

03072

3  
201

---

Tesis para obtener el grado de Maestro en Biotecnología

Título de la tesis:

"Estudio Comparativo de la Producción de Lipasas por Yarrowia lipolytica en Cultivos Líquido y Sólido".

Por el Ing. Bioq. Gerardo A. Corzo Burguete

Asesorado por el Dr. Sergio Revah Moiseev

Instituto de Investigaciones Biomédicas UACPyP/CCH/UNAM

México, D.F. a 18 de septiembre de 1993

---



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **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.

## Resumen

El hombre se ha favorecido con el uso de las enzimas, de entre ellas, las lipasas, generalmente, son empleadas en la transformación de productos lácteos. La producción de lipasas por cultivo líquido y sólido, mediante un microorganismo, fué comparada.

*Yarrowia lipolytica* 681 fué seleccionada de entre 5 cepas de levaduras productoras de lipasas. Los criterios de selección fueron la formación de halos de hidrólisis de triacilglicéridos en caja petri y la producción volumétrica de lipasas en cultivo líquido.

Un método de cuantificación de lipasas fué validado tomando en cuenta el efecto de algunas variables involucradas en el sistema de ensayo como sustrato, pH, temperatura, buffer y productos de la hidrólisis del sustrato.

La actividad lipolítica es inhibida por la presencia de productos de la hidrólisis de triacilglicéridos, siendo los ácidos grasos responsables de esta inhibición. La estabilidad de la lipasa en medio líquido dependió, de entre otras, del pH y de la presencia de ácidos grasos, como el ácido oleico.

*Yarrowia lipolytica* 681 necesitó de un inductor para producir lipasas. Un medio de cultivo definido con la presencia de aceite de oliva como inductor fué utilizado para la síntesis de enzima.

La producción de lipasas, en el medio de cultivo líquido en matraces agitados, fué maximizada tomando en cuenta el efecto del inóculo, fuente de carbono y nitrógeno, inductores y la relación carbono-nitrógeno. Además, se realizó un diseño experimental con las variables pH inicial y temperatura, donde se observaron los efectos simples, cuadráticos e interactivos entre estas dos variables para aumentar la producción de lipasas durante el crecimiento de *Yarrowia lipolytica* 681.

La producción de lipasas fué incrementada por la adición de tween 80 al medio de cultivo, el tween 80 tuvo un efecto detergente sobre la membrana celular en la cual se encuentra asociada la lipasa.

El crecimiento de *Yarrowia lipolytica* 681 y la producción de lipasas, en un bioreactor con condiciones controladas, fueron modelados. La síntesis de enzima alcanzó su mayor concentración a las 18 horas después de inoculado el medio de cultivo, decreciendo posteriormente. La actividad lipolítica, posiblemente, fué inhibida por los ácidos grasos liberados ya que una simulación considerando una acumulación de ácidos grasos, en el medio de cultivo, describió el comportamiento de la enzima durante el crecimiento de la levadura.

*Yarrowia lipolytica* 681 fué crecida sobre un soporte sólido modelo (Amberlita IRA-900) en columnas empacadas. La síntesis de enzima se realizó en un periodo similar al observado en el bioreactor. Datos capturados en línea de producción de CO<sub>2</sub>, diferencia de temperaturas, pH y caída de presión

mostraron actividad metabólica de la levadura en ese mismo periodo.

La lipasa obtenida por cultivo sólido tuvo actividad en un rango de pH mayor a la lipasa obtenida por cultivo líquido. El extracto enzimático obtenido en cultivo líquido mostró dos máximos de actividad a diferentes temperaturas, posiblemente *Yarrowia lipolytica* 681 produce dos tipos de lipasas, en este medio de cultivo.

El rendimiento de lipasas por volumen de reactor fue mayor para el cultivo líquido, pero el rendimiento volumétrico fue mayor en el cultivo sólido. El soporte adsorbió a la lipasa, por lo que fue necesario extraerla con una solución salina, lo cual diluyó a la enzima y disminuyó los rendimientos volumétricos de la enzima obtenida por vía sólida.

Las diferencias encontradas en las lipasas obtenidas por medios líquido y sólido demostraron el efecto que ambos medios de cultivo tienen sobre el metabolismo microbiano.

---

Índice

1.	<b>Antecedentes</b> .....	1
2.	<b>Hipótesis</b> .....	5
3.	<b>Objetivos</b> .....	5
4.	<b>Estrategia</b> .....	5
5.	<b>Introducción</b> .....	7
5.1.	Generalidades de las lipasas.....	7
5.2.	Métodos de cuantificación de lipasas.....	8
5.3.	Especificidad de las lipasas.....	8
5.4.	Usos de las lipasas.....	11
6.	<b>Material y Métodos</b> .....	13
6.1.	6.1. Microorganismos.....	13
6.2.	6.2. Condiciones de cultivo.....	14
6.2.1.	6.2.1. Condiciones de cultivo en la selección de la cepa.....	14
6.2.1.1.	Selección en caja petri.....	14
6.2.1.2.	Selección en medio líquido.....	14
6.2.2.	6.2.2. Condiciones de cultivo en líquido.....	14
6.2.2.1.	6.2.2.1. Condiciones de cultivo en líquido en matraces agitados.....	14
6.2.2.1.1.	Medio de cultivo.....	14
6.2.2.2.	Condiciones de cultivo en líquido a pH controlado.....	15
6.2.3.	6.2.3. Condiciones de cultivo en medio sólido.....	16
6.2.3.1.	6.2.3.1. Condiciones de cultivo en columnas empacadas.....	16
6.2.3.1.1.	Condiciones de cultivo en columnas.....	16
6.2.3.1.2.	Preparación del medio de cultivo sólido.....	16
6.2.3.1.3.	Soporte.....	16
6.2.3.1.4.	Columna y sistema de cultivo en sólido.....	17
6.2.3.2.	6.2.3.2. Cultivo en sólido con captura de datos en línea.....	19
6.3.	6.3. Métodos analíticos.....	21
6.3.1.	6.3.1. Métodos analíticos en la selección de la cepa.....	21
6.3.2.	6.3.2. Métodos analíticos en el cultivo en líquido.....	21
6.3.2.1.	6.3.2.1. Biomasa.....	22
6.3.2.2.	6.3.2.2. Actividad lipolítica.....	22
6.3.2.3.	6.3.2.3. Azúcares.....	24
6.3.2.4.	6.3.2.4. Aceite de oliva.....	26
6.3.3.	6.3.3. Métodos analíticos en cultivo sólido.....	27
6.4.	6.4. Análisis estadístico.....	27
6.5.	6.5. Reactivos.....	27

<b>7.</b>	<b>Resultados y Discusión.....</b>	<b>28</b>
<b>7.1.</b>	<b>Selección de la cepa productora de lipasas.....</b>	<b>28</b>
7.1.1.	Selección sobre cultivo sólido.....	28
7.1.2.	Selección sobre cultivo líquido.....	28
7.1.3.	Conclusiones.....	29
<b>7.2.</b>	<b>Método de cuantificación de actividad lipolítica y características de la lipasa de <i>Yarrowia lipolytica</i> 681.....</b>	<b>30</b>
7.2.1.	Efecto de la concentración de sustrato.....	30
7.2.2.	Efecto del pH.....	32
7.2.2.1	Efecto de la actividad lipolítica a pH constante.....	35
7.2.3.	Efecto de la temperatura.....	38
7.2.4.	Efecto del CaCl <sub>2</sub> y de la acetona-isopropanol.....	39
7.2.5.	Efecto del buffer.....	41
7.2.6.	Efecto de la concentración del extracto enzimático.....	42
7.2.7.	Relación de la actividad lipolítica cuantificada en el titulador automático y en matraz Erlenmeyer.....	42
7.2.8.	Estabilidad de la enzima en líquido.....	43
7.2.8.1.	Estabilidad de la enzima ante el pH.....	44
7.2.9.	Inhibición por productos de la hidrólisis de triglicéridos.....	45
7.2.10.	Afinidad de la lipasa ante diferentes sustratos.....	47
7.2.11.	Conclusiones.....	49
<b>7.3.</b>	<b>Producción de lipasas por el crecimiento de <i>Yarrowia lipolytica</i> 681 en cultivo sumergido.....</b>	<b>50</b>
7.3.1.	Efecto del inóculo.....	50
7.3.2.	Efecto del tween 80.....	51
7.3.3.	Efecto de la fuente de carbono, nitrógeno e inductores.....	54
7.3.4.	Efecto de la concentración del inductor.....	57
7.3.5.	Efecto de la concentración de urea.....	57
7.3.6.	Efecto de temperatura y el pH inicial en la producción de lipasas.....	58
7.3.7.	Efecto de la aireación.....	61
7.3.8.	Cinética del crecimiento de <i>Yarrowia lipolytica</i> 681 en cultivo sumergido en condiciones de pH controladas.....	62
7.3.8.1.	Modelo de crecimiento.....	63
7.3.8.2.	Modelo de consumo de sustrato.....	65
7.3.8.3.	Modelo de producción de enzima.....	66
7.3.8.4.	Simulación del crecimiento de <i>Yarrowia lipolytica</i> 681.....	69
7.3.9.	Conclusiones.....	71

<b>7.4.</b>	<b>Producción de lipasas por el crecimiento de <i>Yarrowia lipolytica</i> 681 en soporte sólido.....</b>	<b>72</b>
7.4.1.	Extracción de la lipasa del soporte.....	72
7.4.2.	Cuantificación de la biomasa.....	74
7.4.3.	Cinética de crecimiento de <i>Yarrowia lipolytica</i> 681 en soporte sólido.....	75
7.4.4.	Comparación de la lipasa obtenida en medios líquido y sólido..	79
7.4.4.1.	Cinética de Michaelis-Menten en las lipasas obtenidas por cultivos líquido y sólido.....	79
7.4.4.2.	Efecto del pH en las lipasas obtenidas por cultivos líquido y sólido.....	81
7.4.4.3.	Efecto de la temperatura en las lipasas obtenidas por cultivos líquido y sólido.....	83
7.4.4.4.	Productividad.....	84
7.4.5.	Conclusiones.....	85
<b>8.</b>	<b>Conclusiones.....</b>	<b>87</b>
<b>9.</b>	<b>Bibliografía.....</b>	<b>88</b>

---

**Índice de Figuras**

Fig. 4.1	Diagrama de flujo del proyecto.....	6
Fig. 5.1	Comparación entre la actividad lipolítica y esteárica.....	7
Fig. 5.2	Especificidad de las lipasas.....	9
Fig. 6.1	Dimensiones de las columnas utilizadas en el cultivo sólido.....	18
Fig. 6.2	Sistema de cultivo sólido.....	19
Fig. 6.3	Sistema de cultivo sólido para captura de datos en línea.....	20
Fig. 6.4	Diagrama de flujo del análisis de muestras.....	22
Fig. 6.5	Titulador Mettler DL-20.....	23
Fig. 6.6	Curva patrón de la relación azúcares reductores y absorbancia (DNS).....	25
Fig. 6.7	Relación de la glucosa con el área de los cromatogramas.....	26
Fig. 7.1	Cinética de actividad lipolítica.....	31
Fig. 7.2	Efecto del pH en la actividad lipolítica.....	33
Fig. 7.3	Efecto de la actividad lipolítica en el pH de la reacción.....	34
Fig. 7.4	Actividad lipolítica en el tiempo.....	34
Fig. 7.5	Actividad lipolítica a pH constante y no constante.....	35
Fig. 7.6	Actividad lipolítica a pH constante.....	36
Fig. 7.7	Ajuste lineal de la actividad lipolítica a pH constante.....	37
Fig. 7.8	Efecto del consumo de sustrato en la actividad lipolítica.....	38
Fig. 7.9	Efecto de la temperatura en la actividad lipolítica.....	39
Fig. 7.10	Efecto de la concentración de Tris-melatos.....	41
Fig. 7.11	Efecto de la concentración enzimática en el ensayo de actividad.....	42
Fig. 7.12	Estabilidad de la lipasa.....	44
Fig. 7.13	Estabilidad lipolítica ante el pH.....	45
Fig. 7.14	Efecto del ácido oleico en la actividad lipolítica.....	46
Fig. 7.15	Ajuste de datos experimentales al modelo.....	47
Fig. 7.16	Actividad de la lipasa de <i>Yarrowia lipolytica</i> 681 por diferentes sustratos.....	48
Fig. 7.17	Efecto de la aireación.....	62
Fig. 7.18	Ajuste de los datos de la cinética 1 a modelos logísticos.....	63
Fig. 7.19	Ajuste de los datos de biomasa al modelo logístico.....	65
Fig. 7.20	Ajuste de los datos de sustrato al modelo logístico.....	66
Fig. 7.21	Datos experimentales de actividad enzimática.....	67
Fig. 7.22	Simulación del crecimiento de <i>Yarrowia lipolytica</i> 681.....	70
Fig. 7.23	Efecto del NaCl en la extracción de la enzima.....	73
Fig. 7.24	Relación biomasa con y sin tratamiento con glicerol.....	75
Fig. 7.25	Cinética de <i>Yarrowia lipolytica</i> 681 sobre Amberlita IRA-900.....	76
Fig. 7.26	CO <sub>2</sub> -pH.....	77



