deseables de un Microorganismo Productor de Enzimas

El microorganismo debe producir buenos rendimientos de la enzima, en un tiempo relativamente corto, preferentemente en fermentación sumergida.

Debe crecer y producir en un medio con nutrientes que sean fáciles de conseguir y que no sean caros.

Debe de recuperarse fácilmente del medio de cultivo al final de la fermentación.

La enzima debe ser extracelular y de fácil separación del medio de cultivo.

El microorganismo no debe de ser patógeno y no debe de estar relacionado filogenéticamente a patógenos.

No debe producir toxinas, ni otros materiales biológicamente activos.

El organismo debe ser genéticamente estable y no susceptible a bacteriófagos.

Foqarty y Kelly, (1980)

Los factores antes expuestos se tomaron en cuenta durante fases anteriores del presente trabajo. Así, a partir de un proceso de selección entre 19 hongos filamentosos se encontró que Rhizopus delemar se encontraba entre los mejores productores de enzima en fermentación sumergida, si bien su actividad proteolítica era también elevada (Farrés, 1988). El sabor y textura generados en crema por su extracto enzimático fueron aceptados en un proceso de evaluación sensorial en el que se compararon productos modificados con enzimas de varios hongos. Los panelistas afirmaron que el sabor generado recordaba a queso suave.

Rhizopus delemar posee otras ventajas adicionales, como el que la lipasa producida es estereoespecífica para la posición 1-3 de acilglicéridos. Además actúa preferentemente sobre ácidos de cadena corta, abundantes en la grasa de la leche, por lo que las aplicaciones potenciales para ésta son muy variadas (tabla 6). Las razones expuestas condujeron a la selección de este microorganismo como modelo de estudio para este trabajo.

II.1.2 Factores Físicos y Nutricionales que Afectan la Producción de Enzimas

En la producción de cualquier metabolito se encuentra a menudo el fenómeno en el cual las condiciones óptimas de crecimiento no son necesariamente aquéllas en las que se obtienen los mejores rendimientos del mismo. El lograr un buen crecimiento es

Tablz 6. Aplicaciones de Lipasa de Rhizopus delensar

APLICACION	REFERENCIA
Síntesis de esteres	Iwai, et. al., 1980 Tahoun y Ali, 1936
Inter y Transesterificación	Tanaka, et. al., 1981
Síntesis de Ácidos grasos	Macrae y Hammond, 1965
Unificación	Nohsen, et. al., 1936

esencial para la obtención del producto pero, en general, se deben evitar las altas concentraciones de nutrientes fácilmente aprovechables debido a fenómenos regulatorios que se encuentran frecuentemente asociados a su uso. Se debe poner especial atención al control de pH, contenido de minerales, temperatura y aereación. Las condiciones de crecimiento y los requerimientos nutricionales pueden, en un principio, ser seleccionados empíricamente para cada microorganismo y para el método de fermentación seleccionado. En la síntesis de una enzima las interacciones entre los diversos factores son muy complejas. Esto conduce a que, en un proceso de desarrollo de enzimas que se explotarán comercialmente, se ocupe un tiempo considerable en investigación en encontrar las condiciones adecuadas de crecimiento del microorganismo para la producción del metabolito de interés en las diferentes etapas de escalamiento del proceso, hasta llegar a reproducirlas a nivel industrial.

La producción de lipasa, como la de muchas otras enzimas, se encuentra regulada por la composición de nutrientes del medio de cultivo. Los factores que influyen en su síntesis varían de microorganismo a microorganismo. Existen algunos reportes de incremento en la producción de esta enzima en un medio con fuentes de Nitrógeno complejas, como caseína hidrolizada, triptona, polipeptona y harina de soya. Al parecer la adición de lípidos como el aceite de oliva o de maíz al medio de cultivo retarda el crecimiento y reduce la producción en algunos microorganismos. Por otro lado los factores físicos, como la

temperatura de fermentación y la aereación, pueden ser determinantes en el rendimiento de lipasa (Bloquel y Veillet-Ponce, 1984). Algunos de los elementos que se han detectado como efectores o represores de producción de esta enzima para diferentes microorganismos se reportan en la tabla 7.

II.1.3 Regulación y Mejoramiento Genético.

Toda actividad metabólica está bajo un control, el cual debe ser alterado para lograr la sobreproducción de metabolitos de interés. Las estrategias más ampliamente utilizadas involucran la alteración de los medios de cultivo y condiciones de producción o el uso de mutantes derreguladas. La explotación racional de sistemas de optimización de medios de cultivo o de estrategias de mejoramiento genético requieren de un conocimiento de los mecanismos de regulación de la producción de la enzima o metabolito de interés.

Existen muchos ejemplos que ilustran cómo la composición del medio de crecimiento puede afectar la expresión de un metabolito comercialmente importante. Por ejemplo, la biosíntesis de penicilina por Penicillium chrysogenum se encuentra regulado por la fuente de carbono, represión catabólica y algunos azúcares ejercen un efecto negativo en la síntesis cuando sobrepasan una concentración determinada. Otros metabolitos están regulados por la concentración de fosfatos en el medio de cultivo. El tipo de

Tabla 7 . Elementos Estimulantes o Depresores en la Producción de Lipasas en Hongos Filamentosos.

Microorganismos	Estimulantes	Depresores	Referencia
<u>Penicillium roquefortii</u>	Peptona Extracto de levadura	Aceite de maíz y olivo Lactosa, glucosa	Eitenahler, et. al., 1970
<u>P. candidum</u>	Glucosa Peptona y oxígeno		Kornacki, et. al., 1980
<u>P. chrysogenum</u>	Glucosa Peptona y oxígeno		Chander, et. al., 1981
<u>Aspergillus wentii</u>	Glucosa Manitol Harina de soya y Peptona	Fructosa Aceites, Tri-butirina, Grasa butírica	Chander, et. al., 1980
<u>A. niger</u>	Sacarosa Nitrato de amonio	Aceites y Magnesio	Pal, et. al., 1978
<u>Geotrichum candidum</u>	Peptona Sales de Magnesio y potasio		Arends, et. al., 1986
<u>Rhizopus nigricans</u>	Glucosa, Galactosa y Peptona		Chander, et. al., 1981
<u>R. oligosporus</u>	Tweens Harina de Soya	Oxígeno	Nahas, et. al., 1988
<u>R. chinensis</u>	Acido oleico, Aceite de oliva	Glucosa	Nakashima, et. al., 1988

sistema de fermentación seleccionado afecta de manera importante, ya que algunos de ellos sólo se pueden producir en fermentación sumergida o semisólida, pero no en ambas. Es importante tener en cuenta todos estos factores en el diseño de un medio de cultivo (Rowlands, 1984).

Los avances en genética ofrecen muchos métodos atractivos para el mejoramiento de organismos de interés industrial. La obtención de mutantes o recombinantes estables es de gran valor económico para la producción de enzimas, como ha sido el caso de celulasas y pectinasas (Aunstrup et. al., 1979). Por esta razón las metodologías empleadas para la obtención de cepas en la industria se guardan cuidadosamente y muy poca información acerca de ellas se publica. El caso de las lipasas no es excepción, y la información en torno a las estrategias de búsqueda de mutantes hiperproductoras y derreguladas prácticamente es inexistente en su caso.

JUSTIFICACION

Las consideraciones anteriores permiten establecer los siguientes hechos y necesidades:

Rhizopus delemar es un microorganismo que presenta una enzima con múltiples aplicaciones. Una de ellas es la generación de sabores en sustratos lácteos, terreno en el que no ha sido reportado el uso de esta enzima. Esto permite incidir en un área de investigación y desarrollo de nuevos productos de gran impulso a nivel mundial, ya que los saborizantes enzimáticos son considerados aditivos naturales, que son los buscados por el consumidor nacional e internacional en la actualidad.

El desarrollo de saborizantes naturales que satisfagan las preferencias del consumidor local es importante para la industria de alimentos. En este proceso sería deseable una menor dependencia tecnológica del extranjero. Un saborizante elaborado con enzima de R. delemar ofrece esta oportunidad, puesto que el sabor generado por esta enzima ha sido preferido al producido por las de otros microorganismos en evaluaciones sensoriales realizadas por panelistas locales.

El desarrollo de procesos con esta enzima requiere de la obtención de un catalizador de bajo costo. Ante la importancia del proceso de fermentación en la determinación del mismo, una de

las primeras metas es incrementar los rendimientos en producción de enzima. Existen dos estrategias: optimización de medios de cultivo y obtención de cepas alteradas genéticamente. En ambos casos la implementación de una estrategia racional implica conocer la influencia de factores nutricionales en la síntesis de la enzima.

OBJETIVO GENERAL

Identificar los factores que influyen en la producción de lipasa por Rhizopus delemar, destinada a la modificación de un sustrato lácteo.

OBJETIVOS PARTICULARES

1 Establecer la existencia de fenómenos como:

- a) Efecto de fuente de Carbono
- b) Efecto de fuente de Nitrógeno
- c) Necesidad de Inductor

Y con ello, sentar las bases para la futura optimización de las condiciones de producción.

2 Búsqueda de mutante constitutivas e insensibles al efecto de la fuente de Carbono y Nitrógeno.

3 Reducir la Actividad Proteolítica de la Cepa

Para lograr los objetivos antes planteados el proyecto se dividió en dos etapas, en la primera se determinaron los factores que afectan la producción de Lipasa y Proteasa en Rhizopus delemar. y en la segunda se se buscó el mejoramiento genético de la cepa.

MATERIALES Y METODOS

I Microorganismo

Para el desarrollo de este trabajo se utilizó la cepa de Rhizopus delemar CDBB H313 proveniente de la colección de cultivos del CINVESTAV-IPN, la cual se conservó en una suspensión de esporas en glicerol al 40%, a temperatura ambiente (Smith, 1984) .

