

100
24



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE CIENCIAS

**EFFECTO DE GLUCOSA SOBRE LA PRODUCCION
DE LIPASAS POR *Rhizopus delemar* EN
FERMENTACION SUMERGIDA.**

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 :

LAURA KAWASAKI WATANABE

1991.

**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.

	Página
Capítulo I: Introducción	7
1. Regulación de la biosíntesis de enzimas	9
1.1. Inducción	9
1.2. Represión por nutrientes	10
1.3. Retroregulación	20
2. Las Lipasas	23
3. <i>Rhizopus delemar</i>	30
Capítulo II: Objetivos	34
Capítulo III: Métodos	36
Capítulo IV: Resultados y Discusión	45
1. Cinéticas obtenidas con glucosa y/o dextrinas al 1% como fuente de carbono	45
2. Efecto negativo de glucosa	55
3. Cinéticas obtenidas con adición de glucosa al 1% a las 6 o a las 24 horas	58
4. Efecto <i>in vitro</i> de glucosa en la actividad lipolítica	65

	Página
5. Efecto de la 2-deoxi-D-glucosa en las cinéticas	68
6. Efecto de la adición de un inhibidor de síntesis de proteínas sobre la actividad lipolítica	75
7. Diseño de un medio químicamente definido	85
8. Efecto de glucosa sobre la actividad lipolítica en un medio químicamente definido	88
Capítulo V: Conclusiones y Perspectivas	93
Bibliografía	96

C A P I T U L O I

INTRODUCCION

La investigación relacionada con enzimas es muy importante dentro de la biotecnología debido a sus múltiples aplicaciones. La mayoría de éstas se deben a la especificidad de sustrato que presentan. Su empleo es amplio dentro de la industria alimenticia debido principalmente a que no generan subproductos tóxicos.

Las enzimas se obtienen de gran variedad de microorganismos, como bacterias y hongos, ya sean levaduriformes o filamentosos. Existen, para ello, técnicas de selección y aislamiento de organismos interesantes y una vez que se tiene la cepa pura, pueden aplicarse métodos de mejoramiento en cuanto a producción y purificación del producto. Algunos ejemplos de microorganismos productores de enzimas comercialmente importantes se presentan en la Tabla 1.

Los microorganismos se utilizan para producción de enzimas por diversas razones y ventajas con respecto a organismos superiores (plantas, animales). Algunas de ellas son (Faith, et al, 1971):

- a) Facilidad de manipulación
- b) Se requiere relativamente de poco espacio para su cultivo.
- c) Pueden optimizarse los medios de cultivo y aumentar la producción.
- d) Se puede mejorar la producción por ingeniería genética o mutagénesis.

Tabla 1 Microorganismos productores de enzimas importantes

Microorganismo	Enzimas
<i>Aspergillus niger</i>	glucoamilasa, proteasa, glucosa oxidasa, pectinasa
<i>A. oryzae</i>	proteasa, pectinasa
<i>Bacillus cereus</i>	penicilinasa
<i>B. coagulans</i>	glucosa isomerasa
<i>B. stearothermophilus</i>	amilasa
<i>B. subtilis</i>	amilasa, proteasa, penicilinasa, 5'-fosfodiesterasa
<i>Coniothyrium diploidiella</i>	pectinasa
<i>Endomycopsis fibuliger</i>	amiloglucosidasa
<i>Geotrichum candidum</i>	lipasa
<i>Klebsiella aerogenes</i>	histidasa
<i>Lactobacillus brevis</i>	glucosa isomerasa
<i>Penicillium sp.</i>	dextranasa
<i>P. chrysogenum</i>	glucosa oxidasa
<i>P. citrium</i>	5'-fosfodiesterasa
<i>Pseudomonas sp.</i>	oxigenasa de triptofano
<i>Rhizopus sp.</i>	lipasa
<i>R. niveus</i>	amiloglucosidasa
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	invertasa
<i>Sclerotinia libertina</i>	pectinasa
<i>Streptococcus sp.</i>	estreptoquinasa
<i>Streptomyces fradiae</i>	queratinasa
<i>S. griseus</i>	proteasa, 5'-fosfodiesterasa
<i>Trichoderma koningi</i>	celulasa

(Tomado de Wang, et al., 1979; Bailey y Ollis, 1986)

1. REGULACION DE LA BIOSINTESIS DE ENZIMAS.

La regulación de la biosíntesis de metabolitos es muy importante para la supervivencia del organismo, ya que permite que en un momento determinado, solamente estén presentes las enzimas necesarias y en la cantidad adecuada. Esto lo logran debido a mecanismos regulatorios sensibles a la presencia o ausencia de ciertos compuestos en el medio, los cuales provocan una respuesta a las condiciones dominantes en sus alrededores.

Existen varios modos que explican cómo puede funcionar la regulación de la biosíntesis de metabolitos en las células (Britz y Demain, 1985).

1.1. INDUCCION.

La inducción enzimática puede definirse como un aumento relativo en la tasa de síntesis de una enzima específica, debido a la presencia de una sustancia conocida como inductor. Este mecanismo permite una rápida síntesis de la enzima en el momento en que se necesita. La mayoría de los inductores son sustratos de enzimas catabólicas.

El ejemplo mejor conocido de inducción es el operón de lactosa de *Escherichia coli*, estudiado por Jacob y Monod (1961). En este caso, el producto del gen regulador es una proteína que interfiere con la transcripción, es decir, la reprime. Sin embargo, en presencia del inductor, que es la lactosa, la

proteína represora pierde su afinidad por la región del operador debido a que su unión con su unión con dicho inductor provoca cambios conformacionales que le impiden unirse al operador. La consecuencia es que la ARN polimerasa ya no encuentra obstrucciones en el gen operador y puede por lo tanto transcribir la enzima, que a su vez permite utilizar la lactosa como fuente de carbono. Cuando baja la concentración del inductor, la proteína represora vuelve a unirse al operador y se detiene la síntesis de la enzima, aunque las ya presentes siguen activas. (Figura 1)

Los inductores pueden ser sustratos, productos o análogos estructurales del sustrato. (Tabla 2)

Para evitar que un microorganismo requiera de inductor, se pueden obtener mutantes en el sistema regulatorio (represor u operador no funcionales) que serían entonces mutantes constitutivas.

1.2. REPRESION POR NUTRIENTES.

a) Represión Catabólica por Fuente de Carbono.

Este tipo de regulación se presenta cuando hay más de una fuente de carbono en el medio, y alguna de ellas es más fácilmente asimilable que las demás. La célula produce las enzimas necesarias para utilizar esta fuente de carbono, mientras que las otras rutas están reprimidas, hasta que se agote del medio la fuente fácilmente asimilable.

Generalmente, este efecto es provocado por la glucosa, de ahí que anteriormente se le conocía como efecto glucosa.

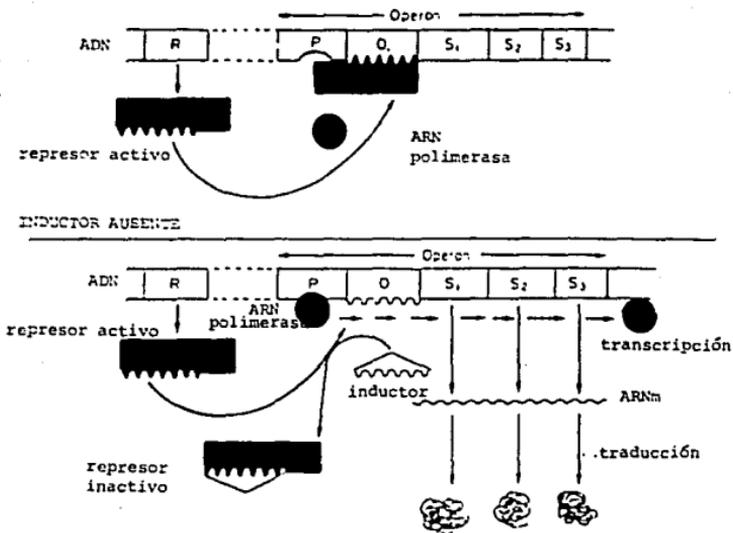


FIGURA 1. Control negativo de la síntesis enzimática por inducción. (Tomado de Britz y Demain, 1985).

Tabla 2. Ejemplos de inductores de enzimas.

Inductor		Enzima
a)	Substrato almidón, dextrinas urea sacarosa	amilasa ureasa invertasa
b)	Productos maltosa, isomaltosa isomaltosa ácidos grasos ácido urocánico	glucoamilasa dextranasa lipasa histidasa
c)	Análogos estructurales del sustrato	
	Análogo	Substrato Enzima
	isopropil- β -tiogalactósido	lactosa β -galactosidasa
	metilicina	bencilpeni- cilina penicilina- β - lactamasa
	ácido malónico	ácido maleico malto-cis- trans-isomerasa
	N-metilacetomida	acetomida amidas alifática
	D-tirosina; D-fenilalanina	L-tirosina tirosinasa
	soforosa	celulosa celulasa

(Tomado de Wang, et al 1979)

Sin embargo, esto depende del microorganismo en cuestión, ya que en ocasiones existen otras fuentes de carbono que reprimen a la ruta de degradación de la glucosa, como es el caso del citrato en *Pseudomonas aeruginosa* (Britz y Demain, 1985).

El mecanismo general de la represión catabólica en bacterias entéricas es el siguiente (Figura 2):

Al aumentar la concentración de glucosa, disminuye la de AMP cíclico (AMPC) el cual interviene en la síntesis de algunas enzimas; además es necesario para la síntesis del ARN mensajero de todos los operones inducibles. El AMPC se une a una proteína conocida como CAP (proteína activadora del catabolito), la cual presenta cambios alostéricos que le permiten unirse al promotor del operón; aumenta su afinidad por la ARN polimerasa y por lo tanto, permite la síntesis de las enzimas. Al disminuir la concentración del AMPC, baja consecuentemente la del complejo CAP-AMPC y por lo tanto, no hay transcripción de los operones sensibles. (Loomis y Magasanik, 1964)

La represión catabólica puede evitarse si no se utiliza la fuente de carbono que provoca la represión, o bien, a través de la adición de ésta en cantidades limitadas con cultivos alimentados. Otra forma es el aislamiento de mutantes resistentes a la represión. Por ejemplo, se ha reportado la obtención de mutantes insensibles a represión por glucosa para la síntesis de α -amilasa por la levadura *Lipomyces kononenkoae*. (Van Uden, et al, 1980).

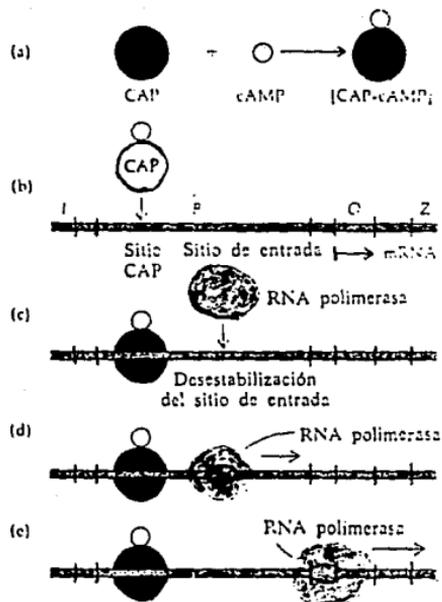


FIGURA 2. Secuencia que ilustra el mecanismo de control de la síntesis enzimática por represión catabólica (Tomado de Ayala y Kiger, 1984).

Existen diversos ejemplos de enzimas sensibles a represión catabólica (Tabla 3).

En *Cephalosporium* sp, la síntesis de proteasas es sensible a la adición de glucosa cuando el crecimiento es en medio complejo. La disminución de la síntesis de proteasas es proporcional a la concentración de glucosa añadida. Una vez que se agota la glucosa, se inicia de nuevo la producción de proteasas. Al agregar cicloheximida, que es un inhibidor de síntesis de proteínas, no se detectó aumento en la concentración de enzimas y por lo tanto, se llegó a la conclusión de que la síntesis de proteasas es *de novo*. (Tsuchiya y Kimura, 1984). Estos mismos autores reportaron también que la polipeptona reprime la síntesis de proteasas, ya que éstas se forman hasta que se agota la polipeptona y la glucosa del medio (Kimura y Tsuchiya, 1982).

La adición de glucosa a cultivos de *Candida maltosa* que han agotado los nutrientes del medio, provoca inactivación catabólica de las enzimas que intervienen en la ruta gluconeogénica de los n-alcanos. La concentración de glucosa adicionada fue del 2%. Intervienen en este efecto el AMPc y la fructosa-2,6-bifosfato. (Polnisch y Hofmann, 1989).

En *Neurospora crassa*, la presencia de glucosa o sacarosa a niveles mayores del 2% reprimen la síntesis de proteasas hasta un 86% aunque el crecimiento aumenta un 20%. En este caso, la adición de AMPc no relaja la represión (Drucker, 1972).

Tabla 3. Represión catabólica de enzimas.

Enzima	Organismo	Fuente de carbono represora
α -amilasa	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	fructosa
celulasa	<i>Trichoderma viridae</i>	glucosa, glicerol almidón, celobiosa
celulasa	<i>Pseudomonas floescens</i> var. <i>cellulosa</i>	galactosa, glucosa celobiosa
proteasa	<i>Bacillus megaterium</i>	glucosa
proteasa	<i>Candida lipolytica</i>	glucosa
amilogluco- sidasas	<i>Endomycopsis bispora</i>	almidón, maltosa glucosa, glicerol
invertasa	<i>Neurospora crassa</i>	manosa, glucosa, fructosa, xilosa
metilen- hidroxidasa	<i>Arthrobacter sp.</i>	acetato

(Tomado de Wang, et al, 1979)

En una mutante de *Aspergillus niger* auxotrófica para adenina, la presencia en el medio de azúcares como glucosa, fructosa y xilosa, reprime proteasa y poligalactouronasa. La represión catabólica de la proteasa se presenta a nivel de la transcripción mientras que la de la poligalactouronasa se presenta en la traducción (Shinmyo, et al, 1978).

La represión catabólica también puede presentarse en síntesis de metabolitos secundarios (Tabla 4).

De acuerdo con los estudios de Magasanik (1961), la represión de la biosíntesis de metabolitos puede deberse a:

-Exclusión del inductor. En experimentos con *Escherichia coli*, se adicionó glucosa e inductor (TMG, que es el metil- β -D-tiogalactósido) y no se obtuvo síntesis de β -galactosidasa ni de β -galactopermeasa. Sin embargo, si las células se ponían en contacto con el inductor quince minutos antes de agregar la glucosa, sí había síntesis de enzimas, la concentración de éstas llegó a ser aproximadamente la mitad de la obtenida en el control sin glucosa. Estos experimentos sugieren que el inductor entra aunque esté presente la glucosa, siempre y cuando haya permeasa.

La glucosa aparentemente interfiere con la entrada del inductor a las células cuyo contenido de permeasa es bajo. La inhibición de la síntesis de las enzimas puede evitarse, si se aumenta el nivel del inductor o la permeasa a través de inducción en ausencia de glucosa.

-Represión transitoria. Al adicionar glucosa a una concentración de 10 mM a *E. coli* cultivada en glicerol y

Tabla 4. Metabolitos secundarios sensibles a represión catabólica.

Organismo	Antibiótico	Fuente de Carbono Represora
<i>Streptomyces antibioticus</i>	actinomicina	glucosa
<i>S. clavuligerus</i>	cefamicina C	glicerol, almidón
<i>S. niveus</i>	novobiocina	citrato
<i>S. griseus</i>	estreptomicina	glucosa
<i>Penicillium chrysogenum</i>	penicilina	glucosa

(Tomado de Wang, et al, 1979; Lebrhi, et al, 1988)

expuesta a 0.5 mM de isopropil- β -D-tiogalactósido (IPTG), se observó una inhibición fuerte pero temporal de la formación de β -galactosidasa. Durante esta inhibición, cuya duración es variable y dependiente de la cepa, la tasa de crecimiento aumentó ligeramente, lo que indica que la glucosa no afecta la totalidad de la síntesis proteica, sino específicamente la de la enzima. Después de que el efecto de la represión termina, los niveles de síntesis de la enzima llegaron a ser de aproximadamente la mitad del control, carente de glucosa.