Fig. 7.27	CO <sub>2</sub> -Caída de presión.....	77
Fig. 7.28	Relación de la producción de CO <sub>2</sub> con la caída de presión durante la fase exponencial.....	78
Fig. 7.29	Cinética de Michaelis-Menten.....	80
Fig. 7.30	Comparación entre los parámetros catalíticos de las dos enzimas.....	81
Fig. 7.31	Efecto del pH.....	82
Fig. 7.32	Efecto de la temperatura.....	83

---

**Índice de Tablas**

Tabla 5.3	Lipasas comerciales.....	10
Tabla 6.1	Nombre y origen de las cepas utilizadas en la selección.....	13
Tabla 7.1	Resultados de actividad lipolítica y biomasa durante la selección de la cepa.....	29
Tabla 7.2	Efecto del CaCl <sub>2</sub> y la acetona-isopropanol.....	40
Tabla 7.3	Relación de la actividad cuantificada en matraz y titulador DL-20.....	43
Tabla 7.4	Composición de algunos triglicéridos naturales y sintéticos.....	48
Tabla 7.5	Efecto del inóculo en la producción de lipasas.....	51
Tabla 7.6a	Efecto del tween 80 en la actividad lipolítica.....	52
Tabla 7.6b	Efecto del tween 80 en la actividad lipolítica.....	53
Tabla 7.7	Efecto del tween 80 en la extracción de la enzima.....	54
Tabla 7.8	Efecto de la fuente de carbono.....	55
Tabla 7.9	Efecto de la fuente de nitrógeno.....	55
Tabla 7.10	Efecto de los inductores.....	56
Tabla 7.11	Efecto de la concentración de inductor.....	57
Tabla 7.12	Efecto de la concentración de urea.....	57
Tabla 7.13	Diseño experimental del efecto del pH inicial y la temperatura.....	59
Tabla 7.14	Análisis de varianza de los resultados del diseño experimental.....	59
Tabla 7.15	Resultados del análisis de superficies de respuestas del diseño experimental.....	61
Tabla 7.16	Productividad de los medios de cultivo líquido y sólido.....	84
Tabla 7.17	Características de los medios de cultivo líquido, sólido A y sólido B.....	85

## 1. Antecedentes

La biotecnología es una ciencia inter y multidisciplinaria, la cual hace uso de ciencias como Ingeniería, Genética, Microbiología, Bioquímica, etc., y pretende como un fin conocer materialmente cada uno de los procesos y reacciones de los sistemas "vivos" que puedan ser útiles al hombre.

La función del biotecnólogo, tal vez, es dedicarse a algún, ó algunas áreas de estas ciencias con el fin de investigar y aportar un conocimiento nuevo, sobre los sistemas vivos, que beneficien al hombre.

Las enzimas son compuestos producidos por la mas pequeña forma de vida capaz de reproducirse por si sola, llamada célula.

El origen de las enzimas puede ser de células vegetales, animales, y de microorganismos, como bacterias, levaduras y hongos.

La producción de enzimas por microorganismos ha sido socialmente útil a lo largo de muchos años en la elaboración de alimentos (productos lácteos, edulcorantes, cerveza, vino), diagnóstica, vestido (telería, textilería), y entre otros, productos farmacéuticos.

Una de las muchas definiciones de enzima es:

... una proteína la cual es sintetizada por una célula viva y cataliza ó acciona una posible reacción termodinámica. La velocidad de reacción de la enzima es proporcional al proceso bioquímico para mantener viva a la célula.

Conn y Stumpf (1972)

Las enzimas poseen tres cualidades, que las distinguen de otras proteínas activas que producen las células, estas cualidades son:

Especificidad.- Capacidad de realizar una sola reacción química, a la vez que discriminan otras muchas posibles reacciones.

Eficiencia catalítica.- Como catalizadores no influyen en el equilibrio de la reacción y su eficacia catalítica se debe a su gran especificidad.

Regulación.- Realizan su propia regulación y control de síntesis, además del control de la reacción química.

En el presente estudio se hará referencia a un tipo de enzima clasificada como Hidrolasa, llamada Lipasa (E.C. 3.1.1.3). Más información acerca de las características de este tipo de enzima se dará adelante.

Durante las últimas dos décadas la investigación en el uso y producción de lipasas por microorganismos se ha incrementado (Iwai y Tsujisaka, 1984). Desde un punto de vista industrial la producción de enzimas extracelulares, en este caso lipasas extracelulares, presenta ventajas sobre aquellas intracelulares por el hecho de ser más fácilmente recuperables, y de este modo evitar la ruptura celular. El evitar el rompimiento celular facilita la purificación y reduce el daño al producto (Priest, 1984).

Existen investigadores los cuales han estudiado la manera de incrementar los rendimientos enzimáticos de lipasas mediante la manipulación genética (Nga et al., 1988, 1989; Shimada et al., 1989), el uso de diferentes tipos de inductores (Ota et al., 1968a, 1968b), el control de las condiciones de cultivo (Omar, I.C. et al., 1987; Nair y Bone, 1987; Baillargeon et al., 1989) y diseños de medios de cultivo (Novotny et al., 1987; Hegedus y Kachatourians, 1988; Nahas, 1988; Valero et al., 1988).

Los trabajos anteriores han utilizado el cultivo en líquido como medio de crecimiento del microorganismo.

Otra opción al incremento de la producción de lipasas podría ser mediante el crecimiento de microorganismos sobre soportes sólidos (Rivera-Muñoz et al., 1991).

Existen muchos reportes en la literatura sobre la producción de enzimas en cultivo sólido, en especial de amilasas mediante el proceso tradicionalmente conocido como Koji (Takamine, 1914; Fukushima, 1982).

El cultivo sobre soportes sólidos proporciona ventajas en la extracción de enzimas extracelulares debido a que la enzima se concentra en volúmenes relativamente menores a los manejados en cultivos líquidos, esta y algunas otras diferencias entre el cultivo en líquido y en sólido han sido mencionadas por, entre otros, autores como Helsseltine (1972), Moo-Young (1983), Lonsane et al., (1985).

El uso de diferentes medios de cultivo hace posible encontrar diferencias, entre enzimas producidas en ambos tipos de cultivo (líquido y sólido), debido a las diferentes condiciones de actividad de agua, transferencia de calor y oxígeno, así como fisiología del crecimiento por disponibilidad de nutrientes. Estos son factores que afectan a los microorganismos en su actividad metabólica (Beuchat, 1983; Raimbault, 1988).

Alazard y Raimbault reportan en 1981 diferencias en cuanto a la estabilidad ante el pH y temperatura, así como diferencias en las constantes de saturación de Michaelis-Menten, en glucoamilasas producidas por *Aspergillus niger* en ambos medios de cultivo.

Fukushima en 1982 demuestra que proteasas y peptidasas producidas por

*Aspergillus oryzae* en cultivo sólido no estuvieron presentes cuando el mismo microorganismo fue crecido en cultivo líquido.

Los estudios sobre producción de enzimas en soportes sólidos han sido realizados, en su mayoría, mediante el crecimiento de hongos. Tal es el caso de los estudios en la producción de lipasas, pectinasas, proteasas, celulasas y glucoamilasas.

El cultivo de hongos sobre soportes sólidos presenta ventajas sobre otros microorganismos debido a sus características genotípicas de crecimiento (micelio) y reproducción (esporulación), las cuales hacen posible la propagación de estos. Los hongos, también, están más adaptados a crecer en lugares con bajos niveles de agua libre y a resistir cambios de gradientes osmóticos, debido a su, relativamente, rígida pared celular.

Sato et al. en 1983 y 1985 reportan el crecimiento de *Candida lipolytica* y *Saccharomyces cerevisiae*, respectivamente, sobre soportes sólidos. El crecimiento de ambas levaduras fue satisfactorio a humedades mínimas del 40% en el soporte, demostrando de esta manera la viabilidad del crecimiento de levaduras en cultivos sólidos.

Las levaduras son microorganismos adaptables a crecer en amplios rangos de condiciones ambientales. Las levaduras pueden ser crecidas en medios simples o complejos, es decir, no necesitan especiales requerimientos de nutrientes.

Otra característica de las levaduras es que son capaces de utilizar algunos sustratos en paralelo y/o un simple sustrato por diferentes vías metabólicas (Sonnleitner, 1991).

En el departamento de Ingeniería Química, de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, lugar donde se realizó el presente estudio, se investiga la producción de enzimas proteolíticas y metabolismo microbiano en soportes sólidos mediante el uso de hongos del género *Aspergillus*, así como la producción de aromas por cultivo de *Ceratocystis fimbriata*. Otra línea de investigación se ha desarrollado mediante el estudio de levaduras sobre soportes sólidos, como es la producción de lipasas y aromas mediante estos microorganismos.

Este trabajo tiene como fin comparar la producción de las lipasas obtenidas por medio de cultivo en líquido y en sólido mediante el crecimiento de una levadura, y exponer las cualidades de uno y otro medio de cultivo.

Además, de comparar la actividad enzimática en ambos medios de cultivo,

se pretende analizar algunas características de la enzima ya que existe información sobre diferencias existentes entre enzimas producidas por el mismo microorganismo crecido en diferentes medios de cultivo.

## 2. Hipótesis

El cultivo en sólido permite obtener mejores rendimientos volumétricos de producto (lipasas) debido al uso de menor cantidad de agua.

Los microorganismos producen un mismo tipo de enzimas (lipasas) con diferencias cinéticas significativas cuando son crecidos en medios líquido y sólido, debido a las diferencias metabólicas de su crecimiento en los medios de cultivo.

## 3. Objetivos

Este trabajo tiene como fin comparar la producción de las lipasas obtenidas por medio de cultivo en líquido y en sólido mediante el crecimiento de una levadura, y exponer las cualidades de uno y otro medio de cultivo.

Además, de comparar la actividad enzimática en ambos medios de cultivo, se pretende analizar algunas características de la enzima ya que existe información sobre diferencias existentes entre enzimas producidas por el mismo microorganismo crecido en diferentes medios de cultivo.

## 4. Estrategia

La estrategia a seguir para alcanzar los objetivos propuestos se estableció de la siguiente manera:

Seleccionar una levadura con actividad lipolítica.

Desarrollar un método para cuantificación de la enzima.