II Producción de la Enzima

Un mililitro de una suspensión de esporas con una densidad óptica de 0.06 a 540 nm, se transfiere a matraces de 250 ml con 50 ml de Medio "D", de crecimiento (Celerin y Fergus, 1971) suplementado con 1% de casaminoácidos y 2% de aceite de olivo (tabla 8). El pH se ajusta a 7 y se esteriliza a 121 °C durante 10 minutos; se incuba durante 4 días a 29 °C , en una agitadora New Brunswick G-25 con una agitación de 150 rpm. Las condiciones de temperatura, pH y velocidad de agitación, así como el tiempo de fermentación, se establecieron con base en reportes bibliográficos para microorganismos del mismo género y se verificaron experimentalmente (Iwai et. al., 1974; Nahas, 1988; Nakashima, et. al., 1988).

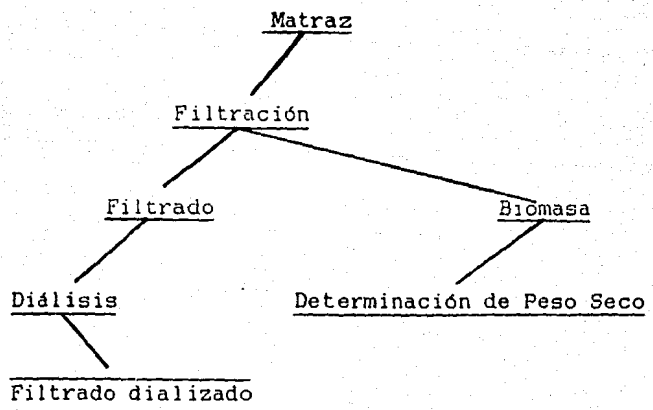
Tabla 8. Composición Medio D

	g/l
Glucosa	10.0
Casaminoácidos	10.0
Nitrato de Potasio	2.0
Sulfato de Magnesio	0.5
Fosfato de Potasio	1.0
Elementos Trazas (ml)	1.0

Solución de elementos traza: Sulfato de Zinc (439.9 µg/l), Nitrato de Hierro (723.5 µg/l), Sulfato de Manganeso (203.0 µg/l)

El medio D fue seleccionado debido a que, por su composición, permite el crecimiento de un buen número de hongos filamentosos, por lo que se había utilizado en etapas previas del proyecto de investigación que implicaban un proceso de selección entre varios microorganismos. Carece de fuentes de Carbono y Nitrógeno complejas, a diferencia de otros medios reportados para la síntesis de lipasa, por lo que puede ser utilizado como medio basal para el estudio de factores nutricionales en R. delemar.

Al finalizar la fermentación las muestras se procesaron como lo indica el siguiente diagrama:



Determinación de:
Actividad Lipolítica
Actividad Proteolítica

III Determinación de Peso Seco

En papeles filtro Whatman #1, previamente pesados y secados, se filtra el caldo de fermentación para separar el micelio, posteriormente se secan durante 24 h a 60 °C y se pesan.

IV Diálisis

La diálisis se lleva al cabo en tubo de diálisis de acetato de celulosa con un rango de exclusión de 12-14,000 (Thomas Scientific), contra agua destilada, durante 24 h a una temperatura de 4 °C .

V Actividad Lipolitica

Esta determinación se basa fundamentalmente en el método descrito por Menassa y Lamberet (1982), en el cual se utiliza como sustrato tributirina al 5%, emulsificada en agua con Tween 80 al 0.01%. La reacción se lleva a cabo en un amortiguador tris-maleatos 2.5 mM pH 6. El tiempo de reacción es de 5 minutos y la temperatura de 37 °C. Se registra la caída de pH como resultado de la liberación de ácido butírico por acción de la

enzima, y se compara el valor obtenido con una curva patrón de ácido butírico (figura 2), que se ajustó a un modelo lineal con un coeficiente de correlación de 0.970, sin embargo al calcular las micromoles liberadas de ácido butírico se tiene un error de aproximadamente 5% cuando el pH experimental se encuentra entre 6 y 5.4 y de un 10 a un 20% cuando se encuentra entre 5.3 y 4.5. Una unidad de lipasa se define como la cantidad de enzima que libera una μmol de ácido butírico por minuto por mililitro, en las condiciones de reacción antes descritas.

VI Actividad Proteolítica

Se determina esencialmente como lo describe Fukumoto (1967). El sistema

contiene 2 ml de caseína al 2% (pH 7) y un mililitro del filtrado enzimático, que se incuban a 37 °C durante 30 minutos; se adicionan 4 ml de ácido tricloacético al 5% y se centrifuga a 5000 rpm durante 10 min. Al sobrenadante se le determinan μg de tirosina liberados por el método de Lowry (1951). Una unidad de proteasa se define como la cantidad de enzima que libera un μg de tirosina por mililitro por minuto, en las condiciones de reacción anteriormente descritas.

CURVA PATRON DE ACIDO BUTIRICO

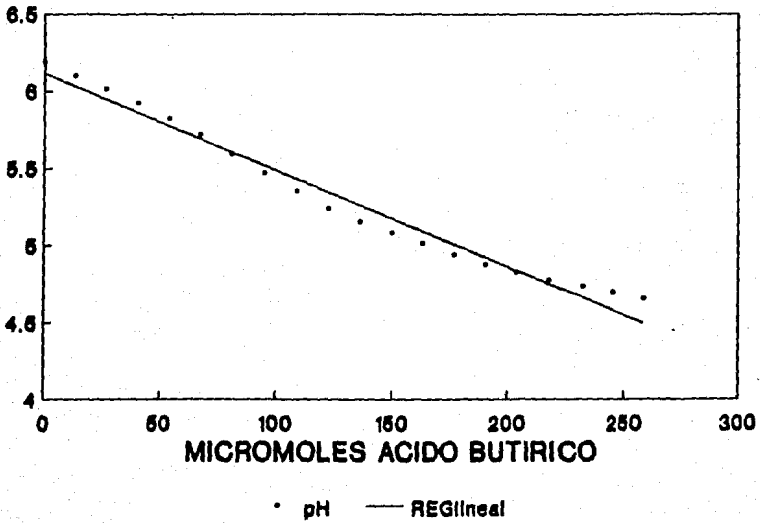
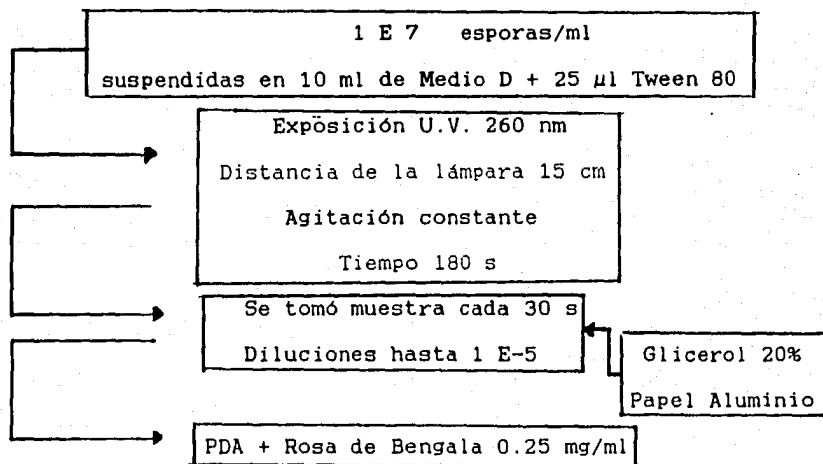


Fig. 2 Curva Estandar de Acido Butirico, pH vs. micromoles de ac. butírico en solución. Se midió la caída de pH después de adicionar 25 μ l de una solución al 0.5% (v/v) de ácido butírico en agua, en 7 ml de amortiguador Tris-Haleatos 2.5 mM, pH 5 y temperatura ambiente.

VII Mutagénesis

La mutagénesis se realizó empleando luz ultravioleta (Fincham, et.al., 1979), agente ampliamente utilizado en la obtención de cepas hiperproductoras de enzimas y antibióticos (Rowlands, 1983).

Las condiciones de mutagénesis se describen en el siguiente diagrama de flujo:



La totalidad de estas manipulaciones se hacen en obscuridad, y se determina una curva de sobrevivientes (figura 3).

CURVA DE TIEMPO DE EXPOSICION A U.V. vs. % DE SOBREVIVIENTES

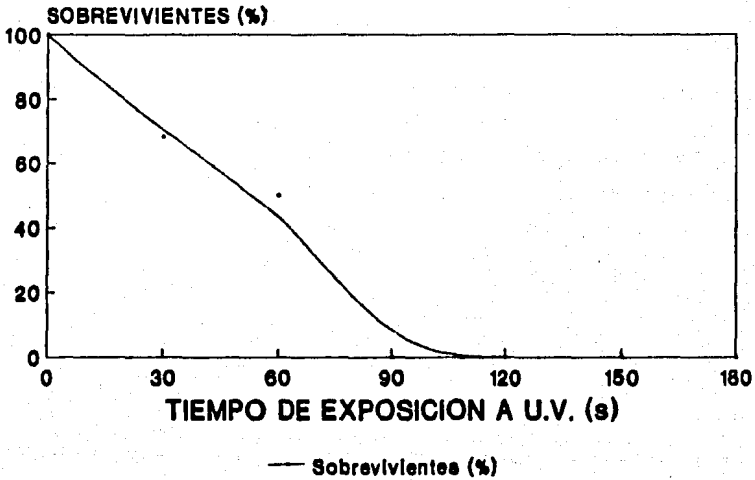


Fig. 3 Curva de Tiempo de Exposición a U.V. vs. % de Sobrevivientes. Las condiciones de mutagénesis se describen en materiales y métodos. Se tomaron 1 ml de muestra cada 30 segundos, se hicieron diluciones y se inocularon en placas con medio papa-dextrosa-agar y Rosa de Bengala, se cuantificaron después de 24h a 29 C. Los resultados graficados son proeedio de duplicados.