Existen otros compuestos además de la glucosa capaces de ejercer un efecto de represión transitoria al añadirse a células cultivadas en otra fuente de carbono. Por ejemplo, los análogos de glucosa como la 2-deoxiglucosa y el α -metilglucósido reprimen transitoriamente a la β -galactosidasa de la cepa silvestre, lo que demuestra que el efecto es provocado por la glucosa *per se* ya que los análogos no son metabolizables.

Probablemente, la represión transitoria esté relacionada con el sistema de fosfotransferasas. Este sistema es indispensable para que algunos carbohidratos entren a las células de algunos microorganismos (Postma, 1987; Romano, 1986). Cuando hay mutaciones en este sistema la sensibilidad a la represión transitoria se afecta. La parte menos esclarecida de este fenómeno es la liberación del efecto. Se sabe, sin embargo, que todas las células de la población son sensibles a la represión transitoria y que todas se liberan del efecto al mismo tiempo (Tyler y Magasanik, 1969). Las enzimas sensibles a este tipo de represión son inducibles y tienen

funciones catabólicas. Algunos ejemplos de ellas son: la β -galactosidasa, la permeasa y la transacetilasa del operón de lactosa de *E. coli*, la triptofanasa y la D-serina desaminasa. El efecto de la represión transitoria es liberado si se añade AMPc al momento del inicio de la transcripción.

b) Represión catabólica por fuente de nitrógeno.

En este caso, se presenta represión de enzimas que actúan en la asimilación de substratos nitrogenados en presencia de altas concentraciones de amonio o de compuestos orgánicos nitrogenados fácilmente asimilables. Algunos ejemplos de enzimas sujetas a este tipo de control son las proteasas, amilasas, ureasa y enzimas degradadoras de aminoácidos (Mora y Lara, 1988)

c) Represión por fósforo.

La concentración de fósforo puede reprimir la biosíntesis de algunas enzimas, principalmente si se encuentra presente como ortofosfato. Un ejemplo de enzimas reguladas por fosfato, lo constituyen las nucleasas y las fosfatasa.

1.3. RETRORREGULACION.

La biosíntesis de enzimas que intervienen en la formación de aminoácidos, nucleótidos y vitaminas está regida por retrorregulación. Este mecanismo funciona a dos niveles distintos, que son: a nivel de la actividad de la enzima y a nivel de la síntesis de la enzima. En el primer caso, se le

conoce como retroinhibición y en el segundo como retrorrepresión.

a) Retroinhibición.

En este mecanismo, el producto final de una ruta biosintética, al acumularse hasta cierta concentración umbral, afecta a algunas enzimas de la ruta (generalmente, a la primera) y le provocan cambios conformacionales que reducen su actividad (la inhibe) y por lo tanto, no hay mayor acumulación del producto final ni de los intermediarios.

Las enzimas que intervienen en este tipo de regulación reciben el nombre de alostéricas; presentan dos sitios importantes, uno de los cuales reconoce al sustrato y el otro al producto (que constituye el inhibidor). Al unirse el inhibidor, provoca que la enzima cambie conformacionalmente y como consecuencia, cambia también el sitio activo y ya no reconoce al sustrato.

b) Retrorrepresión.

El producto final de la ruta biosintética actúa como un correpresor que al unirse al aporrepresor (proteína producto del gen regulador) constituyen un represor funcional que reconoce el sitio operador e impide que la ARN polimerasa transcriba los genes para síntesis de las enzimas. Este mecanismo se presenta, por ejemplo, en las rutas biosintéticas de las vitaminas, que se requieren en cantidades muy pequeñas.

Generalmente, la retroregulación se ve complicada debido a la presencia de rutas ramificadas. Sin embargo, esto se resuelve por medio de:

-Isoenzimas. Son enzimas que catalizan la misma reacción pero que son sensibles en diferente grado a la inhibición y/o represión provocada por el producto. Un ejemplo de este tipo de regulación se presenta en la síntesis de la familia del ácido aspártico.

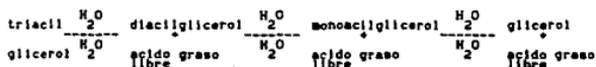
-Regulación concertada. En este caso, se necesita la presencia de más de un producto para provocar la inhibición y/o represión de la enzima. La presencia de un solo producto en exceso, provoca un efecto débil.

-Regulación acumulativa. Cada producto ejerce un efecto inhibitorio o represor, pero se necesitan todos los productos en exceso para que el efecto sea total. Por ejemplo, en *E. coli* la glutaminsintetasa está regulada por ocho productos diferentes.

Las técnicas más empleadas para relajar la retroregulación son evitar la acumulación del producto hasta las concentraciones umbrales o bien , aislar mutantes resistentes a la retroregulación.

2. LAS LIPASAS.

Las lipasas son enzimas pertenecientes al grupo de las hidrolasas; su función es la catálisis de la hidrólisis de triacilgliceroles insolubles en agua, y sus productos son ácidos grasos libres, diacilgliceroles, monogliceroles y glicerol. La reacción es reversible y se representa esquemáticamente así:



Estas enzimas se consideran glucoproteínas ácidas y actúan principalmente sobre triacilgliceroles de ácidos grasos de cadena larga; atacan los enlaces éster en la interfase entre el sustrato insoluble y el agua. Su peso molecular varía entre 20,000 y 60,000 daltones y contienen entre 2% y 15% de carbohidratos (principalmente, residuos de manosa). (Macrae y Hammond, 1985).

El intervalo de pH donde pueden actuar las lipasas, es bastante amplio y depende del organismo del cual provienen. Por lo general, es entre 5 y 9, y el óptimo es entre 6 y 8. Casi nunca necesitan de cofactores y son estables en solución acuosa a temperatura ambiente.

La distribución de las lipasas es amplia (Desnuelle, 1972), se presentan en:

a) Animales: en el tracto digestivo (secretadas por órganos especializados como el páncreas), en tejidos de mamíferos (de corazón, cerebro, músculo, riñón, etc.), también se presentan en

la leche y aparentemente, en peces e invertebrados.

b) Plantas: principalmente en semillas y frutos, entre ellos, trigo, avena y maíz. La presencia de lipasas en plantas ha sido poco estudiada.

c) Microorganismos: están bien distribuidas en bacterias y hongos (levaduras y hongos filamentosos). La mayoría son extracelulares. Algunos microorganismos cuyas lipasas han sido estudiadas son: *Aspergillus*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizopus*, etc.

Las lipasas son enzimas interesantes para la investigación por diferentes razones, como por ejemplo:

a) Las lipasas de bacterias patógenas están implicadas en la etiología de algunas enfermedades.

b) Intervienen en la degradación de grasas de desechos domésticos e industriales.

c) Intervienen en la descomposición de productos lácteos y otros alimentos que contienen grasas.

d) Tienen numerosas aplicaciones en la industria alimenticia y en otras debido a la especificidad de sustratos que presentan.

(Tabla 5)

En relación con el último punto, podemos destacar los siguientes usos de lipasas dentro de la industria:

Maduración de quesos. Muchas reacciones que intervienen en el desarrollo de las propiedades organolépticas del queso son catalizadas enzimáticamente por la adición de proteasas y lipasas microbianas ya que aceleran el proceso. Las variedades de quesos con sabores fuertes se obtienen con ayuda de un alto grado de lipólisis. Por ejemplo, el queso italiano requiere

Tabla 5. Usos de lipasas.

a) Industria Alimenticia

Maduración de quesos (italiano, azul)
Imitación de sabores a queso, mantequilla, crema
Ingredientes de mezclas para pastel, galletas, panqués
Rellenos cremosos
Aderezos de queso para botanas
Botanas
Aderezos de ensaladas

b) Industria Química

Resolución de mezclas racémicas de ésteres de alcoholes terpenos, resolución de isómeros.
Síntesis de ésteres
Ciencia básica y análisis: determinación de lípidos para propósitos clínicos.
Transesterificación

c) Otros Usos

Fórmulas de detergentes
Encurtido de pieles

(Fuente: Macrae, 1983; Macrae y Hammond, 1985; Arnold, et al, 1975; Killara, 1985; Desnuelle, 1972; El Soda, 1986)

producción de ácidos grasos de cadena corta, lo cual se logra convencionalmente con la adición de esterasa pregástrica. Una alternativa de este proceso, es añadir esterasa de *Mucor miehei*, que produce queso italiano de calidad aceptable. Como el anterior, hay otros ejemplos de la utilidad de las lipasas y esterasas de diversos organismos.

Para la fabricación del queso azul, la leche se inocula con esporas de *Penicillium roqueforti* o *P. glaucum* que posteriormente germinan; las lipasas liberan ácidos grasos de la grasa de la leche y producen sabores deseables; estos ácidos grasos libres actúan además, como precursores de las metil cetonas, que le dan al queso su sabor característico picante. *P. roqueforti* forma dos lipasas, pero solamente la ácida tiene importancia en la maduración del queso.

Algunas lipasas microbianas tienen especificidad en cuanto a la posición de ácidos grasos que emplean como sustrato. Por ejemplo, la lipasa de *Candida deformans* es específica para la hidrólisis de ácidos grasos en las posiciones 1,3 de triacilglicérolas. (Macrae y Hammond, 1985)

Debido a lo anteriormente expuesto, se han hecho varias investigaciones relacionadas con las lipasas de diversos organismos. (Tabla 6).

Los trabajos mencionados están relacionados ya sea con la optimización de medios de cultivo para aumentar la producción de lipasas, o bien, con las caracterizaciones de las propias enzimas.

Tabla 6. Organismos productores de lipasas.

Organismo	Referencia
a) Bacterias	
<i>Pseudomonas fragi</i>	Alford y Pierce, 1963
<i>Bacillus</i> sp., <i>B. circulans</i> <i>B. licheniformis</i>	Sztajer y Maliszewska, 1982
b) Hongos	
<i>Aspergillus niger</i>	Tsujiisaka, et al, 1972 Pal, et al, 1978 Fukumoto, et al, 1963
<i>A. ventii</i>	Chander, et al, 1980
<i>Mucor hiemalis</i>	Akhtar, et al, 1980
<i>M. miehei</i>	Deploey, 1981
<i>Penicillium roqueforti</i>	Meyers y Knight, 1958
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Chander, et al, 1977
<i>Rhizopus chinensis</i>	Nakashima, et al, 1988
<i>R. delemar</i>	Iwai y Tsujisaka, 1974 Tahoun y Ali, 1986
<i>R. japonicus</i>	Suzuki, et al, 1986
<i>R. nigricans</i>	Chander, et al, 1981
<i>R. oligosporus</i>	Nahas, 1988
<i>Syncephalastrum racemosum</i>	Chopra y Chander, 1983

La producción de lipasas por los diferentes microorganismos depende de la composición del medio de cultivo (Bloquel y Veillet-Poncet, 1984). Por ejemplo, para el caso de *Pseudomonas*, la producción de enzima mejora si el medio contiene polipeptona, harina de soya, hidrolizado de caseína y triptona. Para algunos organismos, la urea y el sulfato de amonio son efectivos como fuente de nitrógeno; para otros, se recomienda la adición de aminoácidos. Los lípidos actúan de diferente manera según el organismo, ya que pueden servir como inductores, como inhibidores o como fuente de carbono. Por ejemplo, para *Penicillium chrysogenum*, *Fusarium solani* y *Geotrichum candidum*, los lípidos retrasan el crecimiento y reducen la producción de lipasas. En *P. roqueforti*, la adición de aceites inhibe la producción de lipasas (Sztajer y Maliszewska, 1988). *Candida* sp también produce menor cantidad de enzima si se agrega aceite de olivo; por otro lado, *C. paraliolytica* aumenta su producción con la adición del mismo aceite.

Además de las condiciones del medio de cultivo, también influyen factores físicos y químicos tales como el pH, la temperatura, agitación, etc.

Comercialmente, existen varias presentaciones de lipasa provenientes de microorganismos, de animales e inclusive de plantas. (Tabla 7)

Tabla 7 Preparaciones comerciales de lipasas.

Fuente de lipasas	Proveedor
<i>Alcaligenes</i> sp.	Amano
<i>Achromobacter</i> sp.	Meito Sangyo
<i>Aspergillus niger</i>	Amano
<i>Bacillus subtilis</i>	Towa Koso
<i>Candida cylindracea</i>	Sigma, Amano, Meito Sangyo, Boehringer-Mannheim
<i>Candida lipolytica</i>	Sigma
<i>Chromobacterium viscosum</i>	Sigma, Toyo Jozo
<i>Geotrichum candidum</i>	Sigma, Amano
<i>Humicol lanuginosa</i>	Amano
<i>Mucor miehei</i>	Amano, NOVO
<i>Penicillium camemberti</i>	Rhone-Poulenc
<i>Phycomyces nitens</i>	Takeda Yakuhin
Páncreas de cerdo	Sigma, Amano, Boehringer-Mannheim
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Amano
<i>P. fluorescens</i>	Amano
<i>Pseudomonas</i> sp.	Sigma, Boehringer-Mannheim
<i>Rhizopus arrhizus</i>	Sigma, Boehringer-Mannheim
<i>R. delemar</i>	Tanabe Seiyaku, Amano, Sigma
<i>R. japonicus</i>	Amano, Nagase Sangyo, Osaka Saiken Lab.
<i>R. oryzae</i>	Amano
<i>Rhizopus</i> sp.	Amano, Serva
Germe de trigo	Sigma

(Fuente: Chen y Sih, 1989)

3. *Rhizopus delemar*.

Rhizopus delemar es un hongo filamentosos cuya ubicación taxonómica se presenta en la Tabla 8. Pertenecer al orden Mucorales y presenta hifas cenocíticas. (Ulloa y Hanlin, 1978)

REINO	Fungi
DIVISION	Eumycota
SUBDIVISION	Phycomycotina
CLASE	Zygomycetes
ORDEN	Mucorales
FAMILIA	Mucoraceae
GENERO	<i>Rhizopus</i>
ESPECIE	<i>R. delemar</i>

(Fuente: Ulloa, y Hanlin, 1978)

Se han llevado a cabo varios estudios que engloban algunas características importantes sobre las lipasas producidas por hongos del género *Rhizopus*; algunos de ellos se señalan a continuación.

Tahoun y Ali (1986), comprobaron que *Rhizopus delemar* produce tres lipasas intracelulares, las cuales purificaron por cromatografía de filtración en gel; presentan una especificidad 1,3 de enlaces éster y tienen preferencia por ácidos grasos insaturados de cadena corta, particularmente, ácidos caprílico y cáprico. Tahoun, et al (1988) reportan que el acetato de plomo y el fluorofosfato diisopropílico a concentraciones de 10^{-1} M y 10^{-2} M respectivamente, actúan como inhibidores de las lipasas.

Por otro lado, Iwai y Tsujisaka (1974) hicieron estudios sobre caracterización de tres lipasas extracelulares de *R.*

delemar, las cuales denominaron arbitrariamente como lipasas A, B y C. Las características de éstas se presentan en la Tabla 9.

Lipasa	pH(actividad)	pH(estabilidad)	Termoestabilidad
A	5.6	3.0-8.0	hasta 60°C
B	5.6	4.0-7.0	hasta 45°C
C	5.6	4.0-7.0	hasta 45°C

(Fuente: Iwai y Tsujisaka, 1974)

Posteriormente, Iwai y Tsujisaka (1974), demostraron que las lipasas B y C son la misma enzima, es decir, que son interconvertibles, y dependen de la presencia o ausencia de fosfolípidos en el medio, ya que la C se convierte en B cuando interacciona con ellos. No se sabe si la interacción con los fosfolípidos se da dentro o fuera de la célula. Por otro lado, la enzima A si fue considerada como una proteína diferente.

Iwai, et al (1979) e Iwai, et al (1980) reportan que la estructura de la lipasa C se modifica por asociación a fosfolípidos y, además, hay un aumento en la actividad enzimática. Shimada, et al (1981) y Shimada, et al (1983) llevaron a cabo estudios sobre la reversibilidad de la asociación de la lipasa de *R delemar* con fosfatidilcolina, así como también sobre su actividad, que aumenta cuando el fosfolípido está presente en el medio.

Iwai y Tsujisaka (1974) probaron diferentes fuentes de

carbono al 2% y no encontraron diferencias significativas en cuanto a la producción de las lipasas. Entre las fuentes probadas, se encuentran glucosa, galactosa, manosa, fructosa, maltosa y dextrinas.