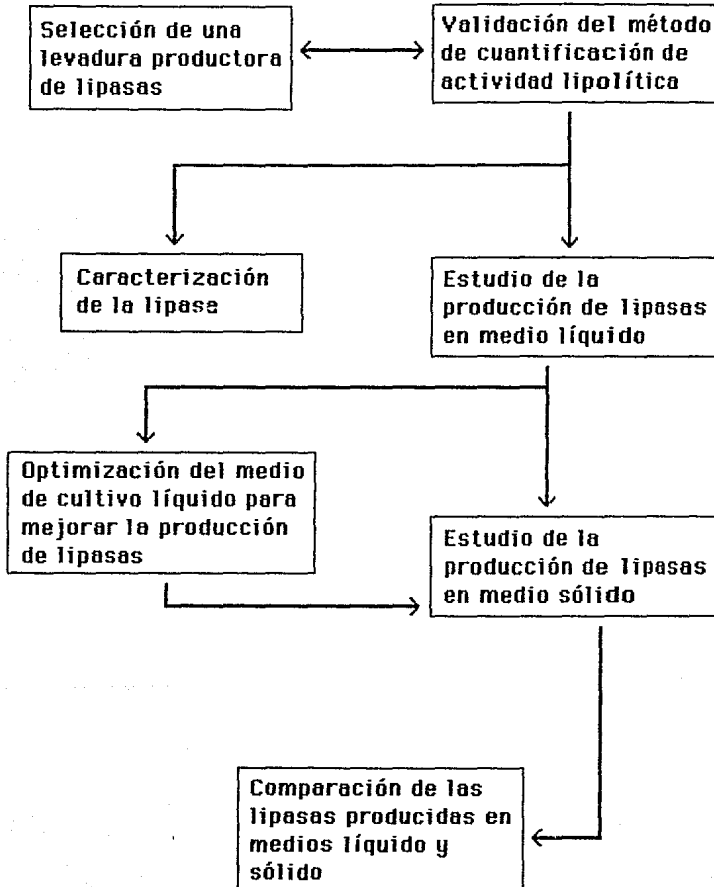
Diseñar un medio de cultivo el cual permita mejorar los rendimientos volumétricos de lipasas en cultivo sumergido, con el fin de extrapolarlo al cultivo sobre soporte sólido.

Producir lipasas sobre un soporte sólido.

Comparar la productividad y características de lipasas obtenidas por crecimiento de la levadura en cultivos líquido y sólido.

A continuación se muestra un diagrama de flujo de la estrategia seguida en este trabajo.

Fig. 4.1 Diagrama de flujo del proyecto





## 5. Introducción.

### 5.1. Generalidades de las lipasas

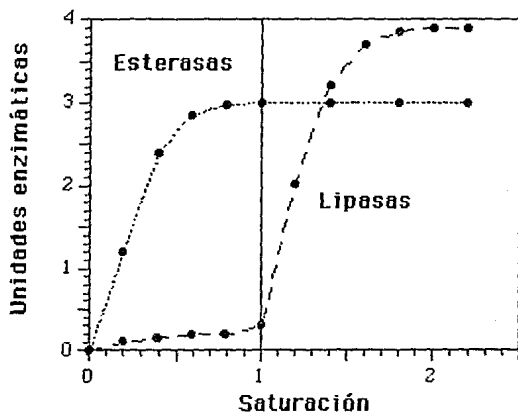
Originalmente, las lipasas fueron clasificadas con el código E.C. 3.1.1.3 glicerol éster hidrolasas en 1964, el cual fue cambiado al mismo código, pero con el nombre de triacil-lipasas en 1972.

Las lipasas (hidrolasas, E.C. 3.1.1.3) catalizan la hidrólisis de cadenas largas de triacilglicéridos, también llamados comunmente triglicéridos, en una interfase aceite-agua.

Las lipasas difieren de las esterases en que las lipasas requieren sustratos insolubles para actuar.

La siguiente figura muestra la hidrólisis de la triacetina por esterases y lipasas. La triacetina es hidrolizada por la lipasa únicamente después de que el límite de solubilidad del triglicérido (línea vertical) es excedido.

Fig. 5.1 Comparación entre la actividad lipolítica y esteérica



Desnuelle (1961)

La presencia de lipasas en los microorganismos favorecen la degradación de triacilglicéridos de origen animal o vegetal que utilizan como fuente de carbono y energía para su crecimiento (Novotny et al., 1988).

Las levaduras pueden producir lipasas intracelulares o excretarlas al medio (Novotny et al., 1988; Ota et al., 1982).

La presencia de triacilglicéridos como inductores de lipasa en el medio no siempre es necesaria para la síntesis de estas enzimas (Ota et al., 1982)

Aunque, en la mayoría de los casos de producción de esta enzima, es necesario que se sintetice por inducción (Kalle et. al., 1972; Sugiura et.al., 1975; Montet, 1985; Muderhwa y Ratomahenina, 1985).

## 5.2. Métodos de cuantificación de las lipasas

Las lipasas son medidas mediante la cuantificación de ácidos grasos liberados durante la hidrólisis de triglicéridos, los cuales como ya se ha dicho son los sustratos naturales de estas enzimas.

Existen varios métodos que han sido propuestos para la cuantificación de lipasas. Un problema en el ensayo de lipasas es la cantidad de métodos que existen, los cuales hacen difícil la comparación de actividad lipolítica entre microorganismos, y la variación en los parámetros del ensayo.

Algunos parámetros importantes en el ensayo de lipasas son la preparación y grado de dispersión del sustrato, el tiempo de reacción, pH, temperatura y fuerza iónica del medio de reacción.

La cuantificación de lipasas puede ser, espectrofotométrica (Borgstrom, 1957; Foster et.al., 1985), por reducción de la tensión superficial (Dunkey y Smith, 1951), manométrica (Willard y Sjoström, 1957), caída de pH por liberación de ácidos grasos (Hofelmann, 1985), titulación de ácidos grasos a pH constante (San Clemente y Vadehra, 1967) y por titulación de ácidos grasos sin control de pH (Ota et.al., 1982).

Actualmente, la mayoría de los reportes que involucran actividad lipolítica realizan la cuantificación de la lipasa por titulación de ácidos grasos liberados por la hidrólisis de triacilglicéridos.

## 5.3. Especificidad de las lipasas

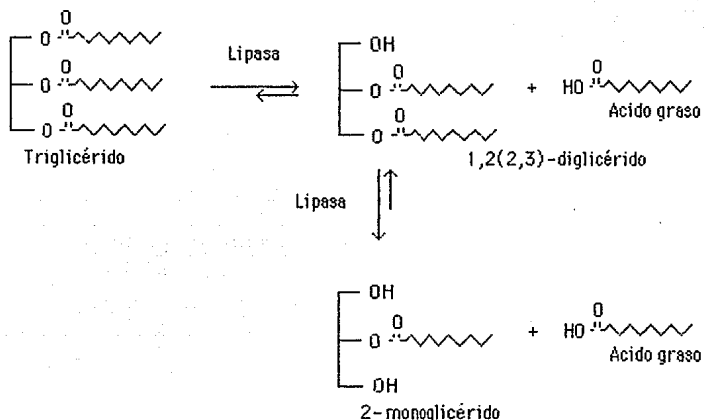
Las lipasas microbianas pueden ser divididas dentro de dos grupos: lipasas específicas (a) y lipasas no-específicas (ab).

Las lipasas específicas hidrolizan las posiciones 1 y 3 dando ácidos grasos libres y una mezcla de mono- y di-glicéridos. Los 2-monoglicéridos y los 1,2- ó 2,3-diglicéridos resultantes son inestables. La primera hidrólisis es seguida entonces por una migración de los grupos acilo a las posiciones 1,3 del triglicérido formandose 1-mono- ó 1,3-di-glicéridos que podrán, nuevamente, ser hidrolizados.

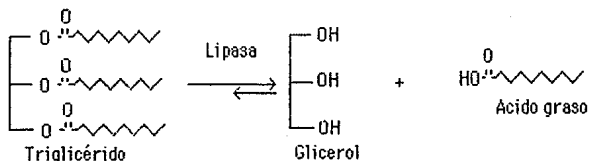
Las lipasas no específicas no distinguen entre las tres posiciones del triglicérido (Sztajer y Zboinska, 1988).

Fig. 5.2 Especificidad de las lipasas

Reacción catalizada por lipasas 1,3 específicas (a):



Reacción catalizada por lipasas no específicas (ab):



(Macrae, 1983)

Matori et al. (1991a) realizaron estudios sobre la especificidad de las lipasas sobre las uniones éster del triglicérido y definieron un Índice de Especificidad (IE) de la siguiente manera:

$$IE = (1,2(2,3)DG - 1,3DG \times 2) / (1,2(2,3)DG + 1,3DG \times 2)$$

Si el IE = +1, se trata de una lipasa específica a.

Si el IE = 0, se trata de una lipasa no-específica ab.

Si el IE = -1, se trata de una lipasa específica b.

La lipasa tipo b hidroliza la posición 2 ó b del triglicérido. Actualmente, no se han descubierto lipasas del tipo b. Los índices de especificidad pueden tener valores entre 0 y 1, esto se relaciona con la afinidad de las lipasas ab por las posiciones 1 y 3, o bien a la pureza de la enzima debido a la posible presencia de lipasas a y ab en el producto enzimático (Matori et.al., 1991a).

El índice de especificidad puede ser afectado por emulsificantes como Tweens, Span y Emulgen. Aún no se conoce como estos surfactantes pueden variar el IE en las lipasas (Matori et.al., 1991b).

A continuación se muestra una tabla de lipasas comerciales de diferente origen. En esta tabla se muestra también el pH óptimo de actividad, la actividad específica del producto comercial y su índice de especificidad.

**Tabla 5.3 Lipasas comerciales**

Nombre y origen de la lipasa	Actividad específica(u/mg)	pH	IE
Lipase AP ( <i>Aspergillus niger</i> ) Amano Pharmaceutical Co. Ltd., Japón.	4.9	6.0	1.0
Lipase LP ( <i>Chromobacterium viscosum</i> ) Tokyo Jozo Co. Ltd., Japón.	2480	7.0	1.0
Palatase M ( <i>Mucor miehei</i> ) Novo Industri Japan Ltd., Japón.	0.6	7.0	1.0
Lipoprotein lipase ( <i>Pseudomonas</i> sp.) Toyobo Co. Ltd., Japón.	1160	8.0	0.76
Lipase B ( <i>Pseudomonas fragi</i> ) Sapporo Breweries Ltd., Japón.	123	9.0	0.72
Lipase MY ( <i>Candida cylindracea</i> ) Meito Sangyo Co. Ltd., Japón.	20.1	7.0	0.61
Rhilipase A10 ( <i>Rhizopus japonicus</i> ) Nagase Sangyo Co., Japón.	20	7.0	1.0
Talipase ( <i>Rhizopus delemar</i> ) Tanabe Seiyaku Co., Japón.	5.6	6.0	1.0
Lipase Sankyo ( <i>Aspergillus</i> sp.) Sankyo, Co., Japón.	3.6	6.0	1.0
Lipase ( <i>Rhizopus arrhizus</i> ) Sigma Chemical Co., USA.	4220	7.7	1.0

continuación...

Nombre y origen de la lipasa	Actividad específica(u/mg)	pH	IE
Lipase PN ( <i>Phycomyces nitens</i> ) Wako Pure Chemical Industries Ltd., Japón.	155	7.0	0.76
Lipase ( <i>Rhizopus delemar</i> ) Seikagaku Kogyo Co. Ltd., Japón.	197	5.6	1.0
Cholesterol esterase (Páncreas) Oriental Yeast Co. Ltd., Japón.	2.9	7.0	1.0
Cholesterol esterase ( <i>Pseudomonas</i> sp.) Toyobo Co. Ltd., Japón.	475	7.0	0.79

(Matori et al., 1991a)

La actividad de las lipasas depende también de la longitud de la cadena y grado de insaturación del ácido graso. De esta manera existen lipasas con afinidad específica para ciertos sustratos (Hedrich et al., 1991; Baillargeon y McCarthy, 1991a; 1991b). Matori et al. (1991b) demuestra que el índice de especificidad de lipasas, provenientes de *Pseudomonas* sp., *G. candidum* y *C. cylindracea*, cambia ante diferentes sustratos. Los microorganismos anteriores hidrolizan mas rápidamente la posición 2 en aceites naturales que en la trioleína (triglicérido sintético del ácido oleico, 18:1).