VIII Medios de Selección

La selección de las mutantes se llevó a cabo mediante una técnica de difusión radial (Lawrence, et.al., 1967; Fox y Stepaniak, 1983), la cual se fundamenta en la difusión de la enzima en agar emulsificado con tributirina, la que al actuar genera halos de claridad alrededor de las colonias productoras de lipasas (figura 4). En este tipo de técnicas es fundamental que el diámetro del halo de claridad y el logaritmo de la concentración de la enzima guarden una relación lineal, lo que puede variar según el medio de cultivo empleado (figura 5); en este caso se usó el medio D. Posteriormente se debe verificar la relación entre producción en fase sólida y en fermentación sumergida, pues no siempre es proporcional. Por otra parte, el tipo de crecimiento colonial de R. delemar, sumamente extendido y difuso, requirió del uso de inhibidores de crecimiento, los cuales permitieron la obtención de colonias pequeñas y compactas. Con este fin se probaron Rosa de Bengala (Ulloa y Hanlin, 1978) y Desoxicolato (Mackintosh y Pritchard, 1963) de Sodio en diferentes concentraciones, y las concentraciones más adecuadas fueron 0.25 y 0.30 mg/ml, respectivamente (figura 6).

La selección de las mutantes se llevó a cabo, según el objetivo, en tres diferentes medios, dependiendo de las características a seleccionar. La composición de cada uno de ellos se reporta en la tabla 9.

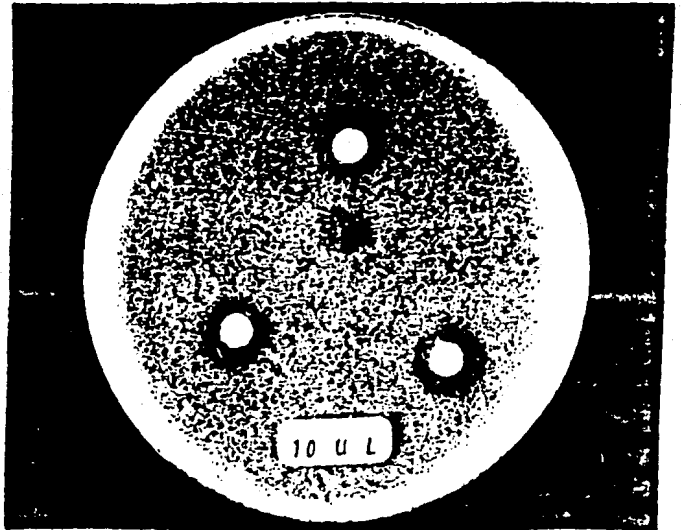
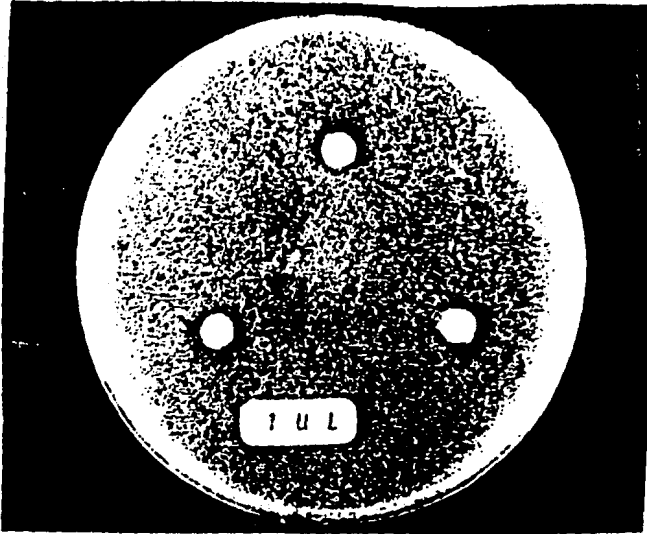


Fig. 4 Método de Selección en Medio Sólido. Halos de claridad en medio agar-Tribulirina, se comparan 1 y 10 unidades de actividad lipolítica de una preparación de Lipasa comercial.

CURVA PATRON DEL METODO DE SELECCION EN SOLIDO

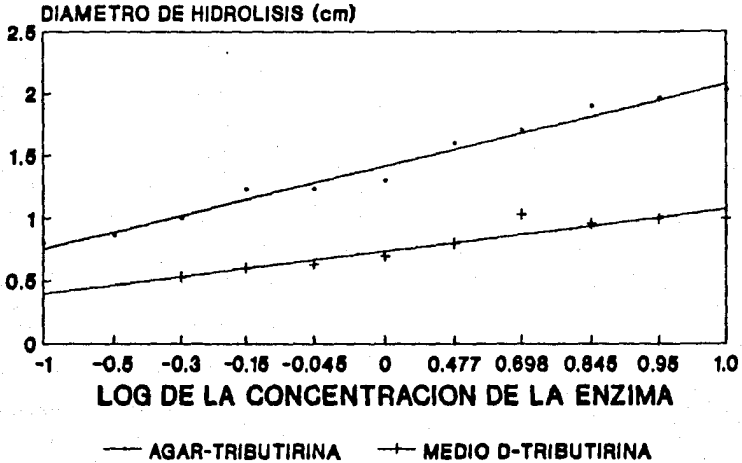


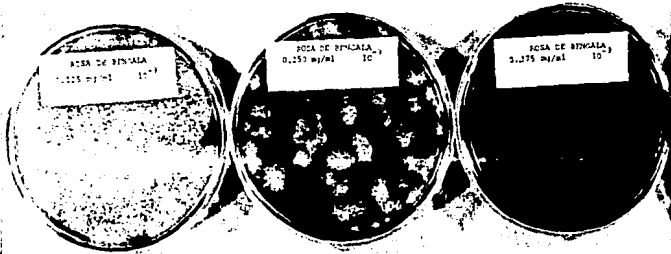
Fig. 3 Curva Patrón del Método de Selección. Diámetro del halo de claridad producido por la acción de la enzima en el medio vs. logaritmo de la concentración de la enzima. Los medios utilizados fueron Agar-Tributirina y Medio D-Tributirina. Se utilizó una enzima comercial en diferentes concentraciones. Los resultados graficados son resultado de duplicados y el coeficiente de correlación para Agar-Tributirina fue 0.98 y 0.99 para Medio D-Tributirina.

ROSA DE BENGALA

A

B

C



DESOXICOLATO DE SODIO

A

B

C



Fig. 6 Selección de inhibidores de crecimiento. Se inoculó *B. delensar* en medio papa-dextrosa-agar en presencia de Rosa de Bengala: A 0.125 mg/ml, B 0.250 mg/ml, C 0.375 mg/ml, y Desoxicolato de Sodio: A 0.25 mg/ml, B 0.30 mg/ml y C 0.35 mg/ml. Se incubó durante 24 h a 37°C.

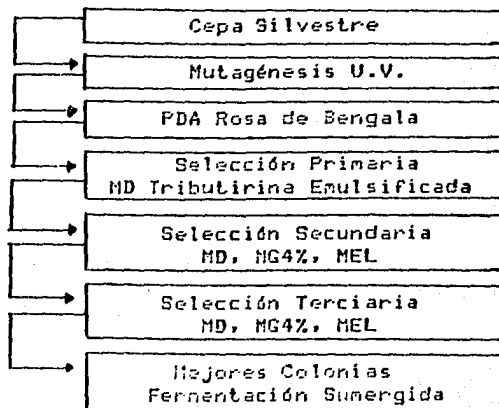
Tabla 9 . Medios de Selección
Composición (g/l)

	Medio D (MD)	Glucosa 4X (MG4X)	Extracto de Levadura (MEL)
Glucosa	10.0	40.0	10.0
Casaminoácidos	10.0	10.0	----
Extracto de Levadura	----	----	10.0
Nitrato de Potasio	2.0	2.0	----
Sulfato de Magnesio	0.5	0.5	0.5
Fosfato Acido de Potasio	1.0	1.0	1.0
Elementos Traza (ml/l)	1.0	1.0	1.0
Desoxicolato de Sodio	0.3	0.3	0.3
Tributirina (ml/l)	2.5	2.5	2.5
Agar	15.0	15.0	15.0

Solución de elementos traza: Sulfato de Zinc (439.9 µg/l), Nitrato de Hierro (723.5 µg/l), Sulfato de Manganeso (203.0 µg/l).

Cuando la probabilidad de obtener mutantes mejoradas es reducida y la variabilidad o el error del método de selección es alto, problema frecuente en la búsqueda de mutantes hiperproductoras, una estrategia de selección de varios niveles ofrece una alta probabilidad de detectar las cepas mejoradas (Calam, 1964; Davis, 1964). El fundamento de esta estrategia es el paso de las mutantes a través de una serie de "selecciones"; se determina inicialmente un porcentaje fijo de células a seleccionar y al pasar de un nivel al siguiente la proporción de éstas se reduce. El grado de resolución es reducido, pero se trata de separar a las células hiperproductoras de las que no lo son desde el inicio de la selección, lo que ahorra tiempo en la obtención de las cepas de interés. Con estos principios se diseñó la estrategia de selección que se presenta en la figura 7.

Figura 7. Estrategia de Selección



MD= Medio D

NG4%= Medio con Glucosa 4%

MEL= Medio con Extracto de Levadura

IX Análisis Estadístico

El diseño de cada uno de los experimentos es completamente aleatorizado. Cada experimento se hizo al menos dos veces, los resultados reportados son promedio de triplicados. Los datos se analizan por ANOVA, a un nivel de significancia del 95%.

RESULTADOS Y ANALISIS

I FACTORES QUE AFECTAN LA PRODUCCION DE LIPASA Y PROTEASA

POR RHIZOPUS DELEMAR

Los resultados de esta etapa del proyecto se reportaron en el artículo "Nutrititonal factors affecting lipase production by Rhizopus delemar" publicado por la revista Biotechnology Letters vol.12 No. 3 en marzo 1990. Este se presenta como la primera etapa del trabajo y a continuación se anexan los resultados que no se muestran en el artículo.