Nahas (1988) comprobó, por otro lado, que la producción de lipasas por *R. delemar* se ve afectada por concentraciones altas de glucosa (más del 2%).

Nakashima, et al (1988), examinaron el efecto de glucosa en la producción de lipasas intracelulares de *R. chinensis* y demostraron que la actividad lipolítica es buena cuando se emplean concentraciones menores del 2%, pero al aumentarla a 3% o más, se observó que la actividad disminuye drásticamente.

Para el caso particular de *R. delemar*, se tienen antecedentes de que la glucosa a una concentración del 4%, ejerce un efecto negativo en la producción de lipasas, pero se desconoce la naturaleza del fenómeno (Espínosa, et al 1990). Además, se hicieron pruebas con diferentes fuentes de carbono y de nitrógeno, y resultó que la actividad lipolítica fue mayor con dextrinas que con glucosa. Por otra parte, en lo que a la fuente de nitrógeno se refiere, *R. delemar* produjo bajos rendimientos de lipasas en presencia de sales inorgánicas (Espínosa, et al, 1990).

Las lipasas que produce este microorganismo son de interés porque confieren a substratos lácteos sabores y aromas suaves y agradables al gusto del consumidor local. Sin embargo, también produce proteasas; estas enzimas interfieren con la generación

de sabores, ya que producen notas amargas. Por lo tanto, es conveniente optimizar por un lado la producción de lipasas y por otro, disminuir la de proteasas.

CAPITULO II
OBJETIVOS Y ESTRATEGIA

1 OBJETIVO GENERAL.

Caracterizar el efecto negativo que ejerce la glucosa en la producción de lipasas por *Rhizopus delemar* en fermentación sumergida.

2 OBJETIVO PARTICULAR.

Identificar si el efecto negativo de la glucosa se debe a un fenómeno de represión, ya sea catabólica o transitoria, o a inhibición.

3 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.

- a) Corroborar el efecto negativo de la glucosa al probar altas concentraciones de la misma.

- b) Probar adiciones de glucosa a diferentes tiempos para conocer la cinética en cuanto a producción de lipasas y de proteasas.

- c) Cuantificar el consumo de glucosa por parte del microorganismo con el objetivo de llegar a una posible estrategia con cultivos alimentados.

- d) Probar el efecto de un análogo de glucosa no metabolizable en la cinética de producción de lipasas y proteasas para definir si es o no la molécula de glucosa *per se* la efectora del fenómeno.

- e) Para definir si el fenómeno es o no inhibición, se probarán varias concentraciones de glucosa *in vitro*.

- e) Probar el efecto de un inhibidor de síntesis de proteínas en las actividades lipolítica y proteolítica para definir si se trata de una represión.

- f) Diseñar un medio químicamente definido para probar si el efecto negativo de la glucosa detectado en medio completo se mantiene.

CAPITULO III

METODOS

1 CEPA.

La cepa de *Rhizopus delemar* CDB H313 que se utilizó en este trabajo, provino de la colección del Cepario del Departamento de Biotecnología del CINVESTAV, del Instituto Politécnico Nacional.

La conservación de la cepa se hizo en tubos de agar inclinados, con medio de patata-dextrosa-agar (PDA de DIFCO), cubiertos con aceite de parafina estéril (Sigma), sellados con parafilm y mantenidos a 4°C. Se hicieron resiembras cada seis meses aproximadamente.

2 MEDIO DE CULTIVO.

El medio completo de cultivo empleado en todos los experimentos fue el medio D descrito por Celerín y Fergus (1971) suplementado con casaminoácidos. Su formulación es la siguiente:

Compuesto	Cantidad (g/l)
Glucosa (Baker)	10
Casaminoácidos (Merck)	10
Nitrato de potasio (KNO_3 , Baker)	2
Sulfato de magnesio ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$, Baker)	0.5
Fosfato dibásico de potasio (K_2HPO_4 , Baker)	1
Solución de elementos traza ¹	1 ml/l
Aceite de olivo (comercial) ²	20 ml/l

¹La composición de la solución de elementos traza es:

Compuesto	Cantidad (mg/l)
Sulfato de cinc ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)	439.8
Nitrato de fierro ($Fe(NO_3)_2$)	723.5
Sulfato de manganeso ($MnSO_4$)	203.0

²El aceite de olivo se agregó por separado a cada matraz.

El pH del medio se ajustó a 7.0 antes de agregar la solución de elementos traza y el aceite.

El medio mínimo contenía exactamente los mismos compuestos, en la misma proporción, con excepción de los casaminoácidos, que fueron substituidos por glicina al 1%.

Los medios de cultivo se esterilizaron a 121°C durante 15 minutos. La glicina se esterilizó con filtros millipore y se agregó posteriormente al resto del medio.

3 COSECHA DE ESPORAS.

a) Se prepararon matraces de 500 ml con 60 ml de medio PDA y se inocularon con micelio proveniente de los tubos inclinados mencionados anteriormente. Se incubaron a 29°C durante seis días, y se obtuvo así un buen crecimiento del hongo.

b) Se esterilizaron matraces de 125 ml con 50 ml de una solución al 50% de glicerol en agua destilada (v/v).

c) Bajo condiciones estériles, preferentemente en una campana de flujo laminar, se tomó micelio poco a poco, y se colocó posteriormente en el glicerol. Se agitó fuertemente en un

vortex, de tal modo que las esporas se desprendieron quedando suspendidas en el glicerol.

- d) El procedimiento anterior se repitió hasta conseguir una densidad óptica de aproximadamente 0.06, a 540 nm.
- e) El micelio debe retirarse de la suspensión de esporas para que no interfiera con la lectura de la densidad óptica.
- f) La suspensión así obtenida, se guardó en tubos con tapón estériles, que se mantienen a 4°C.
- g) Es importante numerar los tubos y anotar claramente la densidad óptica alcanzada en cada caso.

4 MONTAJE DE EXPERIMENTOS.

En matraces Erlenmayer de 250 ml, se vertieron 50 ml de medio D y se esterilizaron.

Una vez que estuvieron a temperatura ambiente, se inocularon con un ml de suspensión de esporas con densidad óptica de 0.06 y se incubaron a 29°C con agitación continua (150 rpm) durante 96 horas.

Los experimentos se hicieron por lo menos dos veces por triplicado.

5 TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS.

La Figura 3 presenta un diagrama de flujo para el tratamiento de las muestras.

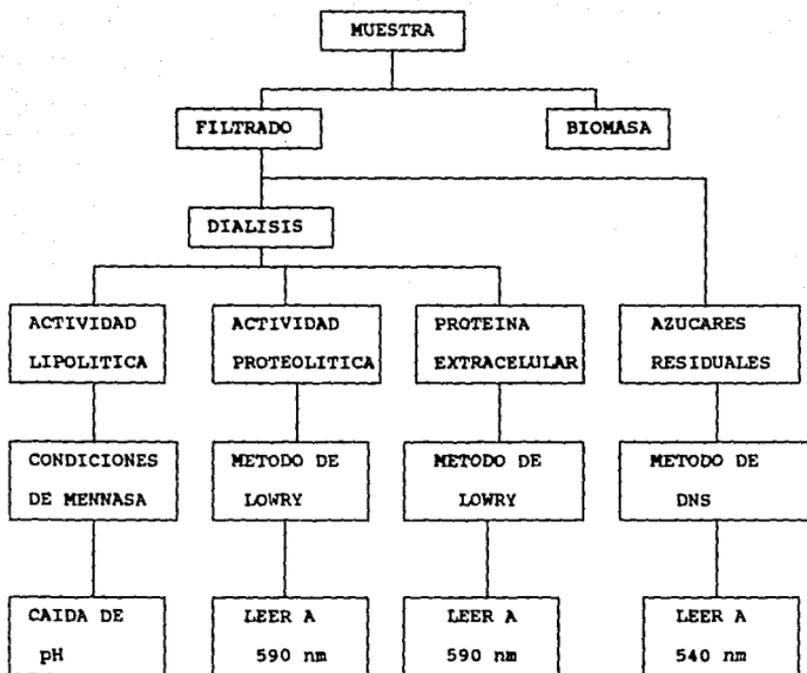


Figura 3 TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

1) Filtrado.

El filtrado de las muestras se hizo por medio del sistema Millipore, con filtros Whatman No 1, con diámetro de 4.25 cms.

Antes de utilizar los papeles filtro, deben secarse durante 24 horas en una estufa a 60°C y pesarse.

2) Biomasa.

La biomasa se cuantificó por peso seco. Las muestras se dejaron secar durante 24 horas a 60°C. Posteriormente, se pesaron y se les resta el peso del papel.

3) Diálisis.

El filtrado se dializó durante 24 horas, en frío y contra agua destilada.

4) Actividad Lipolítica.

La actividad lipolítica se midió por caída de pH, en las condiciones propuestas por Menassa y Lamberet (1982).

El sustrato consistió en una emulsión de tributirina al 5% en presencia de 0.01% de Tween 80.

El amortiguador empleado fue de Tris-Maleatos 2.5 mM, a pH 6.0.

Para medir la actividad, se utilizó un baño a 37°C. En un tubo grande (30 ml), se pusieron 7 ml de amortiguador, 2 ml de emulsión de tributirina y 1 ml de enzima (filtrado dializado). Se agitó constantemente, se leyó el pH inicial y posteriormente,

cada minuto durante cinco minutos, se tomó nota de la caída del pH. La actividad se reportó como micromoles de ácido butírico liberadas por mililitro de enzima en un minuto.

La obtención de las micromoles de ácido butírico fue a través de una curva patrón de dicho ácido, a una concentración de 0.5%.

5) Proteína Extracelular.

La proteína extracelular se midió por el método de Lowry et al (1951).

En tubos de ensaye, se pusieron 0.5 ml de muestra y se llevaron a 1 ml con agua destilada.

Se adicionaron 5 ml de reactivo E y se agitó en el vortex.

Se dejó reposar durante 10 minutos.

Se adicionaron 0.5 ml de reactivo de Folin y se agitó en el vortex.

Se dejó reposar durante 30 minutos.

Se leyó en el espectrofotómetro a 590 nm.

La proteína se cuantificó al comparar con una curva patrón de albúmina sérica de bovino (500 mg/ml).

Reactivos de Lowry:

a) Reactivo A: sulfato de cobre (Baker) al 1% en agua destilada.

b) Reactivo B: tartrato doble de sodio y potasio (Difco) al 2% en agua destilada.

- c) Reactivo C: Sosa 0.1 N más carbonato de sodio al 2%. Para prepararlo, se disuelven 4.0 g de sosa en 800 ml de agua destilada y posteriormente, se adicionan 20 g de carbonato de sodio. Se afora a un litro.
- d) Reactivo D: tiene una parte del reactivo A y otra del B.
- e) Reactivo E: Tiene una parte del D y 50 partes del C.
- f) El reactivo de Folin se prepara en una proporción 1:1 con agua destilada.

6) Actividad Proteolítica. (Fukumoto, et al, 1967)

En tubos de ensaye, se pone 1 ml de muestra y 2 ml de caseína al 2% en amortiguador de fosfatos a pH 7.0.

Se incuban durante 30 minutos a 37°C, en agitación constante.

Se agregan 4 ml de ácido tricloroacético al 5%.

Se centrifugan las muestras a 8,000 rpm durante 10 minutos.

Con el sobrenadante, se sigue el tratamiento de la muestra por la técnica de Lowry, en este caso se compara con una curva patrón de tirosina (100 mg/ml). La actividad proteolítica se reporta como miligramos de tirosina liberados por mililitro (mg/ml)

7) Azúcares residuales. (Summer y Howell, 1935)

Los azúcares residuales se midieron por el método del DNS (ácido dinitrosalicílico, Kodak), que consiste en:

En tubos de ensaye, se pone 1 ml de muestra y se adiciona 1 ml de reactivo DNS. Se agita en el vortex.

Las muestras se ponen a hervir en baño María durante cinco minutos, los tubos se tapan con canicas para evitar evaporación de las muestras).

Se agregan 10 ml de agua destilada a cada tubo, se agita en el vortex y se deja reposar durante 30 minutos.

Se leen las muestras en el espectrofotómetro (Bausch & Lomb) a 540 nm.

Debe prepararse con este mismo tratamiento un blanco con agua destilada.

Para obtener la concentración de azúcares, se compara con una curva patrón de glucosa 2 mg/ml.

La composición del reactivo de DNS es la siguiente:

Se pesan 16 g de sosa, 300 g de tartrato de sodio y potasio y 10 g de DNS.

En un matraz aforado de un litro, se ponen 500 ml de agua destilada y se agregan uno a uno en el orden presentado, todos los reactivos.

Se afora a un litro, y se calienta ligeramente para lograr la completa disolución.

Se guarda el reactivo en frasco ámbar porque es sensible a la luz. Debe mantenerse a 4°C. Tiene una vida media de aproximadamente 30 días.

- 8) La 2-deoxi-D-glucosa utilizada en algunos experimentos, se esterilizó a 121°C durante 15 minutos. La cicloheximida se

esterilizó con filtros millipore y se añadió al medio de cultivo ya estéril. Ambos reactivos fueron de Sigma.

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSION.

1 Cinéticas obtenidas con glucosa y/o dextrinas al 1% como fuentes de carbono.

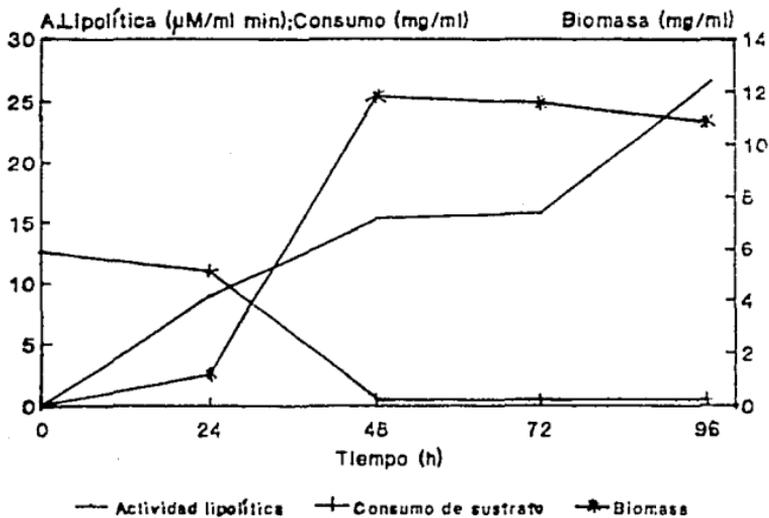
Se realizaron cinéticas con diferentes fuentes de carbono. Se compararon las actividades lipolítica y proteolítica con glucosa al 1% (control), dextrinas al 1% y glucosa y dextrinas al 0.5%. Estas cinéticas se hicieron dados los antecedentes de que la producción de actividad lipolítica es mayor en presencia de dextrinas (Espinosa, et al, 1990).

De estas comparaciones, podría deducirse si la síntesis de estas enzimas está o no asociada al crecimiento y en qué momento en relación al consumo de sustrato, se llega a la máxima producción de enzima.

a) Glucosa al 1%.

Con el medio D, se obtuvo la cinética que se muestra en la Gráfica 1. La producción de lipasas aumentó progresivamente, y alcanzó un máximo a las 96 horas de fermentación.

El consumo de sustrato llegó a ser casi total a las 48 horas. Es importante destacar que entre el segundo y el tercer día, el nivel de lipasas se mantiene más o menos constante pero al cuarto ya se aprecia un aumento en la actividad, lo que coincide con el hecho de que ya casi no hay glucosa en el medio. Esto sugeriría una inactivación o inhibición de la enzima por la glucosa, fenómeno que se analizará más adelante.



GRAFICA 1. Cinéticas de actividad lipolítica, consumo de sustrato y crecimiento (biomasa) en medio D, con glucosa al 1%.

El crecimiento fue en aumento a lo largo de la fermentación, aunque llegó a disminuir ligeramente al final de la misma.