#### 5.4. Usos de las lipasas

Las lipasas son empleadas ampliamente en la industria (Seitz, 1974).

En la industria de lácteos son empleadas para acelerar la maduración de quesos, así como dar y, resaltar el sabor y olor de ellos (Arnold et al., 1975; Omar, M.M. et al., 1987; Revah y Lebeault, 1989).

Diferentes formas comerciales de lipasas, con diferentes maneras de reaccionarlas tienen uso en la transformación de grasas, las que son usadas en productos como margarinas, confitería y lácteos (Downey, 1980).

La afinidad de las lipasas por ciertas posiciones en los sustratos ha tenido aplicación en la inter- e intra- esterificación de ésteres y triglicéridos, así como en la deodorización de aceites vegetales (Kaimal y Saroji, 1988).

El desarrollo del uso de las lipasas promete muchas aplicaciones en la transformación de grasas y aceites a través de la síntesis de ésteres o inter-esterificación, donde los ésteres son reaccionados con ácidos grasos, alcoholes o ésteres, con el subsecuente intercambio de ácidos grasos (Stavnsbjerg et al., 1988; Kaimal y Saroji, 1988; Shaw et al., 1991). En este

tipo de síntesis el efecto de la actividad de agua en las reacciones juega un papel importante en la producción de ésteres específicos, así como en la velocidad y rendimiento de la reacción (Kang y Rhee, 1988; Touraine y Drapron, 1988; Halling, 1989).

Actualmente se diseñan bioreactores con lipasas inmovilizadas en la producción de glicerol y ácidos grasos para la industria (Kosugi et. al., 1990). Además en la producción de sabores y fragancias mediante conversión de "fusel oil" a ésteres del ácido acético y butírico (Lagrand, et, al., 1988; Welsch y Williams, 1989).

Las lipasas son utilizadas en detergentes como sustitutos de fosfatos estas tienen la ventaja de ser biodegradables y de poder utilizarse a temperaturas bajas resultando en un ahorro de energía (Andree et. al., 1980; Fijii et. al., 1985; Tatera et. al., 1985).

## 6. Material y Métodos

### 6.1. Microorganismos

Apartir de cinco cepas del género *Candida* y *Yarrowia* se realizó la selección de una de estas levaduras, la cual presentara la mejor productividad volumétrica de lipasas.

Las cepas utilizadas fueron las siguientes:

**Tabla 6.1 Nombre y origen de las cepas utilizadas en la selección**

Cepa	Identificación	Origen
<i>C. rugosa</i>	ATCC 14830	Dpto. de Agricultura de E.U.
<i>Y. lipolytica</i>	681	Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo, Brasil
<i>Y. lipolytica</i>	179	Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo, Brasil
<i>Y. lipolytica</i>	his <sup>-</sup>	Instituto Agronómico de Francia
<i>Y. lipolytica</i>	ACP	Instituto de Microbiología de la Academia Ciencia de Praga, Checoslovaquia.
<i>C. utilis</i>	CDBBC245	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, México.

Los microorganismos anteriores fueron mantenidos en tubos inclinados con medio papa-dextrosa-agar (PDA) y resembrados cada dos meses.

*Yarrowia lipolytica* 681 fué seleccionada como la cepa con mejores rendimientos de actividad lipolítica (ver **Resultados y Discusión**).

*Yarrowia lipolytica* ha sido reclasificada en el género *Yarrowia* (Walt y Arx, 1980), anteriormente clasificada en el género *Saccharomycopsis* por Yarrow (1972) e inicialmente clasificada en el género *Candida* (Harrison, 1928). *Yarrowia lipolytica* ha sido aislada de suelos, de sustratos grasos como, cornea humana y tejido pulmonar de bovinos, así como de aceites vegetales de maíz y oliva (Kreger-van Rij, 1984).

*Yarrowia lipolytica* 681, cuando fué crecida en PDA, presentó colonias de color blanco a crema con forma lisa en los primeros días hasta presentar una forma rugosa.

*Yarrowia lipolytica* 681, en medio sumergido, presentó pseudomicelio cuando fué crecida en el medio base indicado anteriormente y células ovoides cuando fué crecida en un medio complejo como el medio Whickerham.

## 6.2. Condiciones de cultivo

### 6.2.1. Condiciones de cultivo en la selección de la cepa

#### 6.2.1.1. Selección en caja petri

El medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA) fué preparado con 1% de aceite de oliva y 10 000 ppm de azul de nilo (Rhodes, 1959). El medio ya esterilizado fué homogeneizado y vertido dentro de cajas petri.

Por otra parte, medios de cultivo sin aceite de oliva, pero con tributirina fueron preparados de la misma forma pero sin el azul de nilo.

Las cajas petri inoculadas, con las levaduras mencionadas anteriormente, fueron incubadas a 27 °C en una incubadora Lab-Line modelo 320 (LAB-LINE Instruments, Inc.).

#### 6.2.1.2. Selección en medio líquido

Las levaduras, del género *Candida* y *Yarrowia*, fueron crecidas en un medio Whickerham (Manual Difco, 1977) para propagación de levaduras con la presencia de aceite de oliva al 1%, como inductor. Las cepas fueron cultivadas en matraces agitados a 30 °C, 200 rpm, pH inicial de 4.5 por un lapso de 48 horas (ver **Condiciones de cultivo en líquido en matraces agitados**).

## 6.2.2. Condiciones de cultivo en líquido

### 6.2.2.1. Condiciones de cultivo en líquido en matraces agitados.

Los cultivos en medio sumergido se realizaron en matraces Erlenmyer de 250 cc de volumen total. El volumen de medio de cultivo fue de 50 cc.

*Yarrowia lipolytica* fué crecida en un agitador New Brunswick modelo G76 con baño de agua a temperatura controlada de 30 °C, pH inicial de 4.5 y agitación de 200 rpm.

La cantidad de inóculo fue del 2% de un precultivo, con respecto al volumen de medio de cultivo, crecido por 24 horas en las condiciones de temperatura, pH y agitación mencionadas anteriormente. El inóculo siempre fué crecido en el medio base sin la presencia de inductor (aceite de oliva), para eliminar posibles efectos inhibitorios como acarreo de subproductos de la hidrólisis de triacilglicéridos.

#### 6.2.2.1.1. Medio de cultivo

El medio de cultivo base para el crecimiento y producción de lipasas, en medio líquido, fué seleccionado con base a los reportes de Ota et. al. (1968a), Whickerham (1951), Olson y Johnson (1948). También fué seleccionado con la finalidad de contar con un medio definido para así conocer los componentes del medio.



El medio de crecimiento base fue el siguiente:

20 g/l	Glucosa
2 g/l	Urea
10 g/l	Aceite de oliva como inductor

Vitaminas:

4 ug/l	Inositol
8 ug/l	Biotina
200 ug/l	Tiamina

Salas:

1.0 g/l	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
0.5 g/l	MgSO <sub>4</sub>
0.1 g/l	CaCl <sub>2</sub>
0.1 g/l	NaCl

Oligoelementos:

500 ug/l	H <sub>3</sub> B
40 ug/l	CuSO <sub>4</sub>
100 ug/l	KI
200 ug/l	FeCl <sub>2</sub>
400 ug/l	ZnSO <sub>4</sub>
400 ug/l	MnSO <sub>4</sub>

(Olson y Johnson, 1946; Whikerham, 1951; Ota et. al., 1968b; Manual Difco, 1977).

La fuente de carbono, el aceite de oliva (inductor) y sales fueron esterilizadas por vapor. La urea y vitaminas fueron, previamente, esterilizadas por filtración y agregadas al medio de cultivo después de esterilizado.

La urea tiene un punto de fusión de 132.7 C, temperaturas superiores la descomponen formandose compuestos de amonio (Langes, 1973).

Se observó el efecto de la urea esterilizada por vapor y esterilizada por filtración. Los resultados demostraron que la urea esterilizada por vapor resulta en una menor producción de biomasa, pero no afecta la producción volumétrica de lipasas.

#### 6.2.2.2. Condiciones de cultivo en líquido a pH controlado.

*Yarrowia lipolytica* 681 fué crecida en condiciones controladas de pH en un fermentador New-Brunswick modelo Bioflo III con un volumen de trabajo de 2.5 litros.

Las condiciones de cultivo fueron modificadas tomando como base los resultados obtenidos sobre la producción de lipasas en matraces agitados.

El pH fué mantenido en 5.0, la temperatura en 28 °C y la agitación en 400 rpm. La fuente de carbono fué únicamente aceite de oliva al 2%, a la vez que fué el inductor de la enzima, y urea al 0.2% como fuente de nitrógeno. Se mantuvo un flujo de aire de 1 litro/min.

La concentración de sales fue la misma que la utilizada en el cultivo en matraces agitados.

### **6.2.3. Condiciones de cultivo en medio sólido**

#### **6.2.3.1. Condiciones de cultivo en columnas empacadas**

##### **6.2.3.1.1. Condiciones de cultivo en columnas**

*Yarrowia lipolytica* 681 fué crecida sobre Amberlita IRA-900 por espacio de 100 horas con el propósito de determinar un tiempo óptimo de producción de lipasas bajo ciertas condiciones de cultivo.

*Yarrowia lipolytica* 681 fué crecida con una temperatura de 28 °C, con un pH inicial de 5.0. La cantidad de inóculo fue en 2% v/ volumen de medio de cultivo y una humedad del 60%. Un flujo de aire saturado de 4 a 6 l/h fué alimentado através de la columna de crecimiento con el fin de proporcionar oxígeno necesario para el crecimiento y evitar la pérdida de humedad del soporte.

Las columnas fueron empacadas con 0.38 a 0.43 g/cc de soporte húmedo.

La composición del medio de cultivo fue la misma que la utilizada sobre matraces agitados con 0.05% de tween 80.

##### **6.2.3.1.2. Preparación del medio de cultivo sólido**

El medio de cultivo base, que a su vez resultó uno de los medios que aumentaron el rendimiento de lipasas (ver **Resultados y Discusión**), ya citado anteriormente, fué inoculado con el 2% de un precultivo y homogeneizado suavemente con el fin de dispersar el aceite de oliva en el medio. El medio resultante fué mezclado dentro de un vaso de precipitado, previamente esterilizado, con la amberlita IRA-900 en una cantidad tal que existieran del 58 al 60% de medio de cultivo sobre la resina. Posteriormente, las columnas, previamente esterilizadas, fueron empacadas con la mezcla soporte-medio.

El soporte y el aire fueron usados en condiciones no estériles.

##### **6.2.3.1.3. Soporte**

El soporte fue una resina de intercambio iónico llamada Amberlita IRA-900 (Rohm y Haas, 1984).

El soporte (Amberlita IRA-900) fué preparado de la siguiente manera:

Cien gramos de soporte fueron lavados 5 veces con agua destilada con el fin de eliminar polvo y otras impurezas presentes en la resina.

La Amberlita IRA-900 fué ajustada a pH 5.0 con HCl 0.1 N y vuelta a lavar

para separar carbonatos que resultaron del intercambio iónico con el HCl.

Posteriormente, la resina fué secada a 40 °C, por 48 horas.