NUTRITIONAL FACTORS AFFECTING LIPASE PRODUCTION

BY Rhizopus delemar CDBB H313

Espinosa, E., Sánchez, S. and Farrés, A.*

Departamento de Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas
Apdo. Postal 70228, México, D.F. 04510

SUMMARY

Some nutritional factors that affect lipase yields by Rhizopus delemar were studied. Dextrin proved to be the best carbon source when used at 1% level. Yeast extract was the best nitrogen source for lipase production. The presence of a lipidic source in the growth medium, at a level not higher than 2% resulted in higher enzyme production. Tween 80 exerted a positive effect on enzyme production, used in a range that goes from 0.02% to 2.00%.

INTRODUCTION

The uses and applications of microbial lipases have increased over the past years. The enzyme from R. delemar has been used in interesterification and glyceride synthesis (Tahoun and Ali, 1986). Fats lipolyzed with this enzyme have been used in the manufacture of bakery products (Mohsen et al., 1986b). We have found that the enzyme may be used as a cheese flavouring agent in the production of enzyme modified dairy products. Lipase activity is important, but the organism displays proteolytic activity that might affect the flavor quality. There are some reports on production conditions and on the nature and amount of enzymes produced from this mould (Iwai and Tsujisaka, 1974b, Mohsen et al., 1986a), but little is known about the nature of the regulatory effects among strains of the same species. Most nutritional studies have been performed using complex media, such as soybean meal extract. This study shows some nutritional effects on lipase production by R. delemar CDBB H313 on a simple mineral medium, supplemented with the adequate nutrients, that might be used as the basis for further regulatory studies on lipase production.

MATERIALS AND METHODS

Organism and growth medium.- R. delemar CDBB H313 was purchased from the Culture Collection of CINVESTAV-IPN (Mexico) and was periodically transferred to potato dextrose agar slants kept at room temperature.

Enzyme production and assay.- A 6 day old suspension of R. delemar spores was

transferred to growth "D" medium (Celerin and Fergus, 1971), supplemented with 1% casaminoacids (Difco) and 2% commercial olive oil; pH was adjusted to 7.0 and autoclaved at 22 atm for 15 min. Spores were collected to reach a density of 1×10^{-7} ml⁻¹. One ml of this suspension was transferred to 50 ml of fresh medium and incubated for 4 days at 29°C in a New Brunswick G-25 rotary shaker at 150 rpm.

Media were varied as described in the results section. Aleatory experimental designs were used in all cases.

Mycelia were collected by filtering through Whatman #1 filter paper. Growth was measured by dry weight determinations. The recovered culture medium was used to assay enzymatic activities. Lipase activity was assayed by a pH drop method, based on the working conditions described by Menassa and Lamberet (1982). One lipase unit is the amount of enzyme that releases 1 μ mol of butyric acid per minute, at 37°C. Protease activity was assayed essentially as described by Fukumoto et al. (1967), and one protease unit was defined as the amount of enzyme that releases 1 μ g of tyrosine per minute at 37°C. All results were subject to a Duncan multiple media analysis, and differences at a significance level of 95% were considered as effects produced by the particular treatments.

RESULTS AND DISCUSSION

Carbohydrates and olive oil were tested as carbon sources and the results are shown in Table 1. Statistical analysis of the results showed that there were significant differences between the levels of enzyme reached with glucose and dextrin as carbon sources. Lipase production was 1.6 times higher with dextrin than with glucose.

CARBON SOURCE	LIPOLYTIC ACTIVITY (U/ml)	BIOMASS (mg/ml)
Sucrose	20.93	17.07
Starch	21.39	15.87
Dextrin	29.89	16.49
Glycerol	19.84	17.38
Olive Oil	23.67	9.60
Glucose	18.14	13.96

Table 1. Effect of different carbon sources on growth and lipase production. The fermentation was carried out in "D" medium at 29°C for 96 h supplied with 1% carbon source.

No stimulatory effect on growth was detected when sugars were used, but oil depressed growth significantly, which resulted in very high specific enzyme production. In this study dextrin produced the highest yields among the sugars tested, a result comparable to Iwai and Tsujisaka (1974). However, Mohsen et al.

(1986) report glucose as the best carbon source for lipase production in R. delemar. Strain differences and synergistic effects with other factors present in the medium might be responsible for the differences in results.

The carbon sources yielding highest and lowest enzyme production levels were tested at different concentrations. Under all conditions tested, enzyme production decreased as carbon source concentration was increased (data not shown). More experiments are needed to determine the cause of this negative effect. This phenomenon has also been observed with intracellular lipases from R. chinensis (Nakashima et al., 1988).

Different oils were tested as the sole carbon sources. The type of oil used proved to be important both for lipase production and for fungal growth. When the amount of oil was varied significant differences were found regarding fungal growth, but not regarding enzyme yields. Sunflower oil yields the highest enzyme production (Figure 1). Higher yields might be obtained if oils were emulsified, as availability in the medium would increase. Tributyrin and olive oil were added to the medium in emulsified and non emulsified forms, but yields were not significantly different, a result that disagrees with other reports (Nahas, 1988).

For R. delemar CDBB H313 the substrates and products of the enzyme reaction were tested as inducers, as the enzyme acts reversibly according to reaction conditions. They were added to culture broth in concentrations of 0.02% to 2.0% (w/v). Results are shown in Table 2. When enzyme substrates are used as inducers, there is no effect on enzyme activity. When 2% olive oil is used, an increase of 84.51% in lipolytic activity is observed, which might be due to an increase in fungal growth by 160%; the specific enzyme activity is lower than in controls. At this level, oil is acting as a good carbon source, not as an inducer. When tributyrin is added at any of the amounts mentioned above, both growth and enzyme yield decrease slightly. Enzyme reaction products, like oleic acid at 2%, stimulate growth by 106% with a slight increase in lipolytic activity. Some authors report an increase in other enzyme activities when oleic acid is used. The membrane permeability to the enzyme is increased because of the incorporation of this fatty acid to membranes (Asther and Carriceu, 1987). This could be the case for lipases in R. delemar.

Tween 80 seems to exert a double effect. It could act as an inducer, as its chemical nature is similar to some substrates of the enzyme but it is also a

CONDITION		LIPOLYTIC ACTIVITY (U/ml)	BIOMASS (mg/ml)
CONTROL		10.42	5.35
<u>Substrates</u>			
OLIVE OIL	0.02%	9.96	9.26
OLIVE OIL	0.20%	12.68	7.50
OLIVE OIL	2.00%	15.39	14.14
TRIBUTYRIN	0.02%	8.18	4.90
TRIBUTYRIN	0.20%	9.08	4.72
TRIBUTYRIN	2.00%	8.22	3.82
<u>Products</u>			
OLEIC ACID	0.02%	13.67	5.14
OLEIC ACID	0.20%	14.47	6.80
OLEIC ACID	2.00%	12.64	11.21
BUTYRIC ACID	0.02%	12.64	5.35
BUTYRIC ACID	0.20%	15.46	4.85
BUTYRIC ACID	2.00%	9.06	3.41
<u>Surfactants</u>			
TWEEN 80	0.02%	16.22	5.94
TWEEN 80	0.20%	27.25	6.16
TWEEN 80	2.00%	27.24	6.93

Table 2. Effect of possible inducers and surfactants on growth and lipase production. Initial pH was adjusted to 7.0 with NaOH. 1% glucose was used as carbon source.

NITROGEN SOURCE	LIPOLYTIC ACTIVITY (U/ml)	BIOMASS (mg/ml)
Control	26.25	14.91
Casaminoacids	22.84	17.56
Yeast extract	30.91	16.55
Peptone	12.71	15.36
Sodium nitrate	9.08	6.46
Ammonium sulfate	8.17	8.46

Table 3. Effect of different nitrogen sources on growth and lipase production. The fermentation was carried out in "D" medium (control) at 29°C for 96 h, supplied with 1% nitrogen source in all other cases.

The relationship between proteolytic and lipolytic activity and their regulation by nitrogen source has been previously reported (Arends et al., 1986). This relationship is important to obtain cheese flavours. However, we did not find a direct relationship between the production of the two enzymes and the production conditions. Inorganic nitrogen sources affect protease levels in different ways, and nitrate stimulates protease production.

The results obtained in this study indicate that carbon and nitrogen sources exert important and interrelated effects on the enzyme yields.

The enzyme does not seem to be inducible, but oils exert a positive effect as good carbon sources. Surfactants allow an increase in the amount of enzyme recovered.

REFERENCES

- Arends, M., Doroknov, Y., Sverchkova, G. (1986). *Microbiologiya*. 2(1):102-107.
Aster, M. and Carriceu, G. (1987). *Enzyme Microb. Technol.* 9:245-249.
Celerin, E. and Fergus, C. (1971). *Mycologia*. 63, 1030-1045.
Chander, H., Batish, V. and Snnabhadti, S. (1980). *J. Food Sci.* 45, 598-600.
Fukumoto, J., Tsuru, D. and Yamamoto, T. (1967). *Agric. Biol. Chem.* 31, 710-717.
Iwai, M. and Tsujisaka, Y. (1974a). *Agric. Biol. Chem.* 38, 1241-1247.
Iwai, M. and Tsujisaka, Y. (1974b). *Agric. Biol. Chem.* 38, 1249-1254.
Menassa, A. and Lamberet, G. (1982). *Le Lait*. 62, 32-43.
Mohsen, S., Alian, A., Attia, R. and El-Azhary, T. (1986a). *Egyptian J. Food Sci.* 14, 165-174.
Mohsen, S., Alian, A., Attia, R. and El-Azhary, T. (1986b). *Egyptian J. Food Sci.* 14, 267-274.
Nahas, E. (1988). *J. Gen. Microbiol.* 134, 227-233.
Nakashima, T., Fukuda, H., Kyotani, S. and Morikawa, H. (1988). *J. Ferment. Technol.* 66, 441-448.
Tahoun, M. and Ali, A. (1986). *Enzyme Microbiol. Technol.* 8, 429-432.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr. V. Kleckner and M-García Garibay for helpful comments, and I. Pérez Monfort for translation. This work was partially supported by IFS grant E/1478-1.