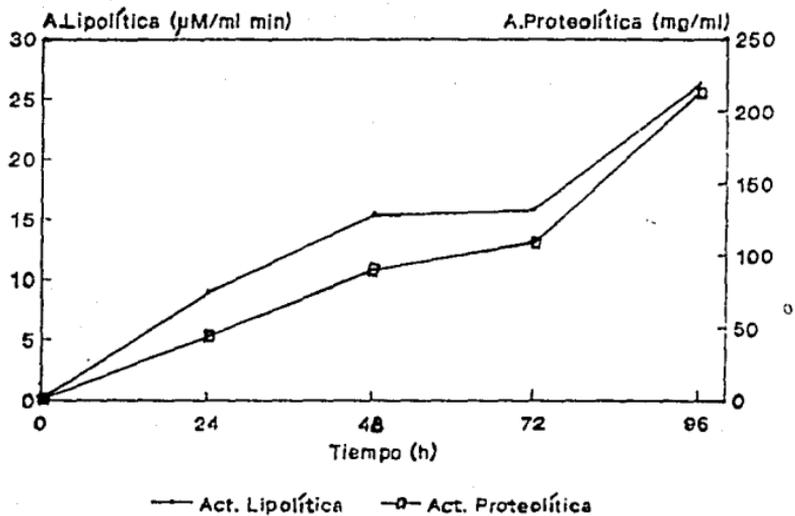
En la Gráfica 2, se puede observar que las cinéticas de producción de lipasas y de proteasas son muy similares; en ambos casos se llega a un máximo a las 96 horas de fermentación. Esto apoyaría aún más la hipótesis ya mencionada de que ambas enzimas poseen mecanismos de regulación similares, tal como sugiere Arends, et al (1986).

b) Dextrinas al 1%.

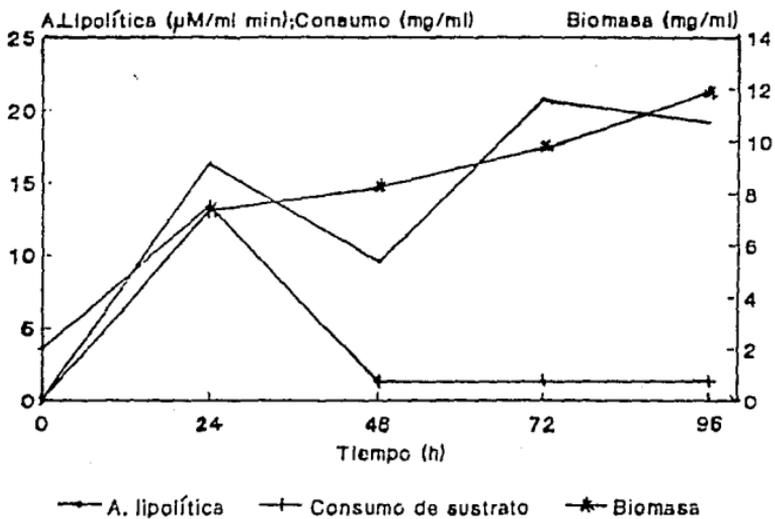
Se decidió seguir la cinética con dextrinas para establecer como ya se había mencionado, una comparación con la cinética anterior. Como con dextrinas se obtiene una mayor actividad lipolítica, podría ser que bajo estas condiciones el mecanismo de regulación fuera diferente.

La Gráfica 3 muestra que en este caso se presentan dos picos de actividad lipolítica: uno a las 24 horas y otro a las 72 horas. Estos datos son importantes, ya que *R. delmar* es capaz de sintetizar tres lipasas diferentes, dos de las cuales son interconvertibles (Iwai y Tsujisaka, 1974). Probablemente, cada pico corresponda a dos enzimas diferentes, aspecto que deberá ser confirmado.

El consumo de azúcares reductores presenta un comportamiento diferente al encontrado con glucosa. La aparente irregularidad presente a las 24 horas, se puede explicar por la



GRAFICA 2. Comparación de las cinéticas de actividades lipolítica y proteolítica obtenidas en medio D, con glucosa al 1%.

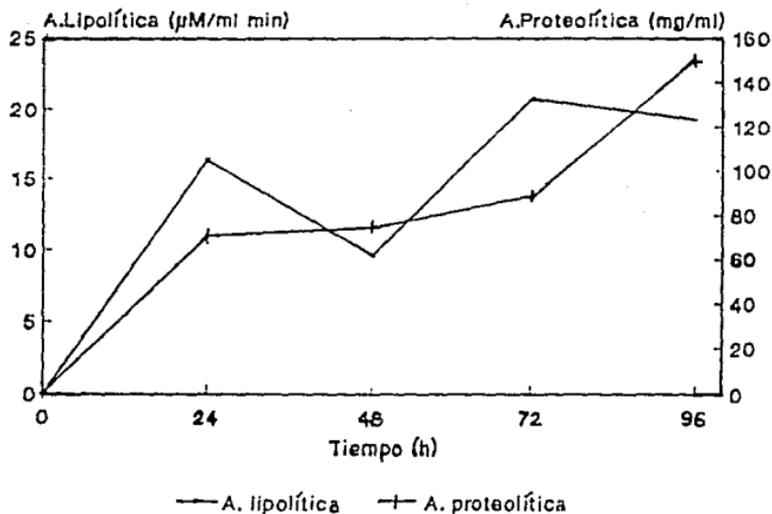


GRAFICA 3. Cinéticas de actividad lipolítica, consumo de sustrato y crecimiento (biomasa) en medio D, con dextrinas al 1%.

estructura de las dextrinas. Estas son producto de la hidrólisis parcial de la amilopeptina, que es un polisacárido con mil o más unidades de glucosa por molécula. Al hidrolizarse las dextrinas, se obtienen como productos los disacáridos maltosa e isomaltosa. Finalmente, al hidrolizarse éstos, se obtienen monómeros de glucosa.

Al principio, es lógico detectar poca concentración de glucosa libre, ya que el organismo todavía no ha desdoblado el polisacárido. Posteriormente, se percibe una mayor cantidad de glucosa porque ya actuaron las enzimas del hongo encargadas de hidrolizar las dextrinas. Sería útil corroborar la actividad amilolítica de *Rhizopus delemar*, la cual está reportada en el género. (Ashikari, et al, 1986). En este caso, el consumo de la fuente de carbono llegó a ser casi total a las 48 horas, situación también presente en el caso anterior analizado con la glucosa al 1% como fuente de carbono. Es importante recordar que el método de medición de azúcares reductores es incapaz de detectar dextrinas y por lo tanto, pueda ser que a las 48 horas de fermentación, aún haya dextrinas no hidrolizadas que el microorganismo probablemente no pudo aprovechar. Este punto podría aclararse si se hiciera el estudio ya mencionado en relación con la actividad amilolítica.

En la Gráfica 4, se presenta una comparación de las cinéticas de producción de lipasas y proteasas. En este caso, el comportamiento no es similar, la actividad proteolítica presenta sólo un máximo de actividad a las 96 horas, lo que



GRAFICA 4. Comparación de las cinéticas de actividades lipolítica y proteolítica obtenidas en medio D, con dextrinas al 1%.

lleva a postular la hipótesis de que en estas condiciones el control de la síntesis de enzimas no es similar, o bien, que se trata de otra lipasa.

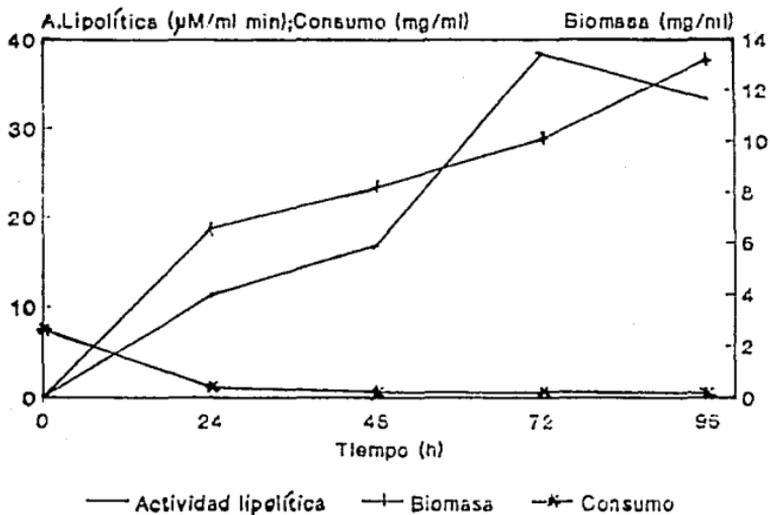
c) Glucosa y Dextrinas al 0.5%

Se decidió hacer una cinética con ambas fuentes de carbono con el objetivo de observar si el efecto negativo de la glucosa se presentaba en presencia de dextrinas.

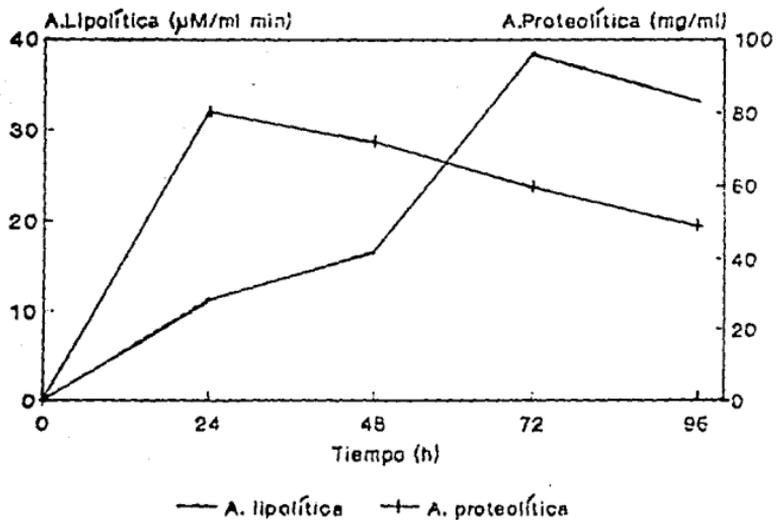
Se probaron glucosa y dextrinas juntas como fuente de carbono al 1%, para ver el comportamiento de la cinética de producción. Los resultados se muestran en las Gráficas 5 y 6.

La actividad lipolítica presentó solamente un máximo de actividad a las 72 horas. El pico a las 24 horas obtenido en la Gráfica 3 no se apreció. Este resultado es importante porque es probable que, si cada pico correspondiera efectivamente a enzimas diferentes, la producida con dextrinas a las 24 horas podría decirse que es sensible a la glucosa libre presente cuando se utilizan juntas glucosa y dextrinas. El pico de actividad lipolítica detectado a las 72 horas, presente en las Gráficas 4 y 6 se aprecia cuando casi todo el sustrato ha sido consumido.

La Gráfica 6 muestra la comparación de las cinética de producción de lipasas y proteasas. El comportamiento de las proteasas es un poco irregular, ya que disminuyen al final de la fermentación. Este comportamiento es diferente del encontrado en los dos casos anteriores, ya que en éstos, se apreció una actividad proteolítica máxima a las 96 horas.



GRAFICA 5. Cinéticas de actividad lipolítica, consumo de sustrato y crecimiento (biomasa) en medio D, con glucosa y dextrinas al 0.5%.



GRAFICA 6. Comparación de las cinéticas de actividades lipolítica y proteolítica obtenidas en medio D, con glucosa y dextrinas al 0.5%.

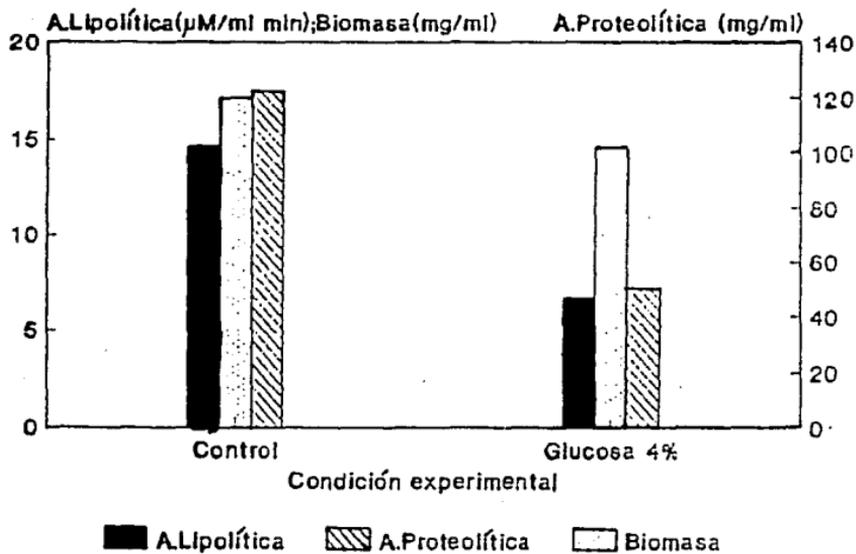
2 Efecto Negativo de Glucosa.

Para iniciar el análisis del efecto ejercido por la glucosa sobre la producción de lipasas y proteasas, se procedió a probar concentraciones bajas y altas de dicho carbohidrato y se cuantificaron los niveles obtenidos de ambas enzimas en cada caso.

En la Gráfica 7 se muestran los niveles de actividad lipolítica y crecimiento obtenidos en el medio D con 1% (control) y 4% de glucosa.

Como puede apreciarse, la producción de lipasas disminuye aproximadamente en un 40% cuando hay 4% de glucosa. Por otro lado, el crecimiento también disminuye, pero en menor proporción (15%). Esto último puede deberse a que la propia glucosa conduce el metabolismo hacia la formación de ácidos (por glucólisis y ciclo de Krebs) y por lo tanto disminuye considerablemente el pH. La acidez probablemente provoque que el microorganismo no se desarrolle como en sus condiciones óptimas de crecimiento, lo cual repercute en la cuantificación de la biomasa. La actividad lipolítica específica también es menor cuando se utiliza glucosa al 4%.

También se muestran en la Gráfica 7 los datos obtenidos bajo las mismas condiciones, de actividad proteolítica. Los niveles de proteasas en presencia del 4% de glucosa son aproximadamente 60% menores que en el control. Este dato es importante, porque hay que recordar que las proteasas provocan sabores amargos a los substratos lácteos, lo cual es indeseable



GRAFICA 7. Comparación de actividad lipolítica, actividad proteolítica y crecimiento (biomasa) obtenidos a las 96 horas de fermentación, con glucosa al 1% o al 4% en medio D.

para los fines de aplicación que se buscan para las lipasas. Cabe mencionar una vez más la teoría propuesta por Arends et al (1986) la cual sugiere que, probablemente, tanto la lipasa como la proteasa están reguladas por los mismos factores, que pueden presentarse a nivel de transcripción o traducción. Este aspecto es importante porque al menos en presencia de glucosa al 4% , la producción de ambas enzimas disminuye en comparación con el control. Podría ser que en *R. delemar* esta situación se presente.

Por otro lado, es probable que la proporción carbono/nitrógeno en el medio de cultivo, influya en el metabolismo del microorganismo. Sattur y Karanth (1989) reportan que para *Rhodotorula gracilis*, esta proporción es importante porque al aumentar, permite mejorar los rendimientos de producción de los lípidos. En este organismo también influye la concentración de glucosa, que debe ser baja. Si la proporción carbono/nitrógeno es alta, el nitrógeno es escaso y por lo tanto, es consumido rápidamente. Bajo estas condiciones, el carbono es utilizado principalmente para la síntesis de lípidos por este organismo en particular.

Con este experimento queda comprobado que las altas concentraciones de glucosa, afectan negativamente tanto los niveles de lipasas como los de proteasas.

Las preguntas que quedan por resolver son:

- a. ¿Es la glucosa *per se* la causante del efecto?
- b. Si se considera que *R. delemar* produce dos lipasas

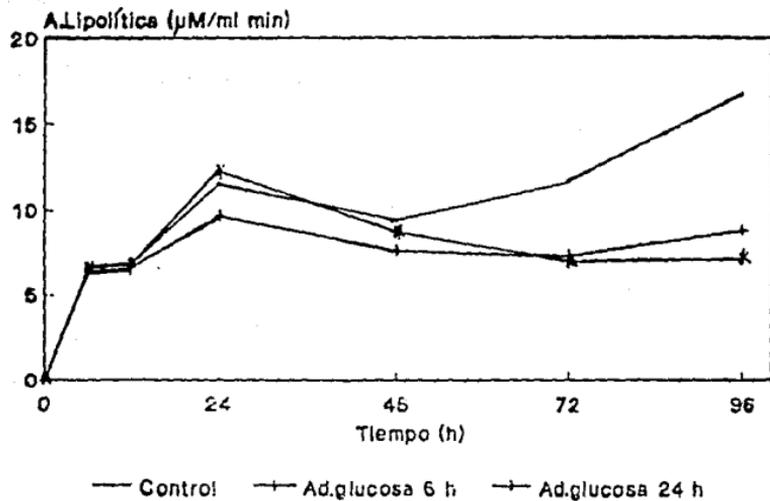
diferentes, ¿cuál de ellas es la afectada? ¿O están afectadas ambas?