Algunas propiedades físico-químicas de la Amberlita IRA-900 se presentan a continuación:

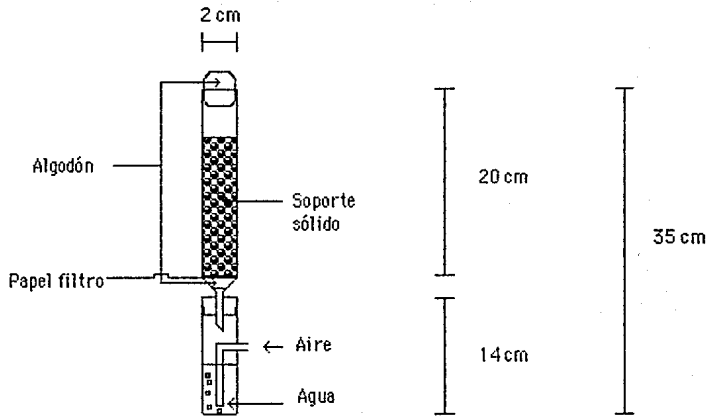
- Forma: Esférica
- Diámetro medio: 0.53 mm
- Rango de diámetro (soporte húmedo): 16 a 50 mesh
- Rango de diámetro de los poros: 2.5 a 23  $\mu$ m
- Densidad real: 1.07 g / cc
- Densidad aparente: 0.672 g / cc
- Humedad de retención: 58 - 60%
- Rango de trabajo de pH: 0-14
- Forma iónica: Cloruros
- Capacidad de intercambio iónico: 4.2 meq de resina en forma de cloruros
- Limite de temperatura de trabajo: 60 °C

(Hernández y Auria, 1990, Rohm y Haas, 1984)

#### **6.2.3.1.4. Columnas y sistema de cultivo en sólido**

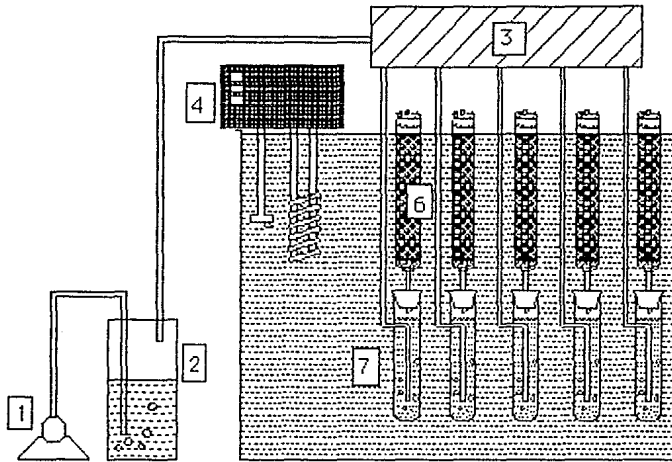
El crecimiento de *Yarrowia lipolytica* 681 sobre el soporte sólido fué realizado en un bioreactor tipo columna (Raimbault y Alazard, 1980).

En la figura siguiente se muestra el tipo de columna usado, así como las dimensiones de esta.

**Fig. 6.1 Dimensiones de las columnas utilizadas en el cultivo sólido**

A continuación se muestra un diagrama del sistema utilizado para el crecimiento de *Yarrowia lipolytica* 661 en soporte sólido con las columnas empaçadas.

Fig. 6.2 Sistema de cultivo sólido



1. Bomba, 2. Prehumidificador, 3. Regulador de flujos, 4. Regulador de temperatura, 5. Baño de agua a temperatura controlada, 6. Bioreactores tipo columna, 7. Humidificadores.

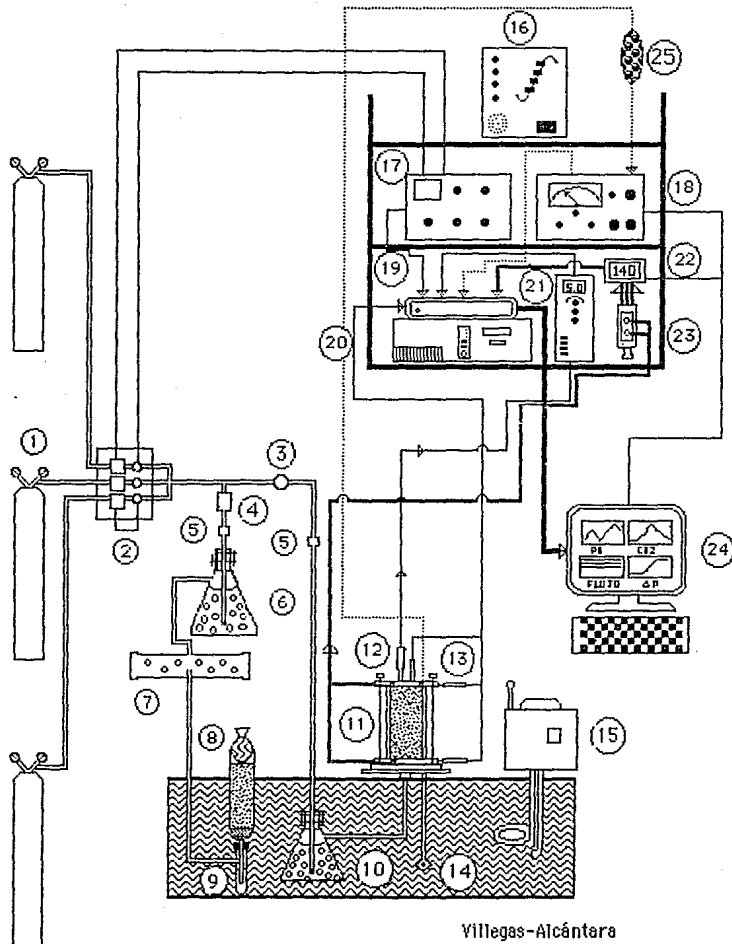
#### 6.2.3.2. Cultivo en sólido con captura de datos en línea

En este sistema la dimensión de la columna fue mayor (diámetro: 4cm, largo: 15 cm) y se trabajó con un flujo de aire saturado de 25 l/hr, no esétil.

La temperatura, el pH y medio de cultivo fue el mismo que el utilizado en el crecimiento en columnas.

El sistema de captura de datos en línea del cultivo en sólido se muestra a continuación:

Fig. 6.3 Sistema de cultivo sólido para captura de datos en línea



1. Tanque de aire, 2. Transductores y válvulas de control, 3. Reguladores de presión de un solo paso, 4. Válvula reguladora de flujo, 5. Válvula "check", 6. Humidificador, 7. Regulador de flujos, 8. Columna empacada, 9. Humidificador de la columna, 10. Baño de agua a temperatura controlada, 11. Bioreactor, 12. Sonda de pH, 13. Termopares, 14. Bomba recirculadora de agua, 15. Termoregulador, 16. Fuente de poder de voltaje, 17. Controlador de flujo, 18. Analizador de CO<sub>2</sub> (Beckman), 19. Tarjeta de adquisición de datos, 20. Unidad de almacenamiento de datos, 21. Potenciómetro, 22. Medidor digital de caída de carga, 23. Transductor de presión, 24. Monitor, 25. Trampa de agua.

### **6.3. Métodos analíticos**

#### **6.3.1. Métodos analíticos en la selección de la cepa**

La actividad lipolítica en caja petri fué medida por el halo de hidrólisis formado por cada colonia. La diferencia entre el halo de hidrólisis y el halo de la colonia fue el patrón de comparación.

Las cajas petri con azul de nilo y aceite de oliva revelaron un halo de hidólisis azul en las cepas con actividad lipolítica. Las cajas petri con tributirina revelaron un halo transparente en las cepas con actividad lipolítica.

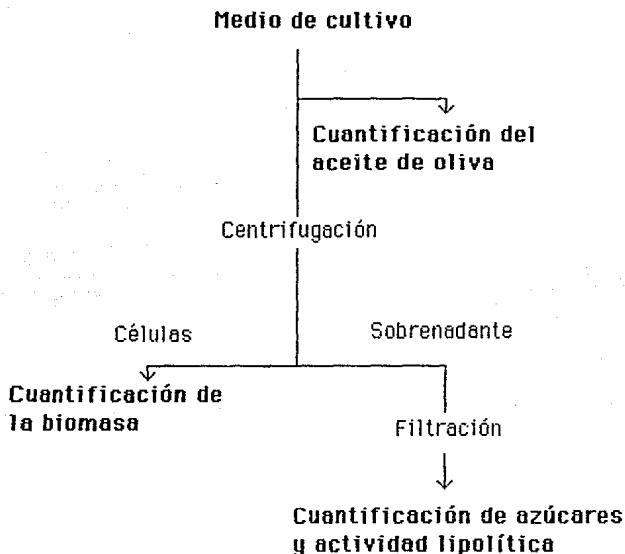
La cepa con la diferencia mayor entre el halo de hidrólisis y el halo de la colonia fue la cepa seleccionada como la mejor productora de lipasas.

La actividad lipolítica y la biomasa en la selección en medio líquido fué analizada como en **Métodos analíticos en el cultivo en líquido**.

#### **6.3.2. Métodos analíticos en el cultivo en líquido**

De una manera general, a continuación se muestra un diagrama de flujo del procedimiento para obtener las muestras que sirvieron de análisis para cuantificar la biomasa, la actividad lipolítica y el sustrato después del crecimiento de *Yarrowia lipolytica* 681.

Fig. 6.4 Diagrama de flujo del análisis de muestras



### 6.3.2.1. Biomasa

La biomasa fué determinada por peso seco.

Las levaduras del medio de cultivo fueron separadas por centrifugación a 300 rpm a 15 °C en una centrífuga Beckman modelo GS-6KR. Las levaduras fueron lavadas con solución isotónica de NaCl al 1% p/p. Posteriormente, fueron retenidas sobre papel filtro GF-A, previamente pesados a peso constante en una balanza Dhaus modelo Galaxy-160, y secadas en un horno Ríos-Rocha modelo HS a 60 °C por un período de 24 horas.

### 6.3.2.2. Actividad lipolítica

La actividad lipolítica fué cuantificada por titulación con una solución de NaOH 0.1N del ácido butírico liberado por hidrólisis de la tributirina (triglicérido del ácido butírico).

Una unidad enzimática de lipasa fué definida como la cantidad de micromoles de NaOH gastados en un minuto, proporcionales a los micromoles de ácido butírico liberados en un minuto en las condiciones del sistema.

El método empleado fue el descrito por Dta et. al. (1982), modificado con

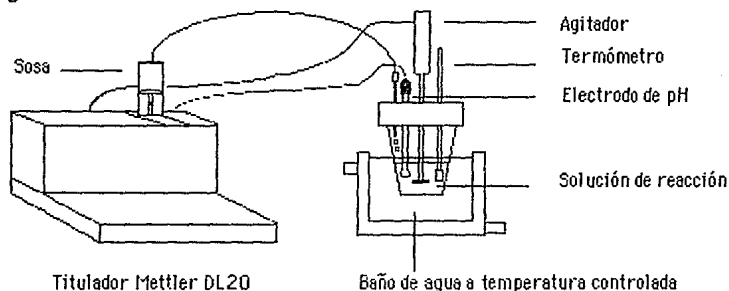


respecto a las condiciones de equipo en el lugar de trabajo.

La titulación del ácido butírico se realizó en un titulador automático Mettler DL-20, el cual tiene integrado en su vaso de reacción un agitador de varilla y un electrodo para medir el pH. La agitación en este aparato puede ser variada de 0 a 3200 rpm.

El sistema utilizado para medir y observar la actividad lipolítica se muestra a continuación:

Fig. 6.5 Titulador Mettler DL-20



La composición del medio de reacción fue la siguiente:

6 cc de buffer 0.2M Tris-Malatos a pH 7.4

3 cc de solución de  $\text{CaCl}_2$  0.03M

15 cc de agua destilada

(Ota et. al., 1982)

1 cc de tributirina emulsificada al 17.9% p/p

(Lamberet y Lenoir, 1976)

La cantidad de extracto enzimático, añadida al medio de reacción, fue de 1 centímetro cúbico. Cuando el extracto enzimático presentó poca actividad, se realizó el mismo ensayo con 3 cc de sobrenadante o extracto para aumentar la concentración de lipasa en el medio de reacción y así ampliar la medida de actividad. Cuando no hubo respuesta de actividad con 3 cc de sobrenadante durante 5 minutos de reacción, se declaró sin actividad al extracto o sobrenadante.