I.1 Efecto negativo de glucosa sobre la síntesis de lipasa

La glucosa, que para una gran variedad de microorganismos parece ser la mejor fuente de carbono, para R. delemar ejerce un efecto negativo cuando la concentración de ésta se incrementa en el medio de cultivo (figura 8). El crecimiento del microorganismo no se vio afectado aún en las más altas concentraciones, lo que sugiere que el efecto podría estar relacionado directamente con la síntesis de la enzima. También podría tratarse de un simple retraso en la producción, como ocurre para R. chinensis (Nahashima, 1988), pero se requiere de más experimentación al respecto.

I.2 Efecto de la Fuente de Nitrógeno

El extracto de levadura ejerce un efecto positivo sobre la síntesis de lipasas y proteasas (tabla 10). En comparación con otras fuentes orgánicas de Nitrógeno, éste eleva al doble la actividad proteolítica, lo que limita la aplicación del extracto enzimático para el desarrollo de sabores en productos lácteos. Este problema se puede eliminar mediante la búsqueda de mutantes en las que se reduzcan los niveles de proteasas y conserven los de lipasas. Esto puede presentar dificultades, ya que existen reportes que indican que la producción de ambas enzimas podría estar regulada por el mismo tipo de factores, al pertenecer a la misma o a unidades aledañas de transcripción (Arends, 1987).

EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE GLUCOSA

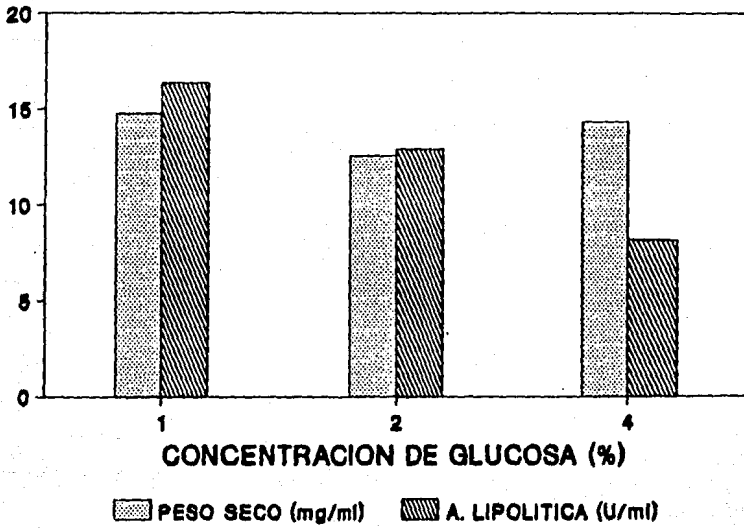


Fig. 8 Efecto de Diferentes Concentraciones de Glucosa . Se utilizó Medio 0 con 1, 2 y 4% (p/v) de glucosa, las condiciones de fermentación se describen en materiales y métodos.

Tabla 10. Efecto de diferentes fuentes de Nitrógeno Orgánico .

Fuente de Nitrogeno	A. lipolítica (U/ml)	A. Proteolítica (U/ml)	Biomasa (mg/ml)
Control	26.25	43.43	14.19
Casaminoácidos	22.84	40.51	17.56
Extracto de Levadura	30.91	79.56	16.55
Peptona	12.79	37.22	15.36
Nitrato de Sodio	9.08	81.36	6.46
Sulfato de Amonio	8.17	47.63	8.46

Control =Medio G, el cual contiene casaminoácidos IX y Nitrato de potasio 0.2%

El suplementar una fuente orgánica, como casaminoácidos, con fuentes inorgánicas (tabla 11) no fue favorable para la obtención de lipasa pero si de proteasa. En otros hongos filamentosos la presencia adicional de fuentes inorgánicas, como el amonio, se favorece la captación y utilización de otras fuentes de nitrógeno como aminoácidos, así como la producción de proteasas ; este puede ser el caso en R. delemar (Brown, 1980).

1.3 Efecto Positivo de Tween 80

La presencia de Tween 80 eleva los rendimientos de la enzima en el medio de cultivo. Los mecanismos por los cuales los surfactantes mejoran la producción de enzimas extracelulares en hongos filamentosos no se han establecido aún y pueden ser muy complejos. Algunos autores sugieren que Tween 80 facilita la captación y excreción de compuestos mediante modificaciones en la permeabilidad de la membrana. En el caso de la producción de ligninasa, cuya producción también se incrementa en presencia de este compuesto (Asther et.al., 1987), los resultados obtenidos demostraron que Tween 80 provee ácidos grasos saturados e insaturados que se incorporan a los fosfolípidos de la membrana y provoca una modificación en las propiedades de la misma.

Tabla 11. Mezcla de Casaminoácidos y Fuentes Inorgánicas de Nitrógeno

Condición	A. Lipolítica (U/ml)	A. Proteolítica (U/ml)	Bioasa (ag/ml)
Casaminoácidos 1%	22.85	40.47	13.68
Casaminoácidos 1%+N03 0.10%	22.00	53.11	16.41
Casaminoácidos 1%+N03 0.25%	20.50	108.92	16.78
Casaminoácidos 1%+NH4 0.10%	13.58	52.68	15.25
Casaminoácidos 1%+NH4 0.25%	15.40	33.80	17.99

Fermentación en Medio D, durante 96h, 28°C y 150 rpm.

El Tween 80, por su naturaleza química, podría actuar también como surfactante. Con el fin de determinar si este compuesto afectaba la producción de lipasa o la liberación de la misma, se determinó la actividad lipolítica en un extracto del micelio, tras cultivar en un medio con Tween 80 a diferentes concentraciones, además de determinar la actividad al filtrado extracelular (tabla 12).

Los niveles de lipasas en el micelio resultaron ser independientes de la concentración de Tween 80, ya que se mantuvieron invariables en todas las condiciones. En cambio, se incrementó la actividad recuperada en el filtrado. La concentración total de la enzima (actividad en el filtrado sumada a la actividad en el micelio) es significativamente más elevada que aquella encontrada en el control sin Tween 80; el incremento en el rendimiento es independiente de la concentración del surfactante en el medio de cultivo.

Tabla 12 Efecto de Tween 80 en los Rendimientos de Lipasa Intra y Extracelular

Condición	Actividad lipolítica (U/ml)	
	Filtrado	Micelios
Control	13.51	11.81
Tween 80 0.04%	24.38	13.40
Tween 80 0.20%	22.54	13.63
Tween 80 0.40	23.48	13.62

la fermentación se llevó a cabo en Medio D sin aceite de olivo, durante 96 h, y 29 C y 150 rpm.

el micelio se lavó y secó con acetona, posteriormente se homogenizó durante 10 minutos a temperatura ambiente con amortiguador Tris-Maleatos 2.5 mM y pH 6. Al homogenizado se le midió actividad lipolítica como se describe en materiales y métodos.

CONCLUSIONES DE LA PRIMERA ETAPA DEL PROYECTO

Los resultados obtenidos en la primera parte permiten reconocer los siguientes efectos de nutrientes que influyen sobre la producción de lipasa y proteasa:

Se reconoce a la dextrina como mejor fuente de carbono para la síntesis de lipasas en Rhizopus delemar. Se logró un incremento del 64% sobre los niveles alcanzados con glucosa a la misma concentración.

Se detecta un efecto negativo de glucosa en los rendimientos de lipasa, cuando la concentración de este carbohidrato se incrementa en el medio de cultivo por encima del 2%.

Si el extracto de levadura se encuentra como única fuente de Nitrógeno ejerce un efecto estimulador, tanto sobre lipasa como sobre proteasa.

Existe una biosíntesis basal de la enzima alta, es decir, no se requiere de la adición de fuentes lipídicas como inductores.

Algunos aceites de origen vegetal ejercen un efecto positivo en los rendimientos de lipasas cuando se adicionan al medio como única fuente de carbono. Con aceite de girasol, por ejemplo, los niveles de lipasas se incrementaron en un 60% en comparación con los obtenidos con glucosa.

La adición de surfactantes como Tween 80 incrementa los rendimientos de lipasas hasta tres veces, en comparación con los obtenidos en su ausencia, y tiene un doble efecto, ya que favorece la excreción de la enzima al mismo tiempo que la síntesis.

Lo anterior permite tener dos vías interesantes para incrementar los niveles de producción de lipasas y reducir los de proteasas. Por un lado se puede continuar el estudio de los factores nutricionales hasta llegar a la optimización de un medio de cultivo y por otro, tratar de eliminar algunos de los efectos negativos de ciertas fuentes de carbono y nitrógeno por medio de una mutagénesis clásica. Se decidió explorar, por ahora, la segunda alternativa, cuyos resultados se reportan a continuación.

II MUTAGENESIS Y SELECCION

Los resultados de la etapa anterior indicaban que algunas de las mutantes de interés serían:

Aquellas que produjeran elevada actividad lipolítica en un medio con exceso de glucosa pues estarían derreguladas en cuanto a este fenómeno.

Las que en conservaran altos rendimientos de actividad lipolítica en un medio con extracto de levadura como única fuente de Nitrógeno, y nula o reducida actividad proteolítica.

Mutantes hiperproductoras en Medio D, el medio de uso común.

II.1 Selección de Mutantes.