- c. ¿El efecto observado es un fenómeno de inhibición o de represión?
- d. ¿La glucosa afectará de la misma forma si se adiciona en horas tempranas o tardías de la fermentación?

3. Cinéticas obtenidas por adición de glucosa al 1% a las 6 ó 24 horas.

Al conocer las cinéticas con glucosa y con dextrinas, se procedió a seguir otra cinética, pero esta vez, se adicionó glucosa a diferentes tiempos. Se decidió añadirla antes y después de las 24 horas de fermentación, dados los antecedentes de que en este momento se presenta un pico de actividad lipolítica, cuando se emplean dextrinas como fuente de carbono. Por otro lado, es importante recordar que después de las 24 horas de fermentación, tanto con glucosa como con dextrinas, se llegó a consumir casi en su totalidad el sustrato, por lo que se pensó que este era un buen momento para añadirla. También se decidió adicionarla a las 6 horas porque en este momento, el nivel de glucosa en el medio aún era elevado y probablemente el exceso del carbohidrato conduciría a la obtención de datos interesantes.

En la Gráfica 8 se muestra la comparación de las cinéticas de producción de lipasas obtenidas con el control (sin adiciones), y al adicionar glucosa a las 6 horas y a las 24



GRAFICA 8. Cinéticas de actividad lipolítica obtenidas sin adición de glucosa (control) y con adiciones (1%) a las 6 o a las 24 horas.

horas. Como puede apreciarse, al hacer la adición a las 6 horas, los niveles de actividad lipolítica son menores que los obtenidos en el control. A las 96 horas hay un ligero aumento en la actividad, pero no llega a alcanzar los niveles del control.

Cuando se adicionó glucosa a las 24 horas, se observó un descenso en la actividad lipolítica posterior a dicha adición. Tampoco llegó en este caso a alcanzar los niveles del control a las 96 horas.

Dado lo anterior, queda claro que la glucosa afecta la síntesis de las lipasas, ya sea que se agregue a las 6 o a las 24 horas de fermentación. Estos resultados parecerían indicar que la síntesis de lipasas se presenta en horas muy tempranas de la fermentación y probablemente, que la glucosa al ser agregada, ejerce un efecto inhibitorio sobre las enzimas ya sintetizadas.

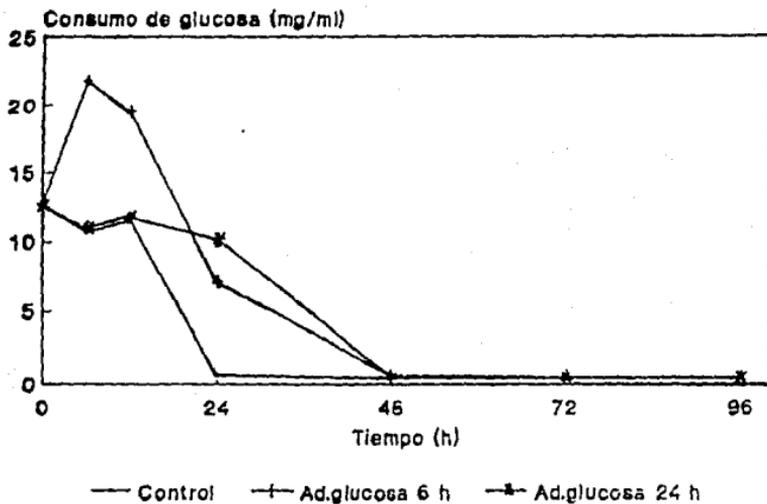
En la Gráfica 9 se presentan las cinéticas de consumo de sustrato del mismo experimento. En el caso del control, el consumo de glucosa fue casi total a las 48 horas aunque ya a las 24 se detectó una concentración pequeña de azúcar. En el caso de las adiciones a las 6 y 24 horas, el consumo también fue casi total a las 48 horas. En estos dos últimos casos, la concentración de glucosa presente a las 6 y 24 horas de la fermentación resulta ser mayor que en el control debido a las adiciones.

En la Gráfica 10 se muestran las cinéticas correspondientes a la actividad proteolítica. Al adicionar la glucosa tanto a

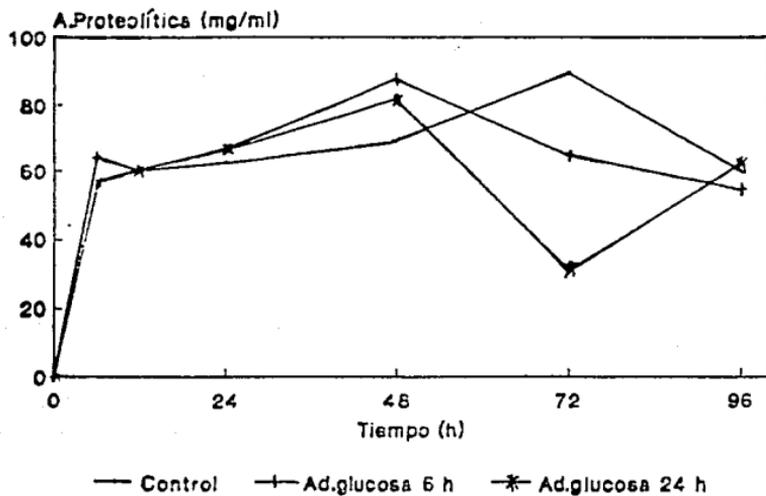
las 6 como a las 24 horas, la actividad disminuye después de las 48 horas de fermentación, mientras que como se recordará, en el caso de las lipasas, la disminución se detectó después de las 24 horas. Cuando se adicionó glucosa a las 24 horas se observó en la actividad proteolítica, una recuperación al final de la fermentación (96 horas) que llegó a los niveles del control. Si se retoma nuevamente la teoría de Arends et al (1986) sobre un posible control común de las lipasas y proteasas, podríamos considerar que en el caso particular de *Rhizopus delemar* se puede presentar un mecanismo regulatorio similar, dados los resultados obtenidos con las mismas enzimas.

Conviene obtener un alto nivel de lipasas y uno bajo de proteasas, ya que estas últimas generan sabores amargos y por tanto indeseables. Al analizar cuidadosamente las cinéticas de actividad proteolítica (Gráfica 10), se puede apreciar que al adicionar glucosa a las 24 horas, se obtuvo una actividad baja a las 72 horas. Sin embargo, la actividad lipolítica en este momento (Gráfica 8) es también baja en comparación con el control.

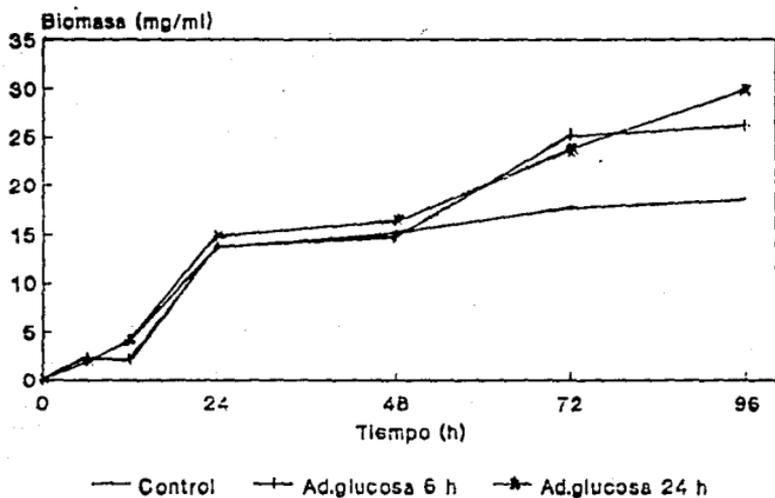
En cuanto al crecimiento, se obtuvo mayor peso seco cuando se hicieron las adiciones de glucosa en comparación al control (Gráfica 11) Estos resultados son lógicos, ya que la disponibilidad de mayor cantidad de glucosa probablemente permite que el metabolismo se dirija hacia un aumento de biomasa y no hacia la síntesis de compuestos que en esas condiciones no le son útiles, pues no hay en el medio otros sustratos.



GRAFICA 9. Cinéticas de consumo de glucosa obtenidas sin adición de glucosa (control) y con adiciones (1%) a las 6 o a las 24 horas.



GRAFICA 10. Cinéticas de actividad proteolítica obtenidas sin adición de glucosa (control) y con adiciones (1%) a las 6 o a las 24 horas.



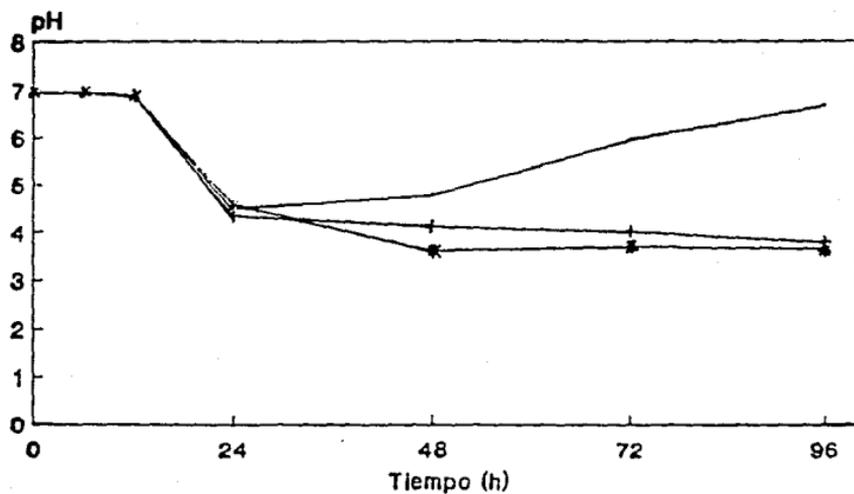
GRAFICA 11. Cineticas de crecimiento obtenidas sin adición de glucosa (control) y con adiciones (1%) a las 6 o a las 24 horas.

En la Gráfica 12 se presentan las variaciones en el pH a lo largo de la fermentación. El pH disminuye en los tres casos durante las primeras 24 horas de cultivo, ya que el metabolismo propio de la glucosa, a través de la glucólisis y del ciclo de Krebs, provoca la liberación de diversos ácidos orgánicos (Robbins y Taylor, 1989). En el caso del control el pH sube gradualmente, ya que el consumo de glucosa es casi total a las 48 horas. El pH en las cinéticas de adición a las 6 y a las 24 horas permanece prácticamente constante después de las 24 horas. De acuerdo con lo reportado por Iwai y Tsujisaka (1974), el pH óptimo de las enzimas de *R. delensar* es de 5.6 por lo que probablemente la acidez detectada al adicionar glucosa, tanto a las 6 como a las 24 horas, repercute en las actividades lipolíticas obtenidas.

4 Efecto *in vitro* de glucosa en la actividad lipolítica.

Con el objetivo de definir si el fenómeno ejercido por la glucosa es o no inhibición, se decidió probar concentraciones de 1 y 4% de dicho monosacárido directamente sobre la actividad enzimática. Los resultados se presentan en la Tabla 10.

Como puede apreciarse, las diferencias no son significativas, ya que las variaciones entre los datos son menores a una unidad de actividad lipolítica. Además, se hizo un análisis de varianza con un nivel de significancia de 0.05 y los resultados indicaron que no hay diferencias entre las medias.



— Control —+ Ad.glucosa 6 h —* Ad.glucosa 24 h

GRAFICA 12. Variación obtenida en el pH a lo largo de la fermentación cuando no se adiciona glucosa (control) y cuando si se adiciona (1%) a las 6 o a las 24 horas.

Tabla 10. Efecto de glucosa *in vitro* en la actividad lipolítica.

Concentración de glucosa (%)	Actividad lipolítica ($\mu\text{M}/\text{ml min}$)
0	20.73
1	21.45
4	21.60

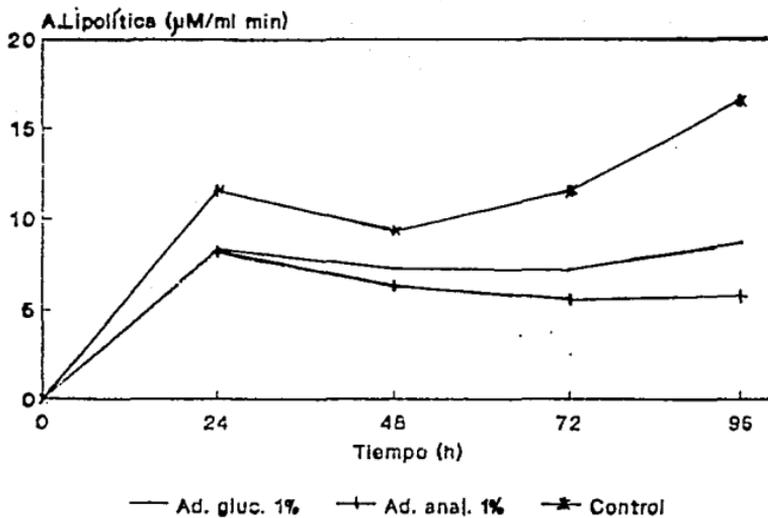
Con este experimento, queda demostrado que el fenómeno no es de inhibición. Es importante indicar que en este caso, no hay problemas de transporte y difusión de la glucosa porque la enzima se encuentra ya fuera de la célula (para este experimento, se utilizó la muestra dializada, lo que concentró la enzima). La enzima es por lo tanto, capaz de tener contacto con toda la glucosa adicionada; las concentraciones de ésta son muy altas y aún así, no se detectan diferencias en las actividades.

5 Efecto de la 2-deoxi-D-glucosa en las cinéticas.

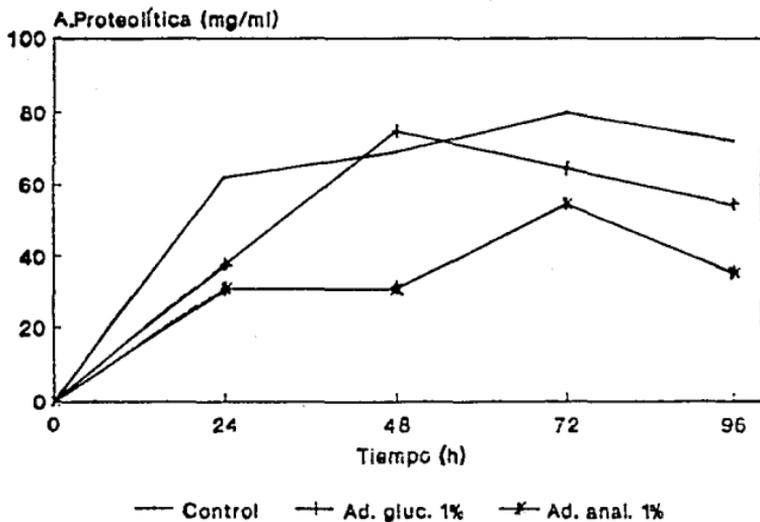
Con el objetivo de determinar si es o no la molécula de glucosa *per se* la causante del fenómeno, se decidió seguir unas cinéticas similares a las de adición de glucosa, pero se utilizó en vez de ésta un análogo estructural no metabolizable. Las adiciones se hicieron también a las 6 y a las 24 horas de fermentación.

En la Gráfica 13 se presentan las cinéticas de producción de actividad lipolítica al adicionar glucosa o el análogo al 1% a las 6 horas. El comportamiento en ambas adiciones es prácticamente paralelo, aunque los niveles de actividad obtenidos en el caso del análogo, dada su característica de ser no metabolizable, son menores.