El ensayo de actividad enzimática se realizó a un pH inicial de 7.4 con una temperatura de 37 °C.

El electrodo de pH fué calibrado con soluciones buffer de fosfatos a pH 4 y 7.

La temperatura fué controlada con un baño de agua regulada por un regulador de temperatura HAAKE FS (HAAKE Instruments Inc.).

La actividad lipolítica fué detenida por la adición de 10 cc de una mezcla isopropanol-acetona, en proporción 1 a 1 en volumen (Ota et. al., 1982).

El sustrato (tributirina) fué emulsificada de acuerdo al método de Lamberet y Lenoir (1976).

La emulsión de tributirina estuvo compuesta de:

25 cc de tributirina

10 cc de tween 20 al 1%

100 cc de agua destilada

La agitación se fijó en 1260 rpm y fue constante en todos los ensayos de actividad realizados. La agitación fue vigorosa y no se observó turbulencia en el medio de reacción.

Un control negativo fué cuantificado para cada ensayo de actividad. El control negativo fué medido en las mismas condiciones del sistema pero sin la presencia de tributirina. La tributirina le fué agregada posterior a la adición de solventes y entonces fué realizada la titulación.

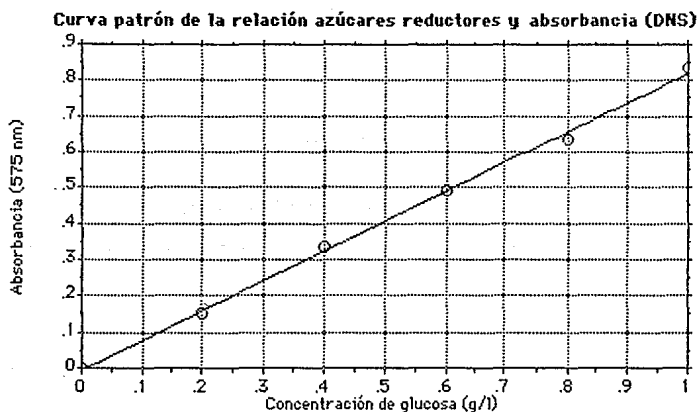
Las modificaciones, el método y la validación del método estan presentados en la sección **Método para la determinación de actividad lipolítica y características de la lipasa de *Yarrowia lipolytica* 681.**

### 6.3.2.3. Azúcares

La glucosa fué determinada por medio del reactivo, ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS, Sigma), ensayo para azúcares reductores, siguiendo el método de Miller (1959).

Un mililitro de sobrenadante libre de células fué mezclado con un mililitro de solución de DNS (Miller, 1959). La mezcla fue puesta en baño maría y mantenida a ebullición por 5 minutos. La solución fué dejada enfriar y, posteriormente, fué diluida a 10 mililitros. Se midió la absorbancia a 575nm de la solución diluida en un Spectrofotómetro Spectronic 20D (Milton Roy Co.)

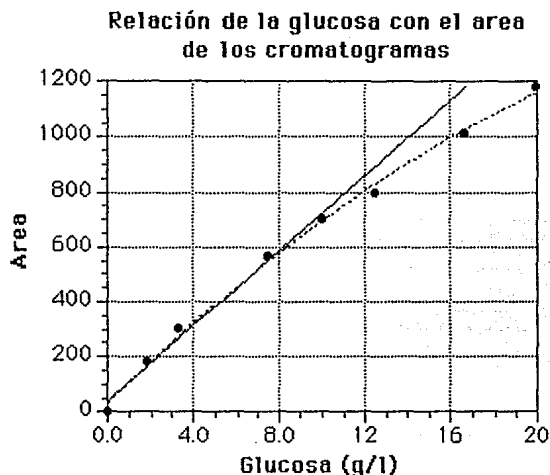
La relación Absorbancia a 575 nm-Glucosa del método DNS se muestra a continuación (Fig. 6.6).



La glucosa también fue cuantificada por cromatografía en líquido usando un cromatógrafo Hewlett-Packard modelo 1081B con una columna Aminex HPX-87H (Biorad) para compuestos orgánicos.

La concentración de glucosa, en el cromatógrafo, fue determinada por índice de refracción mediante un detector Hewlett Packard 79877A e integrada mediante un integrador Spectra-Physics SP4290. Se tomaron 10 microlitros de muestra del sobrenadante libre de células. La muestra fue inyectada al cromatógrafo y entonces acarreada por una solución 1 mM de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, con un flujo de 0.8 cc/min, a través de la columna a 60 °C.

A continuación (Fig. 6.7) se muestra la relación del área de los cromatogramas obtenidos y la concentración de la glucosa.



#### 6.3.2.4. Aceite de oliva

El aceite de oliva (inductor) fué cuantificado gravimétricamente. El aceite de oliva fué separado del medio de cultivo mediante su extracción con cloroformo. Un volumen de 30 cc de medio de cultivo con una concentración máxima de 10 mg de aceite de oliva / cc fué extraída dos veces con 10 cc de cloroformo. La solución orgánica cloroformo-aceite fué secada con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro y, posteriormente, filtrada. El filtrado fué secado en un horno Ríos-Rocha modelo HS a 60 °C por un lapso de 24 horas y el residuo pesado en una balanza Ohaus modelo Galaxy-160.

El cloroformo extrajo 0.025 g de aceite de levaduras / g de levaduras secas (desviación standart  $\pm 0.0005$ ), este dato sirvió para corregir los datos de aceite de oliva consumido por el microorganismo en el medio de cultivo.

Dos extracciones de 10 cc de cloroformo fueron necesarias para remover una concentración de hasta 30 g/l de aceite de oliva del medio de cultivo. Lo anterior demostró que la cantidad de cloroformo utilizada, así como las extracciones, fueron suficientes para remover el aceite de oliva presente en los medios de cultivo.

### 6.3.3. Métodos analíticos en cultivo sólido

La actividad y la biomasa fueron cuantificadas según los procedimientos descritos anteriormente. Los procedimientos de extracción de la enzima y la biomasa del soporte se discuten en la sección de **Resultados y análisis de los resultados**.

El pH fué medido homogeinizando 1 g de soporte húmedo en 5 ml de agua destilada. Posteriormente, el pH de la solución resultante se determinó con el electrodo de pH del titulador Mettler DL-20.

La humedad del soporte se midió gravimétricamente. Tres gramos de soporte húmedo, de las columnas donde se llevo a cabo el crecimiento de la levadura, fueron separados y secados en un horno a 40 °C por un periodo de 48 horas.

### 6.4. Análisis estadístico

Los ensayos de actividad lipolítica, biomasa, azúcares, aceite de oliva, pH y humedad, así como medida del halo de hidrólisis en caja petri fueron realizados por duplicado, la media de los duplicados fué tomada como resultado.

En los experimentos en matraces agitados y columnas, algunos experimentos fueron realizados por duplicado, y el error generado por uno o dos de estos duplicados fué extrapolado a los demás experimentos. Se manejó un 95% de confiabilidad en todos los experimentos.

### 6.5. Reactivos

Los reactivos empleados en los medios de cultivo y en los métodos de cuantificación fueron grado reactivo provenientes de Sigma de México, S.A., Sigma Chemical Co. (USA), J.T. Baker S.A. (México) y Bioxon de México, S.A.

## 7. Resultados y Discusión

### 7.1. Selección de la cepa productora de lipasas

#### 7.1.1. Selección sobre cultivo sólido

Se realizó una primera selección en caja petri (medios sólido) con la presencia de tributirina y aceite de oliva como reveladores de actividad lipolítica.

Las cajas petri fueron inoculadas con las diferentes cepas de levaduras. La actividad lipolítica fue revelada por la formación de un halo de hidrólisis azul en los medios con aceite de oliva y azul de nilo.

Los medios de cultivo con tributirina presentaron un halo de hidrólisis transparente en las levaduras con actividad lipolítica.

Los resultados de actividad, según los halos de hidrólisis obtenidos, fueron los siguientes:

*Yarrowia lipolytica* 681 reveló actividad en los dos medios a los dos días de incubación.

*Candida rugosa*, ATCC 14830, reveló actividad en el medio suplementado con tributirina a los ocho días y con aceite de oliva a los diez días de incubación.

Las demás levaduras revelaron actividad entre los tres y cuatro días de incubación con un halo de hidrólisis semejante al producido por la cepa 681.

Los halos de hidrólisis fueron incrementándose dependiendo del tiempo de incubación. El halo de hidrólisis mayor fué el presentado por la cepa 681.

*Candida utilis* CDBBC245 fué utilizada como control y no presentó halo de hidrólisis durante el tiempo de incubación en ninguno de los medios sólidos.

#### 7.1.2. Selección sobre cultivo líquido

Otra selección de los mismos microorganismos se realizó midiendo la actividad lipolítica de estos cuando crecieron en medio líquido.

La selección de la cepa con mayor producción de lipasas se realizó paralelamente al desarrollo del método de cuantificación de actividad lipolítica.

Los resultados obtenidos de actividad lipolítica de las levaduras crecidas en medio líquido fueron los siguientes:

**Tabla 7.1 Resultados de actividad lipolítica y biomasa durante la selección de la cepa**

Cepa	Identificación	Actividad (u/cc)	Biomasa (mg/cc)	Actividad específica (mg/cc)
C. rugosa	ATCC 14830	0	9.40	0
Y. lipolytica	681	9.67	11.40	0.84
Y. lipolytica	179	1.73	8.20	0.21
Y. lipolytica	his <sup>-</sup>	3.3	10.70	0.31
Y. lipolytica	ACP	8.78	14.20	0.61
C. utilis	CDBBC245	0	11.20	0

Con base a los resultados anteriores se consideró a la cepa *Yarrowia lipolytica* 681 con la mejor producción de lipasas sobre los medios de cultivo en líquido y sólido, con respecto a las otras cepas.

### 7.1.3. Conclusiones

Los medios de cultivo en sólido, usando agar como soporte, con la presencia de inductores (aceite de oliva y tributirina) son un buen método de selección de cepas productoras de lipasas. Los halos de hidrólisis formados por el crecimiento de las levaduras fueron un buen patrón de referencia para esta selección.

El medio Wickerham, para propagación de levaduras, es un medio complejo el cual tiene los suficientes elementos para el crecimiento de estos microorganismos. El crecimiento de las levaduras, en medio líquido, fue parado a las 48 horas, tiempo en el cual se determinó la producción de lipasas. Es importante tomar dos o más puntos durante el crecimiento de las levaduras para conocer si alguna de ellas mantiene un mejor rendimiento de lipasas sobre las otras, con esto se tendría una mayor seguridad sobre la selección de la cepa.

*Candida utilis* CDBBC245 fue un control en la cuantificación de actividad lipolítica en caja petri debido a que no se observó halo de hidrólisis en ninguno de los medios de cultivo al igual que en medio líquido.

## 7.2. Método para la determinación de actividad lipolítica y características de la lipasa de *Yarrowia lipolytica* 681

Los objetivos de esta parte del trabajo fueron determinar las condiciones del sistema del ensayo de la lipasa producida por *Yarrowia lipolytica* 681 y conocer algunas de las características de la enzima dentro del sistema utilizado para su cuantificación.

A continuación se mencionan los pasos seguidos para alcanzar los objetivos propuestos en esta sección.