La selección de mutantes se realizó a partir de 970 colonias, que representan el 0.1% del número original de células expuestas a la radiación. Tras el proceso de mutagénesis se cultivaron en medio completo (Papa-Dextrosa-Agar) con Rosa de Bengala como inhibidor de crecimiento. Posteriormente se realizó una selección primaria en Medio D, con el fin de verificar que todas ellas produjeran lipasa en este medio base y así reducir el número de colonias a probar; sólo 204 presentaban halos de actividad lipolítica bien definidos, fenómeno que se presenta aún en la cepa sin mutagenizar. En la selección secundaria se probaron estas colonias en cada uno de los medios de selección descritos previamente. A este nivel de selección, 30 colonias presentaban actividad lipolítica mayor que la cepa silvestre. En la selección terciaria a que se sometieron estas 30, sólo 8 colonias llegaron a tener entre 2 y 4 veces la actividad de la cepa silvestre en alguno de los tres medios en los que se probaron. Los resultados de esta selección se resumen en la tabla 13 y el índice de mutagénesis alcanzado en cada etapa se reporta en la tabla 14.

Se debe tomar en cuenta que la relación entre rendimientos de mutación y dosis de radiación es más complejo para U.V. que para otro tipo de radiaciones. Se ha visto que a bajas dosis, el número de mutantes obtenida y el tiempo de exposición guardan una relación lineal. Algunos experimentos muestran la existencia de

Tabla 13 . Selección Terciaria
Diámetros de halo de claridad en medio sólido, como indicadores de
actividad lipolítica*

Cepa	Medio D (MD)	Medio glucosa4% (MG4%)	Medio Extracto de Levadura (MEL)
Silvestre	1.0	1.0	1.0
A	1.5	0.6	3.0
B	1.0	3.0	0.0
C	1.0	2.0	2.0
D	2.0	1.1	0.5
E	1.0	4.0	0.5
F	0.5	3.5	0.5
G	0.0	3.0	0.7
H	0.7	2.0	2.0

* Actividad Lipolítica relativa a la cepa silvestre, tomando como unidad la actividad de la cepa silvestre en cada uno de los medios.

Tabla 14. Índice de Mutantes Aparentes para Cada Etapa de Selección

Nivel de Selección	% Mutantes Aparentes†	Número de Colonias Seleccionadas
Primaria	21.03	204
Secundaria	3.0	30
Terciaria	0.8	8
Fermentación Sumergida	0.1	1

Supervivencia 0.1%

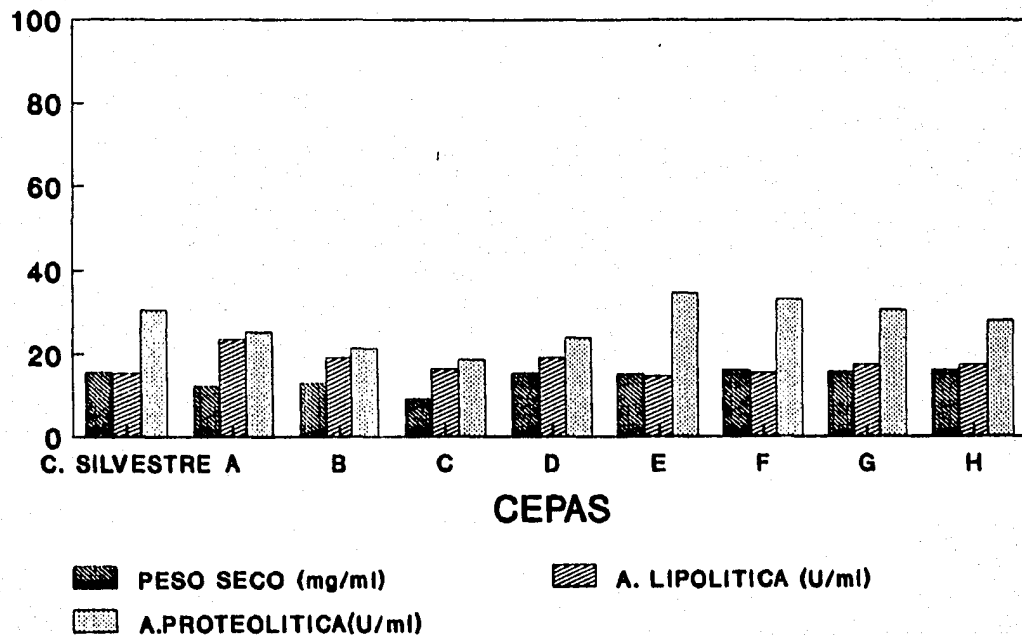
† 100% = 970 colonias sobrevivientes

un óptimo y una reducción drástica en el número de células mutadas cuando la dosis se incrementa (Markert, 1953). La existencia de un óptimo se puede explicar si la fracción de las células o la población nuclear es relativamente resistente tanto a la mutación como a la muerte, por lo que las sobrevivientes a periodos muy largos de exposición tienden a no ser mutantes, lo que parece ocurrir en este caso (Fincham, et.al., 1979).

Las 8 colonias resultantes de la selección terciaria se probaron después en fermentación sumergida en cada uno de los medios, y se les aplicó el mismo tipo de análisis llevado a cabo en la primera etapa del trabajo. Esta fase es importante, puesto que factores como características de crecimiento de la cepa en medio sólido, la difusión de la enzima, permeabilidad, morfología y otros, pueden provocar diferencias de comportamiento entre las condiciones de selección y las de producción. Cabe mencionar que cuando se ha llevado la selección de mutantes hasta comprobar sus rendimientos en fermentación sumergida, con estrategias de selección similares a la aplicada en este caso se han obtenido del 1.25 al 0.2% de mutantes que conservan sus características a ese nivel (Fiediurek et. al., 1986; Joglekar y Karanth, 1984; Mishra y Gopalkrishnan, 1984).

Los resultados obtenidos se presentan en las figuras 9, 10 y 11. No se encontraron diferencias significativas entre las mutantes en ninguno de los tres medios, excepto en el caso de la

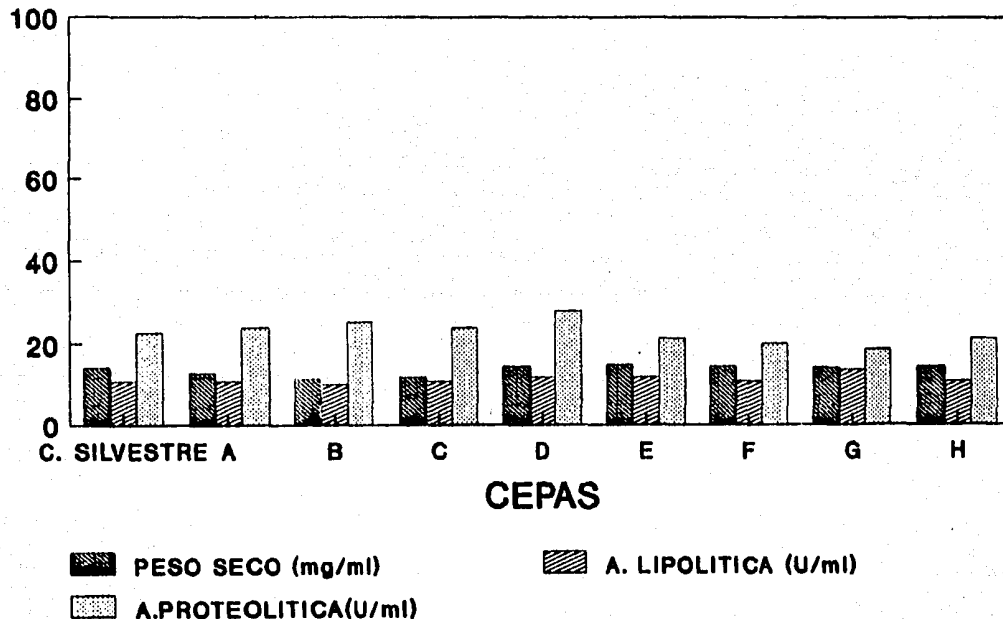
FERMENTACION SUMERGIDA DE MUTANTES MEDIO "D"



-62-

Fig. 9 Fermentación Sumergida de Mutantes y Cepa Silvestre en Medio D. La fermentación se llevó a cabo durante 96h, a 29 °C y 150 rpm. Mutantes con mejores rendimientos de lipasa en la selección terciaria (A, B, C, D, E, F, G, H).

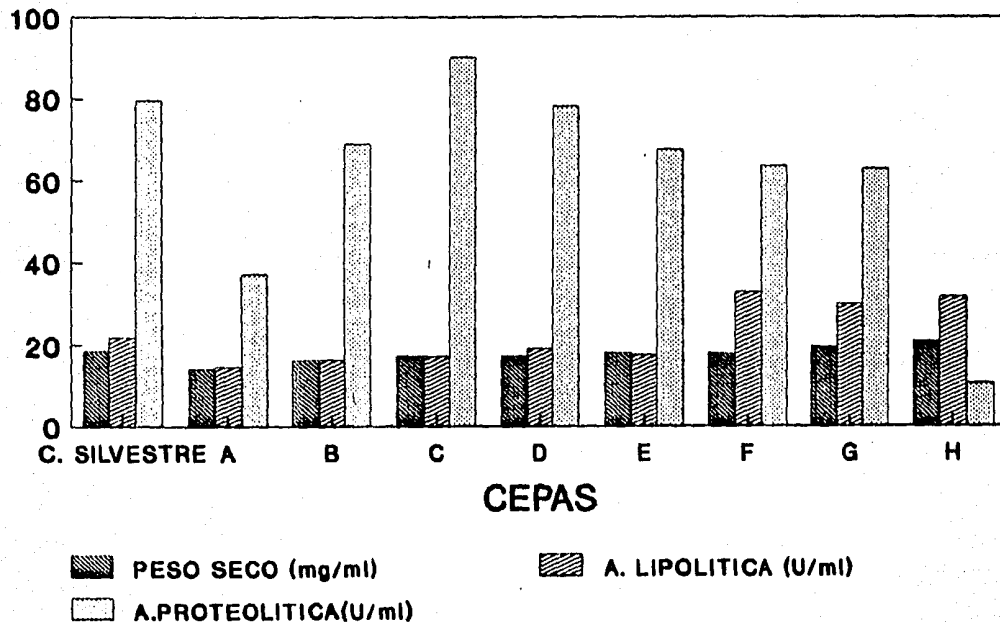
FERMENTACION SUMERGIDA DE MUTANTES MEDIO GLUCOSA 4%



-63-

Fig. 10 Fermentación Sumergida de Mutantes y Cepa Silvestre en Medio Glucosa 4%. La fermentación se llevó a cabo en Medio D con 4% de glucosa, durante 96h, a 29 °C y 150 rpm. Mutantes con mejores rendimientos de lipasa en la selección terciaria (A, B, C, D, E, F, G, H).