La Gráfica 14 muestra las cinéticas obtenidas para la actividad proteolítica bajo las mismas condiciones de la gráfica anterior. Como puede apreciarse, tanto la glucosa como el



GRAFICA 13. Cinéticas de actividad lipolítica obtenidas sin adición de glucosa (control) y con adición de glucosa o análogo (2-deoxi-D-glucosa) al 1% a las 6 horas.



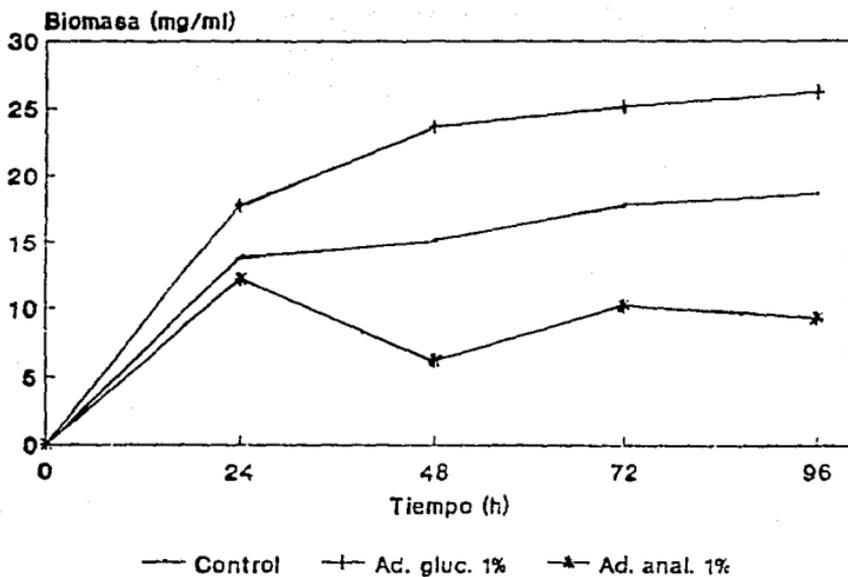
GRAFICA 14. Cinéticas de actividad proteolítica obtenidas sin adición de glucosa (control) y con adición de glucosa o análogo (2-deoxi-D-glucosa) al 1% a las 6 horas.

análogo provocan un descenso en la actividad al final de la fermentación (a partir de las 72 horas) en comparación con el control. Sin embargo, en los otros puntos de la cinética, hubo variaciones y el comportamiento entre adición de glucosa y de análogo no fue paralelo, lo que podría indicar que en el caso de la regulación de proteasas, no es la molécula de glucosa *per se* la causante del efecto negativo.

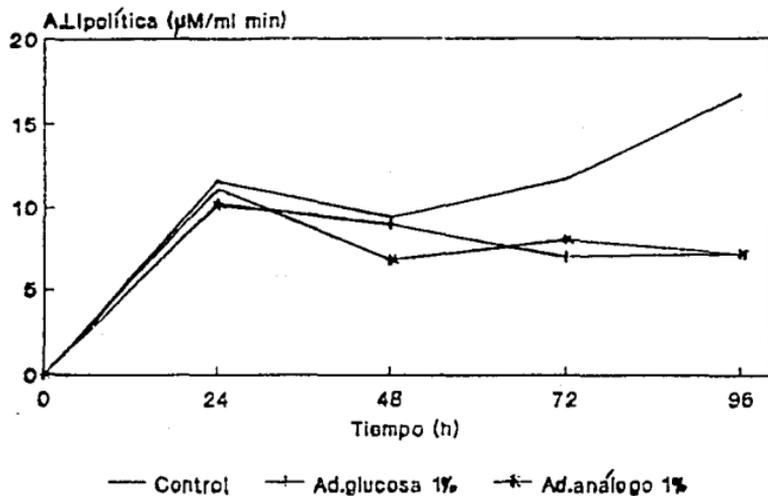
En cuanto al crecimiento, la Gráfica 15 muestra que fue mayor cuando se adicionó glucosa que en el caso del control. Con el análogo, el crecimiento fue muy pobre. Estos datos se reflejan en la actividad lipolítica específica (datos no mostrados) ya que como el análogo no es metabolizable, el crecimiento es poco y la actividad pareciera ser alta pero esto es consecuencia el escaso crecimiento.

En la Gráfica 16 se presentan los resultados de actividad lipolítica para el caso de las adiciones a las 24 horas. También en este caso, el desarrollo de las cinéticas con glucosa y con el análogo son muy parecidas, se llegó a obtener a las 96 horas, el mismo valor de actividad.

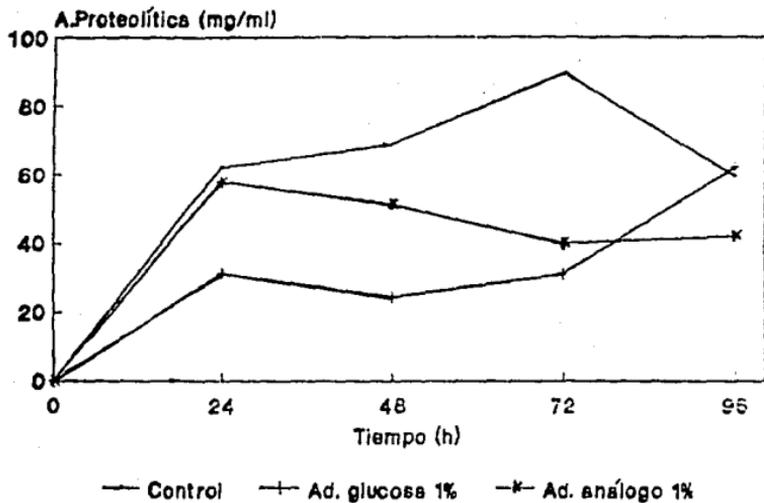
La Gráfica 17 presenta los resultados obtenidos para el caso correspondiente a la actividad proteolítica. Tanto la adición de glucosa como la del análogo, impiden obtener actividades tan altas como las del control a las 72 horas. En el caso de la adición de glucosa, se observa una recuperación al final de la fermentación (96 horas) que llega a los títulos del control. Con el análogo, la actividad permaneció constante de las 72 a



GRAFICA 15. Cinéticas de crecimiento obtenidas sin adición de glucosa (control) y con adición de glucosa o análogo (2-deoxi-D-glucosa) al 1% a las 6 horas.



GRAFICA 16. Cinéticas de actividad lipolítica obtenidas sin adición de glucosa (control) y con adición de glucosa o análogo (2-deoxi-D-glucosa) al 1% a las 24 horas.



GRAFICA 17. Cinéticas de actividad proteolítica obtenidas sin adición de glucosa (control) y con adición de glucosa o análogo (2-deoxi-D-glucosa) al 1% a las 24 horas.

las 96 horas.

En la Gráfica 18 se presenta la cinética de crecimiento. De modo similar al caso de adiciones a las 6 horas, se observó que con la adición de glucosa el crecimiento fue mayor que en el control. Con el análogo, el crecimiento disminuyó a lo largo de la fermentación. Hay que recordar que el análogo es un compuesto "tóxico" para las células y por lo tanto, el microorganismo es incapaz de desarrollarse plenamente. Al igual que en la adición a las 6 horas, el poco crecimiento afecta la actividad lipolítica específica obtenida (datos no mostrados) ya que ésta aumenta como consecuencia del escaso crecimiento en el caso del análogo y disminuye en el caso de la glucosa, dado que la producción de biomasa es mayor.

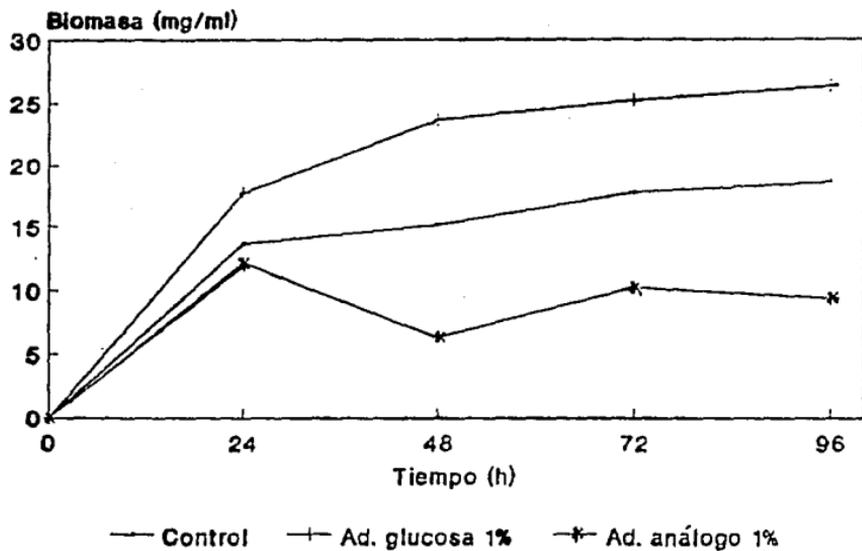
La similitud de comportamiento indica que la molécula de glucosa *per se* puede ser la responsable del efecto negativo sobre la síntesis de las lipasas.

6 Efecto de la adición de un inhibidor de síntesis de proteínas sobre la actividad lipolítica.

Hasta este momento, quedan claros dos aspectos importantes:

- a) No es un fenómeno de inhibición.
- b) La molécula de glucosa *per se* puede ser la responsable del efecto negativo detectado.

Dado lo anterior, se procedió a seguir la cinética, en este caso al adicionar un inhibidor de la síntesis de proteínas (cicloheximida, 100 µg/ml), para determinar si se trata de un

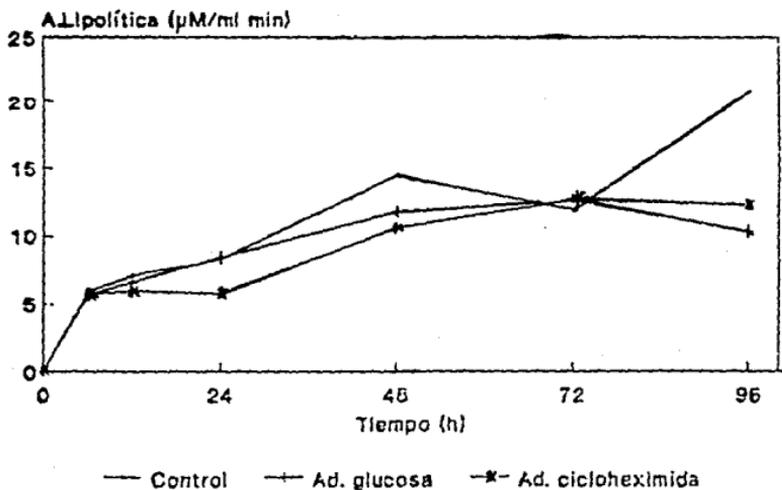


GRAFICA 18. Cinéticas de crecimiento obtenidas sin adición de glucosa (control) y con adición de glucosa o análogo (2-deoxi-D-glucosa) al 1% a las 24 horas.

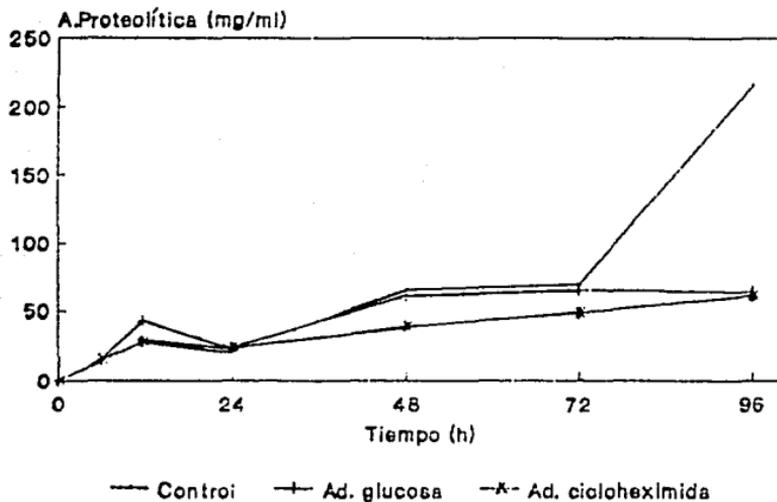
fenómeno de represión. En el mecanismo de represión de enzimas, existen una o más moléculas (repressor) que interfieren con la transcripción y por lo tanto, disminuye la síntesis de dichas proteínas. Si se adiciona un inhibidor de la síntesis de proteínas, se esperaría, análogamente al caso de la represión, que disminuyera la concentración de enzimas dado que se detiene su síntesis. Por lo tanto, si se obtiene un comportamiento parecido en las cinéticas de adición de glucosa y de inhibidor, la hipótesis de que es un fenómeno de represión, quedaría justificada. Las adiciones del inhibidor se hicieron también a las 6 y a las 24 horas de fermentación.

La Gráfica 19 presenta la comparación de las cinéticas de actividad lipolítica obtenidas al adicionar glucosa o cicloheximida a las 6 horas. Como puede observarse, el comportamiento de ambas cinéticas es muy similar. En la Gráfica 20 se presentan los resultados obtenidos para la actividad proteolítica. En este caso, también se puede observar un comportamiento similar entre la adición de glucosa y de inhibidor.

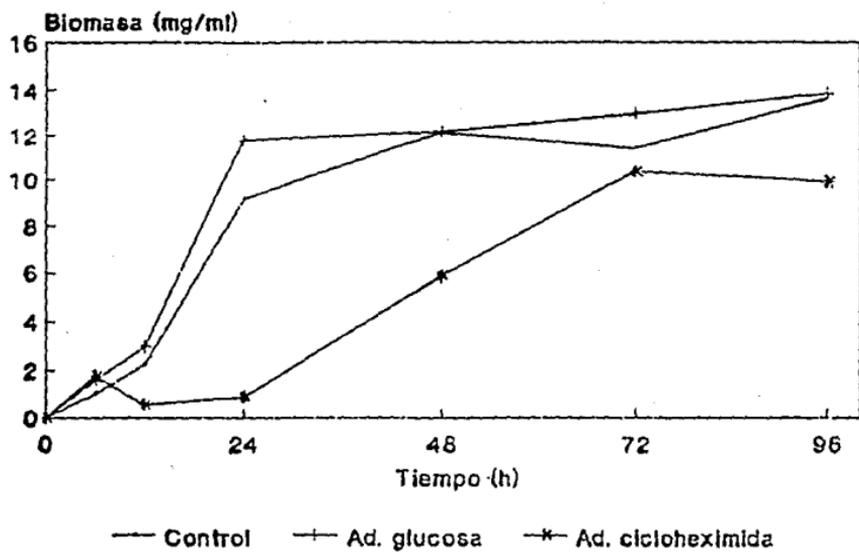
En la Gráfica 21 se presentan las cinéticas de crecimiento obtenidas. Cuando se adicionó la glucosa, se observó un crecimiento ligeramente mayor que en el control (a las 24 y 72 horas), mientras que la adición de cicloheximida provocó un notable efecto negativo. En este último caso, se observó una recuperación al final de la fermentación, pero no llegó a los niveles del control (a las 72 y 96 horas). Las actividades



GRAFICA 19. Cinéticas de actividad lipolítica obtenidas en medio D (control sin adiciones) y con adiciones de glucosa (1%) o de cicloheximida (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a las 6 horas.



GRAFICA 20. Cinéticas de actividad proteolítica obtenidas en medio D (control sin adiciones) y con adiciones de glucosa (1%) o de cicloheximida (100 $\mu\text{g/ml}$) a las 6 horas.