-Determinar una concentración de sustrato que permita medir la actividad lipolítica en condiciones en donde la concentración de sustrato sea mayor a la constante de afinidad de la enzima, por el sustrato, según la cinética de Michaelis-Menten ( $[S] \gg [K_m]$ ). De esta manera cuantificar la lipasa en condiciones cercanas a la actividad lipolítica máxima.

-Determinar un pH y una temperatura de ensayo donde la lipasa tenga un máximo de actividad lo cual permita ampliar la cuantificación de esta.

-Conocer algunas limitaciones del sistema mediante el efecto de "activadores", concentración y tipo de buffer sobre la lipasa.

-Conocer como parar la reacción enzimática mediante la inactivación de la lipasa y/o separación del sustrato de la enzima, sin que afecte la cuantificación de actividad.

-Conocer otras opciones de ensayo de actividad lipolítica.

-Determinar la estabilidad de la enzima después de que esta haya sido extraída de los medios de cultivo. De esta manera medir actividad sin que existan pérdidas significativas de la misma.

-Conocer el efecto de los productos de la hidrólisis de los triacilglicéridos sobre la lipasa.

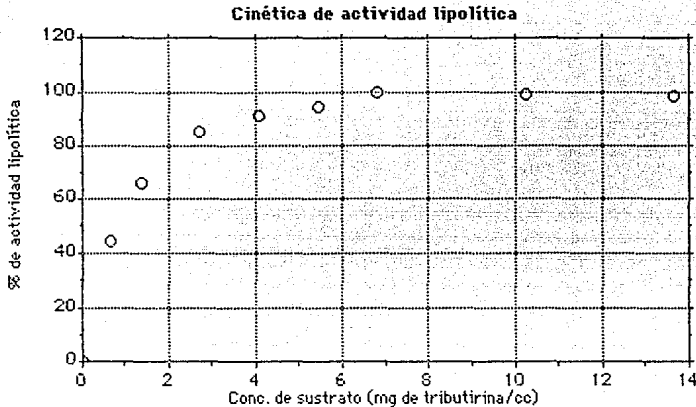
-Conocer la afinidad de la lipasa de *Yarrowia lipolytica* 681 por otros sustratos.

### 7.2.1. Efecto de la concentración de sustrato

Se realizó una cinética de actividad enzimática en relación a la concentración del sustrato. La dependencia de la actividad lipolítica con la tributirina mostró que la reacción obedece a la cinética clásica de Michaelis-Menten.



La siguiente figura (Fig. 7.1) muestra la cinética de actividad contra la concentración de sustrato, cada punto fue cuantificado en un lapso de 5 minutos de actividad lipolítica.



Al analizar los parámetros cinéticos de la ecuación de Michaelis-Menten se utilizó la transformación lineal de Hanes. La ecuación de Hanes, al igual que la ecuación de Eadie-Hofstee, no comprime los datos a altas concentraciones y no exagera la importancia de los puntos a concentraciones bajas tal como se observa en la ecuación de Lineweaver-Burk (Fersht, 1980).

Los resultados demostraron una  $K_m=0.48$  mg/cc y una  $V_{max}=16.33$  (100% en la gráfica anterior) unidades de lipasa por mililitro de extracto enzimático.

La  $K_m$ , considerando ciertos criterios del sistema Enzima-Sustrato, es una medida de la afinidad de la enzima por el sustrato y es independiente de la concentración de la enzima (Wood et. al., 1974).

El coeficiente de correlación de la recta;

$$[S]/v = [S]/V_{max} + K_m/V_{max} \dots\dots\dots \text{(transformación de Hanes)}$$

fué:

$$r = 0.9982$$

En acuerdo con la ecuación de Michaelis-Menten una enzima es completamente saturada por el sustrato a infinitas concentraciones del sustrato. Como es imposible trabajar en condiciones de 100% de actividad se determinó una concentración base, en términos donde la enzima se encontró

cercana a la saturación.

Para una concentración de sustrato [S] equivalente a 17.9 mg de tributirina / cc (1cc de tributirina emulsificada), se tiene 14.2 veces la concentración de la Km obtenida. Con tal concentración de sustrato la actividad lipolítica fue el 93% de la actividad lipolítica máxima, actividad suficiente para realizar el ensayo enzimático (Palmer, 1987).

Con los resultados anteriores se fijó una concentración de sustrato no limitante para la enzima por un periodo de 5 minutos.

Desnuelle (1961) y Benzoana y Desnuelle (1965) demuestran que la actividad lipolítica también sigue la ecuación de Michaelis-Menten cuando el sustrato es expresado en unidades de área interfacial entre unidades de volumen. En sus trabajos observan que la actividad se aumenta cuando se incrementa el área de la interfase lo que lleva consigo un incremento en la cantidad de enzima adsorbida en dicha interfase. Ucar et. al., (1969) demuestra que la hidrólisis es proporcional a la cantidad de enzima adsorbida en la interfase sustrato-agua. Esto hace suponer que las lipasas tienen dos sitios activos; uno catalítico y otro que une a la enzima con la interfase (Rostrup-Nielsen et. al., 1990).

La actividad lipolítica es observada en sustratos insolubles los cuales forman una interfase. Posiblemente la interacción enzima-sustrato solo se lleve a cabo en este estado físico de insolubilidad (Dixon y Weeb, 1979).

Con lo anterior podemos inferir que el sustrato puede ser limitante para la enzima dependiendo de la relación área-volumen y de la concentración del sustrato.

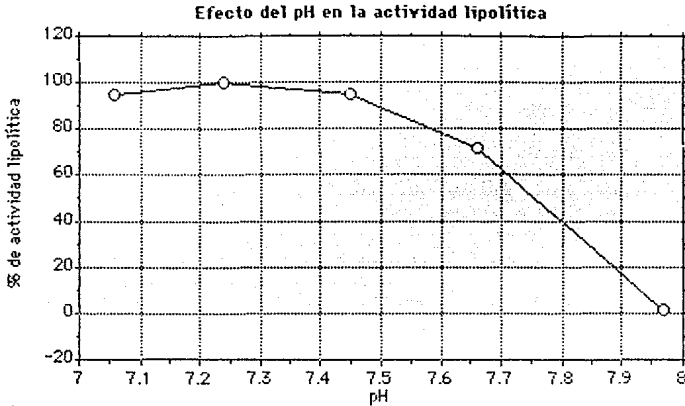
La tributirina es un triglicérido sintético del ácido butírico la cual fue emulsificada en presencia de tween 20. La emulsión fue realizada en un ultraturrax a una velocidad y tiempo fijo, con eso se consideró mantener una relación área-volumen constante del sustrato.

### 7.2.2. Efecto del pH

La actividad de las enzimas varía con el pH en la misma forma que se ionizan los ácidos y bases sencillas. Esto se debe a que los sitios activos, generalmente, contienen grupos ácidos o básicos. Es de esperar que si sólo una forma protónica del ácido o de la base es catalíticamente activa, entonces de alguna manera la catálisis dependerá de la concentración de la forma activa de la enzima (Ferhst, 1980).

El pH óptimo de actividad de las lipasas de levaduras varía en un rango de 7.0 a 8.2 (Ota et. al., 1966a, 1966b; Tomizuka et. al., 1966a, 1966 b) dependiendo del buffer y concentración del activador (Ota y Yamada, 1966a, 1966b).

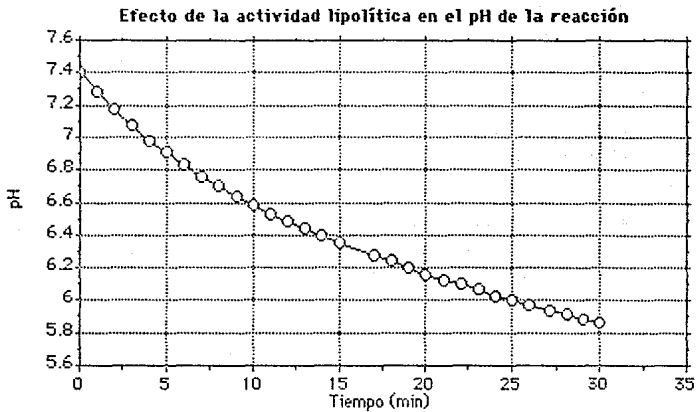
El efecto del pH en la lipasa de *Yarrowia lipolytica* 681 puede apreciarse en la figura (Fig. 7.2) siguiente:



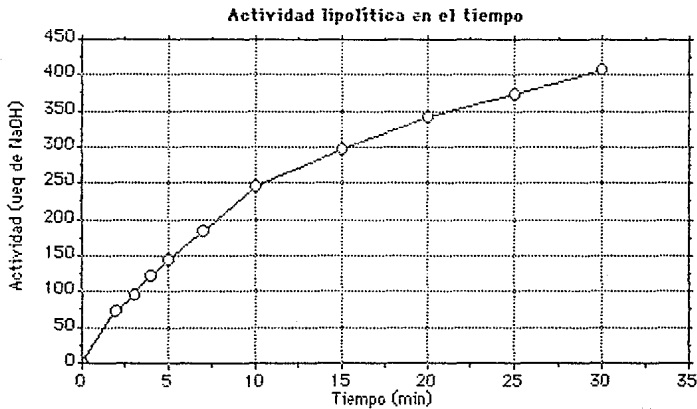
La actividad es afectada por el pH y también por la cantidad de sustrato, en el tiempo. Ambos efectos están ligados, ya que, a mayor acidez del medio de reacción, mayor consumo de sustrato.

La actividad lipolítica no fue medida a pH constante.

El ácido butírico generado por dicha actividad acidifica el medio de reacción. La siguiente figura (Fig. 7.3) muestra el cambio del pH en el tiempo durante el ensayo de actividad.



Esta caída de pH esta asociada a la actividad lipolítica. En la figura (Fig. 7.4) siguiente se muestra el consumo de sosa por efecto de la generación de ácido butírico.



Se observó que la actividad enzimática no tuvo efectos significativos mayores al 5%, en la actividad, en un rango de pH de 7.4 (inicial) a 6.9.

En este rango de pH se consumieron 150 micromoles de NaOH y se tuvo una velocidad de reacción de al menos el 93% de la máxima actividad enzimática, según la cinética Michaelis-Menten de la lipasa.

Los ensayos de actividad fueron realizados, entonces, considerando el efecto de la caída de pH. Es decir, en un rango de pH de 7.4 a 6.9 no existió limitación de sustrato, ni efectos significativos de pH.

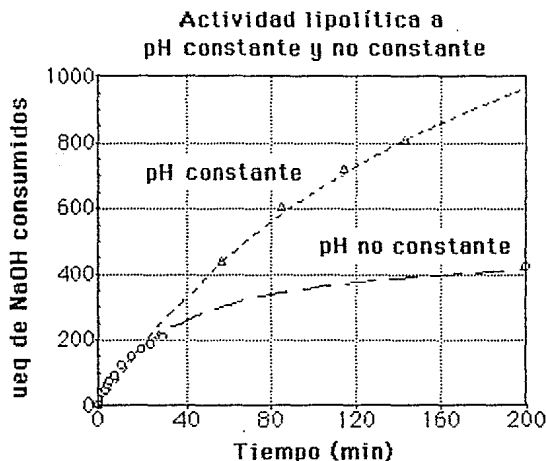
La reacción enzimática fué seguida cuidando no caer a bajo de un pH de 6.9 y por tanto no consumir mas de 150 micromoles de NaOH.

El pH del ensayo de actividad fué fijado en 7.4.