FERMENTACION SUMERGIDA DE MUTANTES MEDIO EXTRACTO DE LEVADURA



-64-

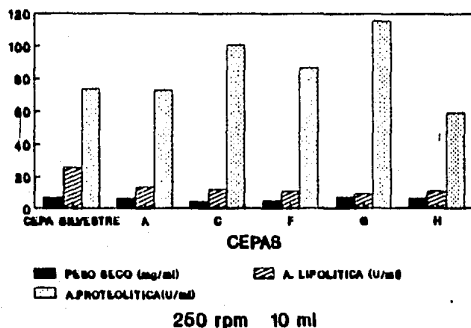
Fig. 11 Fermentación Sumergida de Mutantes y Cepa Silvestre en Medio con Extracto de Levadura. La fermentación se llevó a cabo en Medio D con extracto de levadura como única fuente de Nitrógeno, durante 96h, a 29 C y 150 rpm. Mutantes con mejores rendimientos de lipasa en la selección terciaria (A, B, C, D, E, F, G, H).

mutante H, la cual en medio con Extracto de Levadura presentó niveles reducidos de proteasa; esto la hace un excelente candidato para el desarrollo de sabores en productos lácteos.

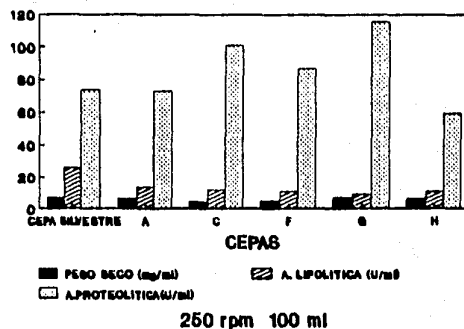
Todas las mutantes presentaron el mismo comportamiento que la cepa silvestre, es decir, en un exceso de glucosa la actividad lipolítica se ve reducida, mientras que, en un medio con extracto de levadura la actividad proteolítica se incrementa considerablemente en comparación a la actividad observada en Medio D, el cual contiene casaminoácidos en su formulación.

Estos resultados sugieren la presencia de otros factores que influyen en la respuesta del microorganismo a las condiciones de producción enzimática. Uno de ellos es posiblemente la diferencia en lo que respecta a la distribución de nutrientes y oxígeno. Con el propósito de conocer más al respecto, se diseñó un experimento en el cual las cepas se sometieron a una fermentación sumergida en condiciones extremas de agitación, a dos diferentes velocidades 50 y 250 rpm, con 10 y 100 ml de medio (figura 12). No se observaron diferencias significativas entre las cepas en ninguna de las condiciones probadas; sin embargo, los patrones de comportamiento en cuanto a crecimiento, actividad lipolítica y proteolítica cambian significativamente cuando se incrementa la velocidad de agitación y, por lo tanto, la disolución de oxígeno y la distribución de nutrientes en el medio se incrementan. Esto resulta ser positivo para elevar tanto el nivel de biomasa como el de la actividad proteolítica, mientras que la actividad lipolítica se reduce. Esto coincide con lo señalado por

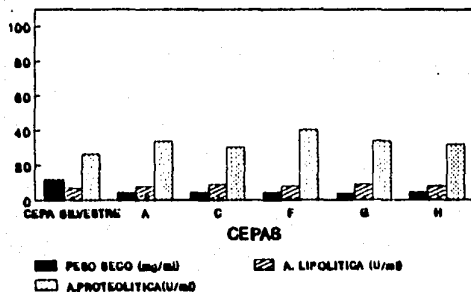
EFFECTO DE LA VELOCIDAD DE AGITACION Y DIFERENTES VOLUMENES DE MEDIO



EFFECTO DE LA VELOCIDAD DE AGITACION Y DIFERENTE VOLUMEN DE MEDIO



EFFECTO DE LA VELOCIDAD DE AGITACION Y DIFERENTE VOLUMEN



EFFECTO DE LA VELOCIDAD DE AGITACION Y DIFERENTE VOLUMEN

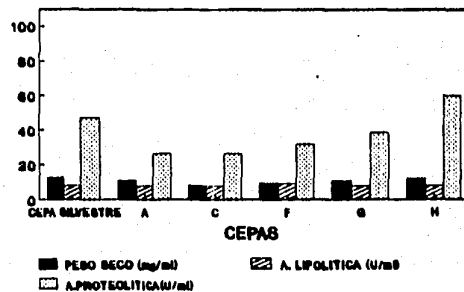


Fig. 12 Efecto de la Velocidad de Agitación y de Diferentes Volúmenes de Medio como Indicadores del Nivel de Agitación. Se ordenan de mayor a menor aereación: A, B, C, D. La fermentación se llevó a cabo en Medio D en matraces erlenmeyer de 250 ml, con 10 o 100 ml de medio según el caso, en una agitadora New Brunswick G-125, durante 96h, a 29 C.

Giuseppin (1984), quien indica que el metabolismo de R. delemar se puede ver afectado por limitación de oxígeno. Sin embargo, para otros microorganismos del género, las condiciones para obtener rendimientos elevados de lipasa son condiciones medias de agitación (Nahas, 1988; Nakashima, et.al., 1988).

El fenómeno debe explorarse en un fermentador instrumentado, en el que pueda controlarse el nivel de oxígeno disuelto. Sin embargo, los resultados obtenidos indican que, dado que este parámetro afecta significativamente el rendimiento de las enzimas de interés, una estrategia de selección en condiciones tan diferentes a las de producción no puede ser exitosa. Probablemente sea útil si a mayor escala se emplean sistemas de fermentación sólida.

Otros factores que podrían explicar los resultados negativos para la obtención de hiperproductoras de lipasa podría ser una frecuencia de reversión alta, o bien inestabilidad de las cepas tras el proceso de mutación. Existen varios ejemplos al respecto; en el caso de T. reesei, tras una mutación con U.V. en la búsqueda de hiperproducción de celulasas, el 82% de las cepas obtenidas fueron inestables (Nishra y Gopalkrishnan, 1984).

El método de selección en medio sólido podría ser útil únicamente como método de selección primaria, pues permite eliminar desde el inicio aquellas colonias que sintetizan muy bajos niveles de lipasa y por ende reducir el número de colonias a probar en las

condiciones de fermentación manejadas en este trabajo. No obstante, para la selección definitiva las cepas se deberán probar directamente en fermentación sumergida para contar con datos reales de producción y, por tanto, del potencial de cada cepa.

CONCLUSIONES DE LA SEGUNDA ETAPA DEL PROYECTO

Se obtuvo sólo una mutante, la cepa H, la cual presentó un comportamiento interesante en medio con Extracto de Levadura como fuente orgánica de Nitrógeno, ya que la actividad proteolítica se redujo. Sin embargo debe proseguirse con la caracterización de esta cepa mutante, incluyendo el desarrollo de sabores lácteos y su comparación con aquéllos obtenidos con la cepa silvetre. No se encontraron cepas hiperproductoras de lipasa ni resistentes al efecto negativo de altas concentraciones de glucosa.

Los índices de mutagénesis alcanzados, incluso en el nivel de selección en fermentación sumergida, son comparables con los reportados en la búsqueda de mutantes hiperproductoras de otras enzimas como celulasa o glucosa oxidasa. Sin embargo, dadas las diferencias entre las condiciones de disolución de oxígeno y nutrientes en los medios de producción sólido y líquido, las posibilidades de encontrar cepas interesantes se reducen.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

RECOMENDACIONES

El estudio del efecto de los factores nutricionales en la síntesis de la lipasa y proteasa en Rhizopus delemar es básico no sólo para lograr el incremento de los rendimientos mediante la manipulación de estos parámetros, sino para implementar estrategias acertadas en la selección de mutantes con las características deseadas. Al concluir este trabajo, en esta área queda mucho por hacer, tanto para conocer al microorganismo como para mejorar los rendimientos enzimáticos. Se sugiere realizar estudios cinéticos con las fuentes de Carbono y Nitrógeno de interés y determinar si su efecto es sobre una o todas las enzimas de R. delemar. Posteriormente habría que analizar cuál de ellas es la más relevante para la generación del sabor deseado.

Con los resultados obtenidos en este trabajo se puede llegar a la optimización del medio de cultivo, se sugiere el uso de Dextrinas, A. girasol, Extracto de levadura, Tween etc. o combinaciones de éstas.

Con respecto al proceso de mutagénesis cabría la realización de estudios más detallados sobre la relación de halo de claridad y producción de enzima. En una primera etapa se podrían comparar con rendimientos en fermentación sólida.

Se requiere de un conocimiento más profundo de la estructura nuclear y genética de R. delemar para lograr una manipulación exitosa. Sin embargo, esta área sigue siendo de un potencial enorme para lograr un incremento en los rendimiento de lipasa en este microorganismo.

BIBLIOGRAFIA

Arbige, V.M., Freund, R.P., Silver, C.S. y Zelko, T.J., 1986; Novel lipase for Cheddar chesee flavor development. J. Food Technol. 40; 91-98

Arends, I. M., Dorokhov, V.V., Sverchkova, T.M. y Fedorova, G.D., 1986; Biosynthesis of Lipase by Geotrichum candidum during submerged cultivation. Mikrobiologiya 22; 102-107

Arnold, G.R., Shanani, M. y Dwivedi, B., 1975; Application of lipolytic enzymes to flavor development in dairy products. J. Dairy Science 58; 1127-1143.