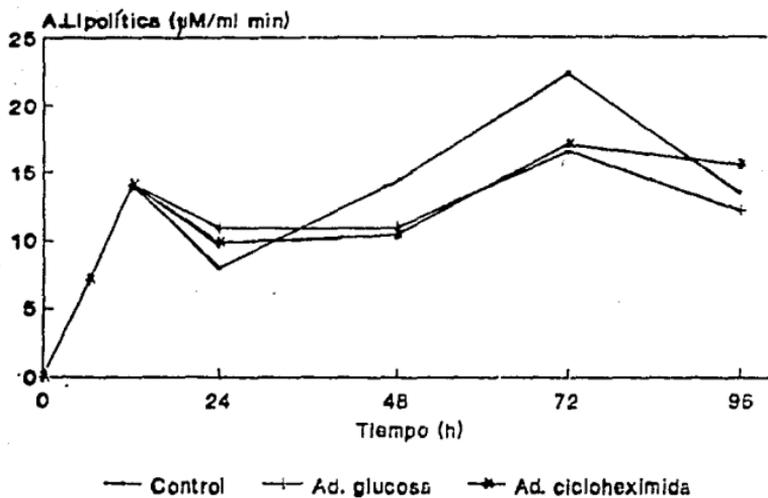
GRAFICA 21. Cinéticas de crecimiento obtenidas en medio D (control sin adiciones) y con adiciones de glucosa (1%) o de cicloheximida (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a las 6 horas.

lipolíticas específicas (datos no mostrados) para el caso de la adición del inhibidor de síntesis de proteínas parecen ser muy grandes, pero esto es reflejo nuevamente, del escaso crecimiento obtenido en esos momentos (primeras horas de fermentación).

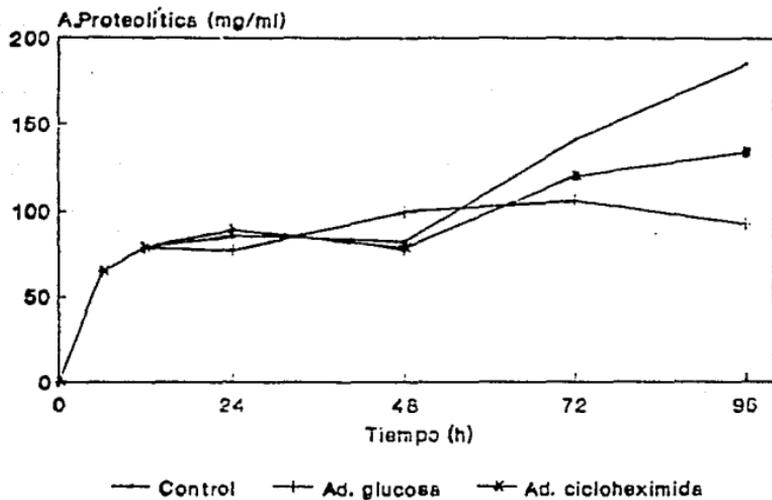
Las cinéticas de las adiciones a las 24 horas para la actividad lipolítica, se presentan en la Gráfica 22. En este caso, el comportamiento de ambas adiciones también es similar. En el caso de las proteasas (Gráfica 23) se observa también un comportamiento similar.

En la Gráfica 24 se presentan las cinéticas de crecimiento y como puede observarse, es mayor cuando se adiciona glucosa. La adición de cicloheximida afecta también en este caso, aunque al final de la fermentación (96 horas) se llega a los títulos del control. La adición del inhibidor de síntesis de proteínas afecta más sensiblemente al crecimiento del microorganismo si se añade a horas tempranas de la fermentación (6 horas), ya que como se recordará, el crecimiento en este caso se recuperó, pero no alcanzó al control a las 96 horas (Gráfica 21). Estos datos sugieren que la síntesis de proteínas necesarias para obtener un crecimiento comparable al control se presenta en la primeras horas de la fermentación, ya que si se adiciona la cicloheximida a las 24 horas, el crecimiento llega a ser muy similar al alcanzado con el control.

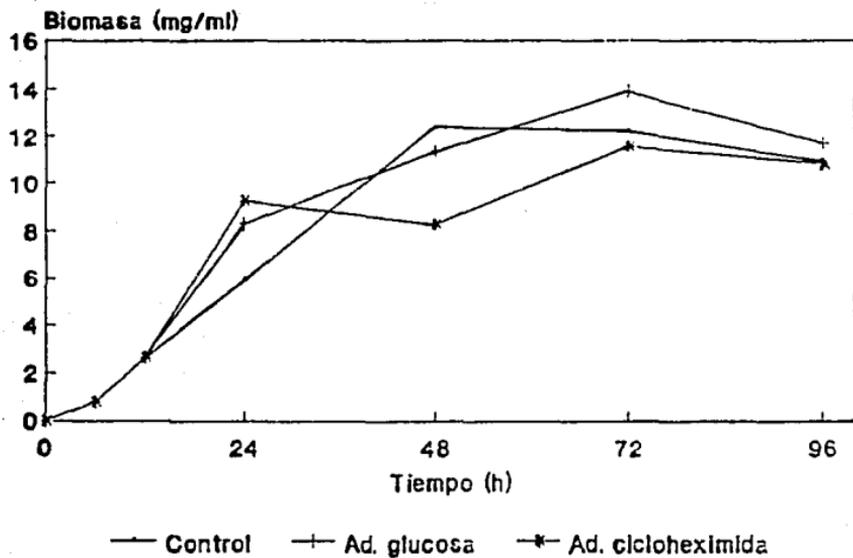
Con la adición de cicloheximida a las 24 horas, las actividades lipolíticas específicas (datos no mostrados) presentan el comportamiento esperado, es decir, disminuyen con



GRAFICA 22. Cinéticas de actividad lipolítica obtenidas en medio D (control sin adiciones) y con adiciones de glucosa (1%) o de cicloheximida (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a las 24 horas.



GRAFICA 23. Cinéticas de actividad proteolítica obtenidas en medio D (control si adiciones) y con adiciones de glucosa (1%) o de cicloheximida (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a las 24 horas.



GRAFICA 24. Cinéticas de crecimiento obtenidas en medio D (control sin adiciones) y con adiciones de glucosa (1%) o de cicloheximida (100 μ g/ml) a las 24 horas.

la adición de glucosa y de cicloheximida.

De estos experimentos, se deduce que el fenómeno en cuestión sí es represión, aparentemente tanto para las lipasas como para las proteasas. Harrer, W. et al (1983) reportan un comportamiento similar en la síntesis de β -glucosidasa por *Trichoderma pseudokoningii*, ya que la glucosa reprime a dicha enzima.

7 Diseño de un medio químicamente definido.

El mecanismo de represión puede o no ser catabólico, es decir, que incluya los niveles dentro de la célula de AMP cíclico o de algún producto del catabolismo de la fuente de carbono, en este caso, la glucosa. Sin embargo, la concentración de AMP cíclico puede alterarse por la carga energética de la célula. Como el medio utilizado anteriormente era completo, se decidió probar un medio mínimo para ver si el comportamiento era o no similar.

Los estudios anteriores efectuados por Espinosa, et al (1990) indican que *R. delemar* no presenta una actividad lipolítica ni un crecimiento comparables a los obtenidos en el medio D si se substituyen los casaminoácidos por fuentes de nitrógeno como sales inorgánicas (nitrato de sodio, sulfato de amonio). Por otro lado, los compuestos orgánicos como la urea, tampoco permiten obtener actividades lipolíticas comparables al control. Probablemente, este microorganismo sea deficiente en

algunas enzimas que intervienen en el metabolismo del nitrógeno y requiera por lo tanto, de elementos más fácilmente asimilables, como es el caso de los aminoácidos.

Dado lo anterior, se decidió probar primero como fuentes de nitrógeno, diferentes combinaciones de aminoácidos y bases nitrogenadas . Se cuantificaron los efectos a través de la biomasa.

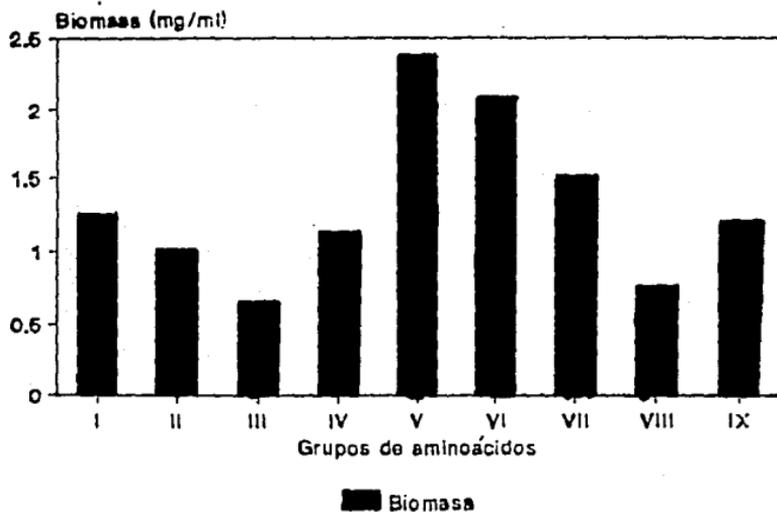
A continuación, se presentan los grupos de aminoácidos y bases empleados:

Tabla 11 Grupos de aminoácidos y bases probados como fuente de nitrógeno.

	I	II	III	IV	V
VI	Adenina	Guanina	Cys	Met	Uracilo
VII	His	Gly	Ile	Val	Lys
VIII	Phe	Tyr	Trp	Thr	Pro
IX	Glu	Ser	Ala	Asp	Arg

(Fuente: Sherman, et al, 1971)

La concentración utilizada fue de 30 µg/ml. Los resultados se presentan en la Gráfica 25. Como puede apreciarse, el crecimiento fue mayor en los grupos 5 y 6, los cuales contienen en común al uracilo. Ya que en ambos grupos se encontraban presentes tanto aminoácidos como bases nitrogenadas, se decidió probar dos combinaciones de estos elementos, se procuró que cada una contuviera compuestos representativos de todos los grupos de aminoácidos.



GRAFICA 25. Comparación del crecimiento obtenido con diferentes grupos de aminoácidos y bases nitrogenadas como fuente de nitrógeno.

La composición de elementos fue la siguiente (en porcentaje p/v):

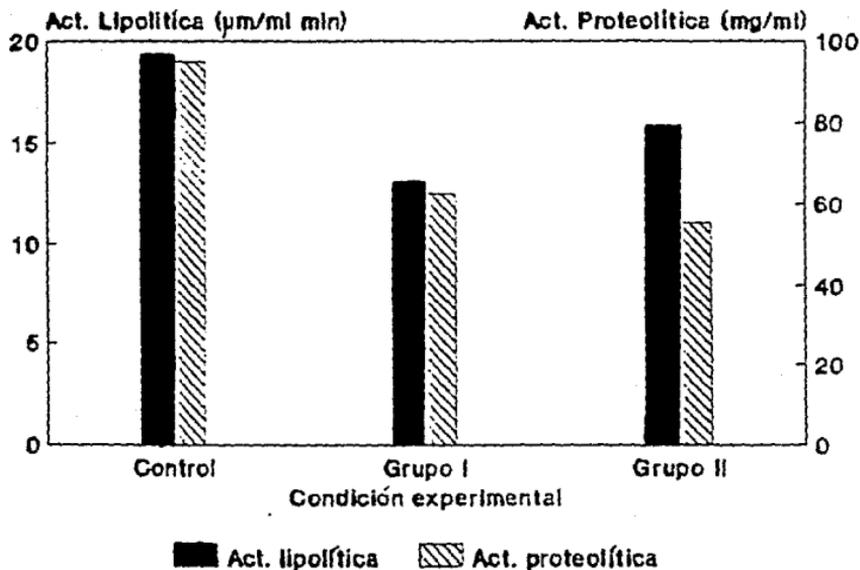
Tabla 12 Grupos de aminoácidos probados como fuente de nitrógeno

Grupo I		Grupo II	
Uracilo	0.3	Adenina	0.3
Lisina	0.15	Ac. Aspártico	0.15
Ac. Glutámico	0.2	Glicina	0.2
Treonina	0.2	Triptofano	0.2
Cisteína	0.2	Metionina	0.2

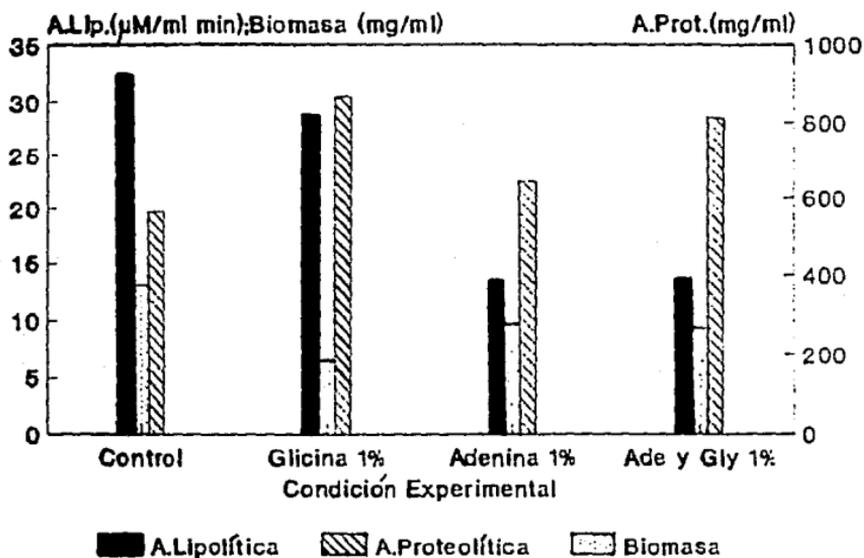
En la Gráfica 26 se presentan los resultados, comparados con el control. La actividad lipolítica fue mayor en el grupo II de aminoácidos, por lo que se decidió probar la glicina y la adenina, solas y en conjunto, como fuente de nitrógeno. Como se observa en la Gráfica 27 la mayor actividad lipolítica se presentó con la glicina, por lo que se decidió trabajar con ella en el medio mínimo.

8 Efecto de glucosa sobre la actividad lipolítica en un medio químicamente definido.

En la Gráfica 28 se puede observar que cuando se utiliza el medio mínimo en presencia de 1 y 4% de glucosa, los niveles tanto de lipasas como de proteasas, no se ven afectados. Esto contrasta con los resultados obtenidos en el medio completo.

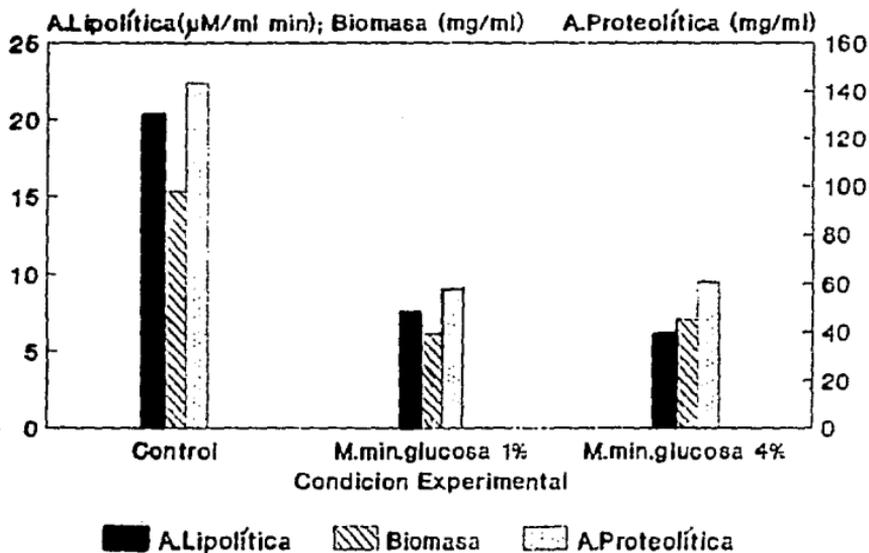


GRAFICA 20. Comparación de las actividades lipolítica y proteolítica obtenidas con casaminoácidos (Control) con dos grupos diferentes de aminoácidos como fuentes de nitrógeno.



GRAFICA 27. Comparación de la actividad lipolítica, actividad proteolítica y biomasa obtenidas con casaminoácidos (control) y con glicina y/o adenina como fuentes de nitrógeno

Una posible explicación es que en presencia de un medio rico o de uno mínimo, el metabolismo celular es diferente y ello se ve reflejado en los niveles alcanzados de ambas enzimas (Comparar Gráficas 7 y 28).



GRAFICA 28. Comparación de la actividad lipolítica, actividad proteolítica y biomasa obtenidas con medio D (control), medio mínimo con glucosa al 1% y medio mínimo con glucosa al 4%.

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.

Las conclusiones más importantes de este trabajo, son:

1. Las concentraciones altas de glucosa ejercen un efecto claramente negativo sobre la síntesis de lipasas y proteasas, cuando se utiliza un medio completo, pero no cuando se usa uno mínimo.
2. El fenómeno no es inhibición, sino represión, aparentemente tanto para las lipasas como para las proteasas.
3. La molécula de glucosa *per se* es la causante del efecto en condiciones energéticas altas (medio completo), por lo menos para el caso de las lipasas.
4. Dentro de las perspectivas, y si se considera que la glucosa es una fuente de carbono barata, está la posibilidad de utilizar cultivos alimentados, ya que las cinéticas mostraron que la adición de glucosa permite obtener un crecimiento mayor que sin adición por un lado y por otro, para evitar efectos negativos de la glucosa sobre la síntesis de lipasas. En *Streptomyces* se probó con éxito el uso de cultivos alimentados para la síntesis de proteasa extracelular (Gibb, et al, 1989).

Otra forma de evitar el efecto de la glucosa, es el aislamiento de mutantes insensibles. Se tienen reportes de obtención de mutantes con esta característica para *Trichoderma reesei* que sintetiza celulasa aún en presencia de altas concentraciones de glucosa o de glicerol (Kawamori, et al, 1985)

También se han obtenido mutantes insensibles a represión por glucosa en la levadura *Lipomyces kononenkoae* para la producción de α -glucoamilasa. (Van Uden, et al, 1980).

5. Otro aspecto fundamental, sería determinar si los dos picos de alta actividad lipolítica obtenidos con dextrinas como fuente de carbono, corresponden o no a dos enzimas diferentes. Para ello, sería necesario obtener enzimas de ambos picos y hacer una electroforesis para ver si tienen pesos moleculares diferentes. Se puede utilizar electroforesis en gel de poliacrilamida, posteriormente se puede hacer una impresión en un papel filtro impregnado con tributirina. El papel se revela y puede verse en dónde hay actividad lipolítica. Podrían hacerse comparaciones con enzima obtenida con glucosa como fuente de carbono, e inclusive con la obtenida en presencia de glucosa y dextrinas para ver si son o no la misma proteína. También pueden probarse adiciones de glucosa en tiempo muy cortos para ver qué efecto produce dado que aparentemente es en las primeras horas de fermentación cuando se presenta la síntesis de lipasas y probablemente de otras enzimas importantes para el crecimiento del microorganismo.

Una vez determinado si son dos enzimas diferentes o no, podría procederse a probarlas, por separado, en la generación de sabores y aromas sobre substratos lácteos, que es la aplicación buscada para las lipasas. Hasta ahora, la generación de dichas propiedades organolépticas solamente se ha probado con enzima producida en medio D (con glucosa al 1%) a las 96 horas de

fermentación y con una mutante que produce menor actividad proteolítica que la silvestre.

6. *Rhizopus delemar* presenta mucha variabilidad en cuanto a producción de lipasas. Esto puede deberse a varios motivos, entre los cuales, está la posibilidad de que el (o los) genes de lipasas estén codificados en plásmidos. Convendría entonces llevar a cabo estudios sobre la genética de *R. delemar* y probablemente, intentar mejorar los rendimientos de lipasas a través, no solamente de optimización del medio de cultivo y sus condiciones fisicoquímicas, sino también a través de la ingeniería genética.

BIBLIOGRAFIA

1. Alford, J.A. y Pierce, D.A. 1963. Production of Lipase by *Pseudomonas fragi* in a Synthetic Medium. *J Bacteriol* 86: 24-29.
2. Akhtar, M.W., Mirza, A.Q. y Chughtai, M.I.D. 1980 Lipase Induction in *Mucor hiemalis*. *Appl Environ Microbiol* 40(2): 257-263.
3. Arends, I.M., Dorokhov, V.V., Sverchkova, I.M., y Fedorova, G.D. 1986 Biosynthesis of Lipase by *Geotrichum candidum* During Submerged Cultivation. *Mikrobiologiya*. 22: 102-107.
4. Arnold, R. G., Shahani, K.M., y Dwivedi, B.K. 1975 Application of Lipolytic Enzymes to Flavor Development in Dairy Products. *J Dairy Sci* 58(8): 1127-1143.
5. Ashikari, T., Nakamura, N., Tanaka, Y., Kiuchi, N., Shibano, Y., Tanaka, T., Amachi, T. y Toshizumi, H. 1986 *Rhizopus* Raw-Starch-Degrading Glucoamylase: Its Cloning and Expression in Yeast. *Agr Biol Chem* 50(4): 957-964.
6. Ayala, F.J. y Kiger, J.A. 1984 *Genética Moderna*. Fondo Educativo Interamericano, México. 836 p.p.
7. Bailey; J.E. y Ollis, D.F. 1986 *Biochemical Engineering Fundamentals*. McGraw Hill, Singapur. 984 p.p.
8. Bloquel, R. y Veillet-Poncet, L. 1984 Factors Contributing to Production of Microbial Lipases. *Microbiol Food Nutr* 2: 179-185.
9. Britz, M.L. y Demain, A.L. 1985 Regulation of Metabolite Synthesis. en comprehensive Biotechnology. Vol I The Principles of Biotechnology. Pergamon Press, Nueva York. 617-634.
10. Celerin, E.M. y Fergus, C.I.L. 1971 Effects of Nutrients, Temperature, and Relative Humidity on Germination of the Ascospores of *Chaetomium thermophile* var *coprophile*. *Mycologia* 63: 1030-1045.

11. Chander, H., Batish, V.K., Sannabhadti, S.S. y Srinivasan, R.A. 1980 Factors Affecting Lipase Production in *Aspergillus wentii*. *J Food Sci* 45: 598-600.
12. Chander, H., Batish, V.K., Ghodekar, D.R., y Srinivasan, R.A. 1981 Factors Affecting Lipase Production in *Rhizopus nigricans*. *J Dairy Sci* 64(2): 193-196.
13. Chander, H., Sannabhadti, S.S. y Elias, J. 1977 Factors Affecting Lipase Production by *Penicillium chrysogenum*. *J Food Sci* 42(6): 167.
14. Chen, C. S. y Sih, C.J. 1989 General Aspects of Optimization of Enantioselective Catalysis in Organic Solvents: The Use of Lipases. *Angew Chem Int Ed Engl* 28: 695-707.
15. Chopra, A.K. y Chander, H. 1983 Factors Affecting Lipase Production in *Syncephalastrum racemosum*. *J Appl Bacteriol* 54: 163-169.
16. Deploey, J.J. 1981 Daily Measurements of *Mucor miehei* Lipase Activity. *Mycologia* Vol LXXIII(5): 953-958.
17. Desnuelle, P. 1972 The Lipases. en *The enzymes*, boyer vol VII: 575-616.
18. Drucker, H. 1972 Regulation of Exocellular Proteases in *Neurospora crassa*: Induction and Repression of Enzyme Synthesis. *J Bacteriol* 110(3): 1041-1049.
19. El Soda, M. 1986 Acceleration of Cheese Ripening: Recent Advances. *J Food Prot* 49(5): 395-399.
20. Espinosa, E., Sánchez, S. y Farrés, A. 1990 Nutritional Factors Affecting Lipase Production by *Rhizopus delemar* CDBB H313. *Biotech Letters* 12(3): 209-214.
21. Espinosa, E. 1990 Mejoramiento de las Condiciones de Producción de Lipasa de *Rhizopus delemar* destinada a la Modificación de un Substrato Lácteo. Tesis maestría en Biotecnología. UNAM, IIBM. 76 p.p.

22. Faith, W.T., Neubeck, C.E. y Reese, E.T. 1971 Production and Application of Enzymes. *Adv Biochem Eng I*: 77-111.
23. Fukumoto, J., Iwai, M. y Tsujisaka, Y. 1963 Studies on Lipase. I. Purification and Crystallization of a Lipase Secreted by *Aspergillus niger*. *J Gen appl Microbiol* 9(3): 353-361.
24. Fukumoto, J., Tsuru, D., y Tamamoto, T. 1967 Studies on Mold Protease I Purification, Crystallization and some Enzyme Properties of Acid Protease of *Rhizopus chinensis*. *Agr Biol Chem* 37: 710-717.
25. Gibb, G.D., Ordaz, D.E. y Strohl, W. R. 1989 Overproduction of Extracellular Protease Activity by *Streptomyces* C5-A13 in Fed-Batch Fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol* 20: 161-165.
26. Harrer, W., Kubicek, C.P., Röhr, M., Wurth, H. y Marihart, J. 1983 The Effect of Carboxymethyl Cellulose Addition on Extracellular Enzyme Formation in *Trichoderma pseudokoningii*. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol* 17: 339-343.
27. Iwai, M. y Tsujisaka, Y. 1974 Interconversion of Two Lipases from *Rhizopus delemar*. *Agr Biol Chem* 38(6): 1249-1254.
28. Iwai, M., Tsujisaka, Y., y Tominaga, Y. 1979 Increase in the Activity of *Rhizopus* C-Lipase on Lipoprotein by its Interaction with Phospholipids. *Agr Biol Chem* 43(5): 893-900.
29. Iwai, M., Shimada, Y. y Tsujisaka, Y. 1980 Modification of *Rhizopus delemar* Lipase by its Binding with Phospholipids. *J Biochem* 88: 533-538.
30. Jacob, F. y Monod, J. 1961 Genetic Regulatory Mechanisms in the Synthesis of Proteins. *J Mol Biol* 3: 318-356.
31. Kawamori, M., Morikawa, Y., Shinsha, Y., Takayama, K. y Takasawa, S. 1985 Preparation of Mutants Resistant to Catabolite Repression of *Trichoderma reesei*. *Agr Biol Chem* 49(10): 654-658.

32. Kilara, A. 1985 Enzyme-Modified Lipid Food Ingredients. *Process Biochem* (4): 36-44.
33. Kimura, T. y Tsuchiya, K. 1982 Characteristics of Protease Production by *Cephalosporium* sp. *Appl Env Microbiol* 43(3): 654-658.
34. Leбриhi, A., Lefebvre, G. y Germain, P. 1988 Carbon Catabolite Regulation of Cephamycin C and Expndase Biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 28: 44-51.
35. Loomis, W.F. y Magasanik, B. 1964 The Relation of Catabolite Repression to the Induction System for β -galactosidase in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 8: 417-426.
36. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Lewis Farr, A. y Randall, R.J. 1951 Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.
37. Macrae, A.R. 1983 Lipase-Catalyzed Interesterification of Oils and Fats. *JAOCS* 60(2): 243-246.
38. Macrae, A.R. y Hammond, R.C. 1985 Present and Future Applications of Lipases. *Biotech Gen Eng Rev* 3: 193-217.
39. Magasanik, B.P. 1961 Glucose Effects: Inducer Exclusion and Repression. en: *The Lactose Operon*. J.R. Beckwith and D. Zipser (eds.) Cold Spring Harbor Laboratories. 189-219.
40. Menassa, A. y Lamberet, G. 1982 Contribution a l'étude du système lipolytique de *Penicillium roqueforti*. *Le Lait*. 62: 32-43.
41. Meyers, E. y Knight, S.G. 1958 Studies on the Nutrition of *Penicillium roqueforti*. *Appl Microbiol* 6(3): 174-178.
42. Mora, J. y Lara, F. 1988 Nitrogen and Metabolism: an Overview. en *Nitrogen Source Control of Microbial Processes*. Sánchez, S. (ed), USA: 2-16.

43. Nahas, E. 1988 control of Lipase Production by *Rhizopus oligosporus* Under Various Growth conditions. *J Gen Microbiol* 134: 227-233.
44. Nakashima, T., Fukuda, H., Kyotani, S. y Morikawa, H. 1988 Culture Conditions for Intracellular Lipase Production by *Rhizopus chinensis* and its Immobilization within Biomass Support Particles. *J Fern Tech* 66(4): 441-448.
45. Pal, N., Das, S. y Kundu, A.K. 1978 Influence of Culture and Nutritional Conditions on the Production of Lipase by Submerged Culture of *Aspergillus niger*. *J Fern Tech* 56(6): 593-598.
46. Polnisch, E. y Hofmann, K. 1989 cyclic AMP, Fructose-2,6-biophosphate and Catabolite Inactivation of Enzymes in the Hydrocarbon- Assimilating Yeast *Candida maltosa*. *Arch Microbiol* 152: 269-272.
47. Postma, P. W. 1987 Phosphotransferase System for Glucose and Other Sugars. en *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, Cellular and Molecular Biology. Neidhardt, F.C.(ed) Vol I Am Soc for Microbiol. 127-141.
48. Robbins, D. y Taylor, D. 1989 Optimization of *Escherichia coli* Growth by Control Addition of Glucose. en *Biotechnology Bioengineering*. John Wiley and Sons, USA. 34: 1289-1294.
49. Romano, A.H. 1986. Microbial Sugar Transport systems and Their Importance in Biotechnology. *TIBTECH*: 207-213.
50. Sattur, A. P. y Karanth, N.G. 1989 Production of Microbial Lipids: III. Influence of C/N Ratio-Experimental Observations. *Biot Bioeng* 34: 872-874.
51. Sherman, F., Fink, G. y Lawrence, R. 1971 Isolation and Characterization of Auxotrophic, Temperature-Sensitive, and UV-Sensitive Mutants. *Methods in Yeast Genetics Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory for Quantitative Biology, New York. 4-8.
52. Shimada, Y., Iwai, M. y Tsujisaka, Y. 1981 Reversibility of the Modification of *Rhizopus delemar* Lipase by Phosphatidylcholine. *J Biochem* 89: 937-942.

53. Shimada, Y., Iwai, M. y Tsujisaka, Y. 1983 Increase in the Activity of *Rhizopus delemar* Lipase on Water-soluble Esters by its binding with Phosphatidylcholine. *J Biochem* 93: 1655-1660.
54. Shinmyo, A., Davis, I.K., Nomoto, F., Tahara, T. y Enatsu, T. 1978 catabolite Repression of Hydrolases in *Aspergillus niger*. *Eur J Appl Microbiol* 5: 59-68.
55. Summer, S. B. y Howell, S.F. 1935 A method for Determination of Sacharase Activity. *J Biol Chem* 108: 51-53.
56. Suzuki, M., Tamamoto, H. y Mizugaki, M. 1986 Purification and General Properties of a Metal-Insensitive Lipase from *Rhizopus japonicus* NR 400. *J Biochem* 100: 1207-1213.
57. Sztajer, H. y maliszewska, I. 1988 The Effect of cultura Conditions on Lipolytic Productivity of Microorganisms. *Biotech Letters* 10(3): 199-204.
58. Tahoun, M.K. y ali, H:A. 1986 Specificity and Glyceride Synthesis by Mycelial Lipases of *Rhizopus delemar*. *Enzyme Micr* 8: 429-432.
59. Tahoun, M.K., Mashaley, R. e Ismail, A.A. 1988 The Mechanism of *Rhizopus delemar* Intracellular Lipases Inhibition by Various Chemicals. *Microbios.* 53: 139-146.
60. Tsuchiya, K. y Kimura, T. 1984. Decrease of Protease Activity by the Addition of Glucose to the Culture of *Cephalosporium* sp *J Ferm Tech* 62(1): 35-39.
61. Tsujisaka, Y., Iwai, M. y Tominaga, Y. 1972 A comparative Study on some Propterties of Fungal Lipases. *Proc. IV IFS. Fermen Tech Today:* 315-320.
62. Tsujisaka, Y., Iwai, M. y Tominaga, Y. 1973 Purification, Crystallization and Some Properties of Lipase from *Geotrichum candidum* Link. *Agr Biol Chem* 37(6): 1457-1464.
63. Tyler, B. y Magasanik, B. 1969 Molecular Basis of Transient Repression of β -Galactosidase in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 97: 550.

64. Ulloa, M. y R. Hanlin. 1978 Atlas de micología básica. Editorial Concepto, México. 158 pp.
65. Van Uden, C., Cabeça Silva, C., Madeira-Lopes, A. y Spencer-Martins, I. 1980 Selective Isolation of Derepressed Mutants of an α -amylase Yeast by the Use of 2-Deoxyglucose. Biot Bioeng. Vol XXII: 651-654.
66. Wang, D.I.C., Cooney, C.L., Demain, A.L., Dunn, H.P., Humphrey, E.A. y Lilly, M.O. 1979 Fermentation and Enzyme Technology. Wiley and Sons, New York. 364 pp.