Asther, M., Corrieu, G. y Drapron, R., 1987; Effect of Tween 80 and oleic acid on ligninase production by Phanerochaete chysosporium ina-12. Enzyme Microb. Technol. 9; 245-249

Aunstrup, K., 1979; Production, isolation and economics of extracellular enzymes. Appl. Biochem. Bioeng 2; 27-69

Bartholomew, W.H. y Reisman, H.B., 1979; Economics of fermentation process. Microbial Technology II. 2a. ed.. Academic Press, N. Y.; 463-496.

Bloquel, R. y Veillet-Ponce, L., 1984; Factors contributing to production of microbial lipases. Microbiology Food Nutrition 12; 179-185

Brown, C., 1980; Ammonia assimilation and utilization in bacteria and fungi. En: "Microorganisms and nitrogen sources". Payne, J., (ed). J. Wiley and Sons, N.Y.; 511-535

Calam, C.T., 1964; The selection, improvement and preservation of microorganisms. Progr. Ind. Microbiol. 5; 1-53

Celerin, E.M. y Fergus, C.L., 1971; Effects of nutrients, temperature and relative humidity on germination and longevity of the ascospores of Chaetomium Thermophile var. coprophile. Mycologia 63; 1030-1045

Chander, H., Sannabhatti, S., Elias, J. y Ranaganathan, B., 1977; Factors affecting lipase production by Penicillium chrysogenum. J. Food Sci. 42; 1677-1682

Chander, H., Batish, V.K., Sannabhatti, S. y Srinivasan, R., 1980; Factors affecting lipase production in Aspergillus wentii. J. Food Sci. 45; 598-600

- Chander, H., Batish, V.K. y Ghodekar, D.R., 1981; Factors Affecting lipase production in Rhizopus nigricans. J. Dairy Sci. 64; 193-196
- Cheetham, P.S.J., 1987; Screening for novel biocatalysts. Enzyme Microb. Technol. 9; 194-213
- Davis, O.L., 1964; Screening for improved mutants in antibiotic research. Biometrics 20; 576-591
- Eitenahller, R.A., Vannand, J.R., y Shahani, M., 1970; Production and properties of Penicillium roqueforti lipases. J. Food Sci. 35; 130-133
- El Soda, M., 1986; Acceleration of Cheese Ripening: Recent Advances J. Food Protection 49; 395-399
- Enmex, 1989; comunicación personal
- Eveleigh, D.E. y Montenecourt, B.S., 1980; Increasing yields of Extracellular Enzymes. Adv. Appl. Microbiol. 25; 57-74
- Faith, W.T., Neubeck, C.E. y Reese, E.T., 1971; Production and application of enzymes. Adv. Biochem. Eng. 1; 77-111
- Farrés, G.A., 1988; Selection and application of fungal lipases for the development of dairy flavors. Simposium México-Japón, resumen
- Fiedurek, J., Rogalski, J., Ilczuk, Z. y Leonowicz, A., 1986; Screening and mutagenesis of moulds for the improvement of glucose oxidase production. Enzyme Microb. Technol. 8; 734-736
- Fincham, J.R.S., Day, P.R. y Radford, A., 1979; Botanical Monographs IV. Fungal Genetics. 4a. ed., University of California Press ; 245-281
- Fogarty, W.M. y Kelley, C.F., 1980; Microbial Enzymes and Bioconversions. Rose, A.H., (ed). Academic Press, N. Y. ; 115-170
- Fox, F.P. y Stepaniak, L., 1983; Isolation and some properties of extracellular heat-estable lipases from Pseudomonas fluorescens strain AFT 36. J. Dairy Res. 50; 77-89
- Fukumoto, J. e Iwai, M., 1963; Studies on lipase: 1. Purification and crystallization of lipase secreted by A. niger. J. Gen. Appl. Microb. 9; 353-361
- Fukumoto, J., Tsuru, D. y Yamamoto, T., 1967; Studies on mold protease. I. Purification, crystalization and some enzymatic properties of acid protease of Rhizopus chinensis. Agric. Biol. Chem. 37; 710-717

Godfrey, T. y Reichelt, 1983; The application of enzymes in industry. The Nature Press, N. Y.; 1-7

Godfrey, T., 1986; Enzymes for industry in the '90s: a consideration of the trends and developments in biocatalysis. Industrial Biotechnology Annuary; 95-96

Giuseppin, M.L.F., 1984; Effects of dissolved oxygen concentration on lipase production by Rhizopus delemart. App. Microbiol. Biotechnol. 20; 161-165

Iwai, M., Okomura, S. y Tsujisaka, Y., 1980; Synthesis of terpene alcohol esters by lipase. Agric. Biol. Chem. 44; 2731-2732

Iwai, M. y Tsujisaka, Y., 1974; The purification and properties of three kinds of lipases from Rhizopus delemar. Agric. Biol. Chem. 38; 1241-1247

Joglekar, A.V., y Karanth, N.G., 1984; Studies on cellulase production by a mutant- Penicillium Funiculosum UV-49. Biotechnol. Bioeng. 26; 1079-1084

Kilara, A., 1985; Enzyme-Modified lipid food ingredients. Process Biochemistry 19; 35-45

Kornacki, K., Stepaniak, L., Adamiec, I., Grabska, J. y Wrona, K., 1980; Production of lipases and proteases by moulds of P. roqueforti and P. candidum under selected conditions of surface and submerged cultivation. Acta Alimentaria Polonica 6; 281-288

Law, B.A., 1984; Flavor Development in Cheese. En: Advances in the Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk. Davis F.L. y Law B.A., (ed.). Elsevier Appl. Sci. Pub., Barking, Inglaterra; 187-208

Lawrence, R.C., Fryer, T.F. y Reiter, B., 1967; The production and characterization of lipases from a Micrococcus and a Pseudomonas. J. Gen. Microbiol. 48; 401-418

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Fair, L. y Randall R.J., 1951; Protein measurement with folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 93; 265-275

Mackintosh, M.E. y Pritchard, R.H., 1963; The production and replica plating of micro-colonies of A. nidulans. Genetic Res. 4; 320-322

Macrae, A.R. y Hammond, R.C., 1985; Present and future applications of lipases. Biotechnol. and Genetic Eng. Rev. 3; 193-217

Markert, C.L., 1953; Lethal and mutagenic effects of ultraviolet radiation in Glomerella conidia. Exp. Cell. Res. vol. 5; 429-435.

Menassa, A. y Lamberet, G., 1982; Contribution a l'étude du système lipolytique de Penicillium roqueforti. Caracteres compares de deux activites exocellulaires. Le Lait 62; 32-43

Mishra, S. y Golpalkrishnan, K.S., 1984; New method for isolation of cellulase constitutive mutants in Trichoderma reesei and partial characterization of one. J. Ferment. Technol. 62; 495-500

Mohsen, S., Alian, A., Attia, R. y El-Azhary, T., 1986; Specificity of lipase produced by R. delemar and its utilization in bread making. Egyptian J. Food Science 14; 175-182 (Resumen)

Nahas, E., 1988; Control of lipase production by Rhizopus oligosporus under various growth conditions. J. Gen. Microbiol. 134; 227-233

Nakashima, T., Fukuda, H., Kyotani, S. y Moriskawa, H., 1988; Culture conditions for intracellular lipase production by Rhizopus chinensis and its immobilization within biomass support particles. J. Ferment. Technol. 66; 441-448

Newmark, P., 1988; Two European companies market Lipases. Biotechnology 6; 369

Orozco, M. E., Nurko, E. y Farres, A., 1989; Aplicaciones de lipasas en la generación de sabores lácteos. En: Biotecnología aplicada a la elaboración de saborizantes. Farres A. y Carreño H. (compiladores). Sociedad Mexicana de Saboristas A.C. Mexico D.F.

Pal, N. Das S. y Kundu, K., 1978; Influence of culture and nutritional conditions on the production of lipase by submerged culture of Aspergillus niger. J. Ferment. Technol. 56; 593-598

Rowlands, R. T., 1983; Industrial fungal genetics and strain selection. En: The filamentous fungi IV : Fungal Technology Smith J.E., Berry D.R., and Kristiancen B. (eds). Edward Arnold, Londres; 346-372.

Seitz, E.W., 1974; Industrial Application of Microbial Lipases : A Review. J.A.O.C.S. 51; 12-16

Smith, D., 1984; Maintenance of fungi. En: Maintenance of microorganisms: Manual of laboratory Methods. Kirsop B. and Snell J. (ed.). Academic Press, Londres; 83-107

Stepaniak, L., Kornacki, K., Grabska, J., Rymaszewski, J. y Cichosz, G., 1980; Lipolytic and proteolytic activity of P. roqueforti, P. candidum and P. camemberti strains. Acta Alimentaria Polonica 6; 155-165

Sztajer, H. y Maliszewska, I., 1988; Production of exogenous lipases by bacteria, fungi, and actinomycetes. Enzyme Microb. Technol. 10; 492-497

Tahoun, M.K. y Ali, H.A., 1986; Specificity and glyceride synthesis by mycelial lipases of Rhizopus delemar. Enzyme Microb. Technol 8; 429-432

Tanaka, T., Ono, E., Ishihara, M., Yamanaka, S. y Takinami, K., 1981; Enzymatic acyl exchange of triglyceride in n-hexane. Agric. Biol. Chem. 45: 2387-2389.

Ulloa, M. y Hanlin, R., 1978; Atlas de Micología Básica Ed. Concepto S.A. 1er edición México D.F.; 16-17

Westergaard, M., 1957; Chemical mutagenesis in relation to the concept of the gene. Experientia 13; 224-238