### 7.2.2.1. Efecto de la actividad lipolítica a pH constante

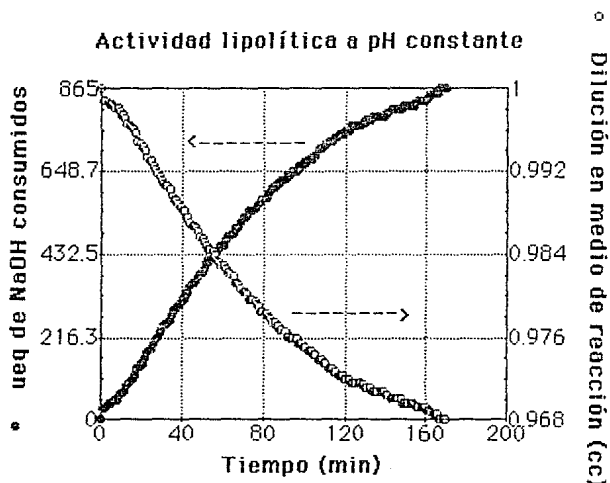
La desventaja de la cuantificación de la actividad lipolítica a pH constante, según algunos autores, es el efecto de dilución de la enzima y el incremento de fuerza iónica en el medio de reacción donde se mide dicha actividad. La ventaja es el eliminar el efecto del pH.

La siguiente gráfica (Fig. 7.5) muestra la actividad lipolítica a pH constante y a pH no constante:



Se observa claramente el efecto del pH sobre la actividad lipolítica. La cuantificación de lipasa sin control de pH afecta la reacción enzimática. La conversión de la tributirina puede llegar a ser totalmente convertida a ácido butírico cuando se controla el pH de la reacción, esta es una clara ventaja que debe tomarse en cuenta en la producción de ácidos grasos, así como en las reacciones de esterificación en donde este involucrado el uso de la lipasa.

La figura (Fig. 7.6) siguiente muestra el efecto del ensayo de la actividad enzimática a pH constante.



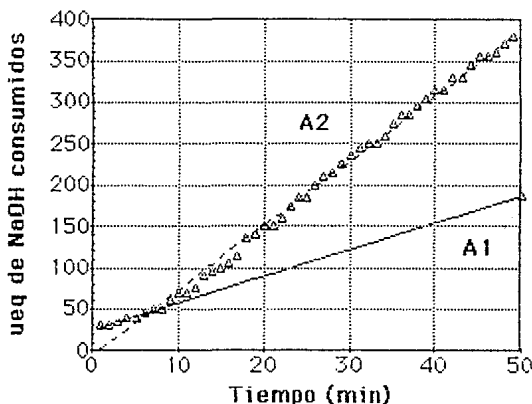
Se observó que la actividad lipolítica a pH constante no es afectada significativamente ( $n.s.=0.5$ ) por la adición de sosa al medio de reacción.

El medio de reacción se llega a diluir en un 0.2% de su volumen inicial, error que se contempla en la preparación de la solución de reacción por el error en el manejo del material de laboratorio.

Se observa que la actividad lipolítica decrece conforme al tiempo, este efecto, posiblemente, es debido a la limitación de sustrato en el medio de reacción, lo cual repercute en la velocidad de reacción de la enzima, o bien puede deberse a la posible desestabilización de la enzima ante la temperatura (Ota et. al., 1982).

La gráfica (Fig. 7.7) que se muestra a continuación es el ajuste lineal del consumo de sosa durante el ensayo de actividad lipolítica a pH constante.

### Ajuste lineal de la actividad lipolítica a pH constante



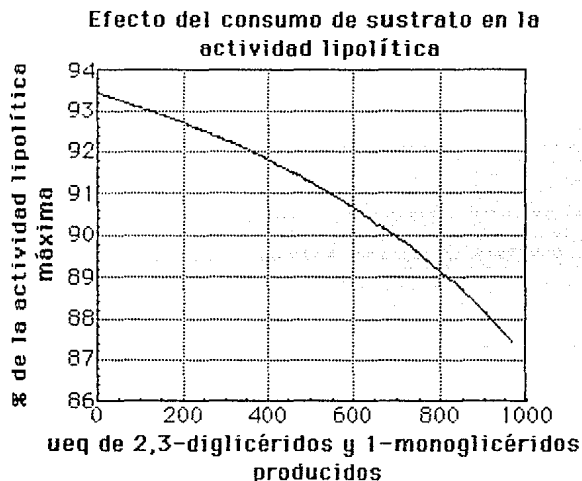
Se observan dos ajustes, uno en los primeros 10 minutos de reacción, y el otro durante los siguientes 40 minutos.

Los ajustes muestran una baja actividad lipolítica durante los primeros 10 minutos (A1), y otra a partir de los 10 minutos (A2).

La actividad A2 fué mayor a la A1. Puede inferirse, dada la naturaleza insoluble del sustrato y al sistema de acción, en particular, de la lipasa, que la actividad lipolítica depende de la cantidad de enzima adsorbida en la interfase del sustrato, tal como lo menciona Ucar et. al. (1989) y Rostrup-Nielsen et. al. (1990). Cuando la enzima es adsorbida totalmente en dicha interfase, es cuando la lipasa muestra una actividad máxima dependiendo de la concentración del sustrato en el medio de reacción.

La concentración de tributirina agregada al medio de reacción fue de 0.63mM, equivalente a una normalidad de 1.89meq. Esta concentración de tributirina puede entonces generar 1890 ueq de ácido butírico proporcionales a 1890 ueq de NaOH. El consumo de 400 ueq de NaOH agotan el 22% de la tributirina inicial. El decremento del 22% en el sustrato disminuye la actividad lipolítica hasta un 87% de su actividad máxima según la cinética de Michaelis-Menten.

La siguiente figura (Fig. 7.8) muestra la caída en la velocidad inicial de la enzima por efecto del consumo de sustrato de acuerdo a los cálculos mencionados en el párrafo anterior.



Con los resultados anteriores podemos inferir que el efecto del pH, sobre la actividad lipolítica cuantificada sin control de pH, es mayor que el efecto por el decremento de la velocidad de reacción por agotamiento de sustrato.

### 7.2.3. Efecto de la temperatura

La temperatura sobre la reacción enzimática puede afectar:

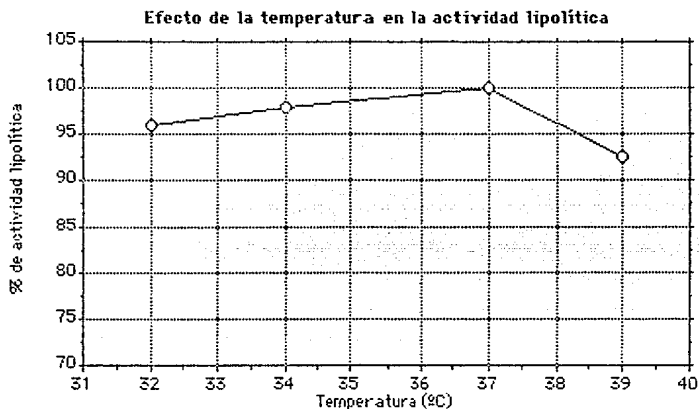
- La estabilidad de la enzima.
- La afinidad de la enzima por los activadores o inhibidores.
- La solubilidad de los reactivos.

El efecto de la temperatura sobre la actividad lipolítica de *Yarrowia lipolytica* 681 fue observada de manera general.

La temperatura máxima de actividad lipolítica, dependiendo del tipo de microorganismo, varía entre 30 y 40 °C (Sugihara et al., 1988; Welch, 1989; Pal, 1978; Novotny et al., 1988). Existen microorganismos como *Humicola lanuginosa*, la cual produce una lipasa con un máximo de actividad a 45 °C (Omar, I.C. et al., 1987).



Un máximo de actividad de la lipasa de *Yarrowia lipolytica* 681, en un rango de 30 a 40 °C, se encontró a 37 °C, la siguiente gráfica (Fig. 7.9) muestra el efecto de la temperatura en esta lipasa.



La temperatura en el ensayo de actividad se fijó en 37 °C.

#### 7.2.4. Efecto del CaCl<sub>2</sub> y de la acetona-isopropanol

Existen otras dos consideraciones a tomar en cuenta para medir la actividad de la lipasa; la primera, el ácido butírico liberado actúa como sitio competidor en la unión [Sustrato][Enzima] por lo que es necesario adicionar CaCl<sub>2</sub> quien a su vez actúa como "quelante" del ácido liberado, o "activador" del sistema enzimático (Ota y Yamada, 1966a, 1966b) y segunda, ya que la actividad enzimática depende del tiempo de reacción, es necesario parar dicha reacción para medir el ácido butírico liberado.

Se observó el efecto del CaCl<sub>2</sub> como "activador" y se analizaron dos opciones para parar la reacción enzimática, una, el descenso de temperatura, otra, utilizar una mezcla acetona-isopropanol en relación 1:1 en volumen.

Los resultados fueron los siguientes:

**Tabla 7.2 Efecto del CaCl<sub>2</sub> y la acetona-isopropanol**

	Vol. NaOH 0.05N (cc)	Actividad (u/cc)	X(media) (u/cc)
Experimentos sin CaCl <sub>2</sub>			
Sin acetona-isopropanol			
blanco	0	0	
muestra1	3.324	5.54	4.56 ± 0.97
muestra2	2.155	3.59	
Con acetona-isopropanol			
blanco	10.344	0	
muestra1	14.233	6.48	6.29 ± 0.19
muestra2	14.000	6.09	
Experimentos con CaCl <sub>2</sub>			
Sin acetona-isopropanol			
blanco	0.055	0	
muestra1	4.503	7.41	6.64 ± 0.77
muestra2	3.579	5.87	
Con acetona-isopropanol			
blanco	11.710	0	
muestra1	15.686	7.58	7.42 ± 0.16
muestra2	15.528	7.26	

Se observa mayor error en los datos al usar como medio de inactivación el descenso de temperatura, es posible que la enzima actúe a temperaturas menores a 10 °C y por tanto exista un consumo de sustrato, lo cual se refleja en los resultados. Al agregar la mezcla acetona-isopropanol no se observó una acidificación del medio, posterior a la mezcla de solventes, lo cual indicó que la reacción enzimática fue parada y no existió consumo de tributirina.

Se observa un incremento en la actividad al usar CaCl<sub>2</sub> como "quelante" del ácido butírico, o bien como "activador" del sistema enzimático.

La "activación" del sistema enzimático es una manera de hacer más disponible el sustrato para la enzima. La activación también depende del uso de surfactantes como Tweens ó, anteriormente se usaban, sales biliares. El uso del calcio como "activador", al menos para las triáclglicerol hidrolasas, es simplemente remover los ácidos grasos liberados como sales insolubles del calcio (Schwimmer, 1981). En algunos casos es necesario el calcio como cofactor, tal es el caso de la fosfolipasa pancreática "A2" (Verger y Hass, 1976). Gomi et. al. (1986a, 1986b) reporta que es necesario la presencia del

ácido 3,5-dihidroxi-7-tetradecenoico y de calcio para que la lipasa de *Saccharomycopsis lipolytica* mantenga su acción catalítica.

### 7.2.5. Efecto del buffer

Se analizaron dos tipos de amortiguadores de pH; fosfatos y tris-malatos a pH 7.4 a concentraciones de 0.2M.

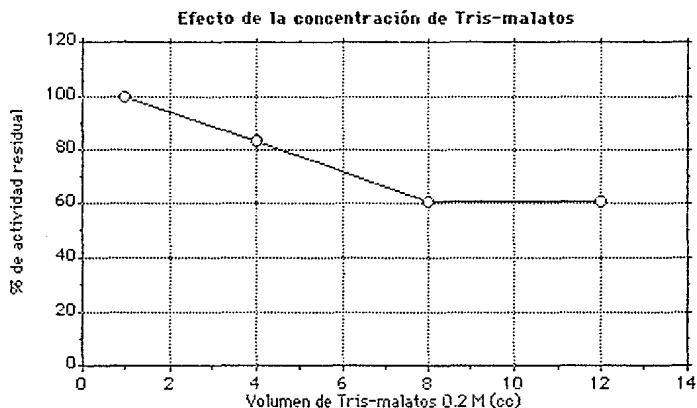
La actividad enzimática con cada buffer fué la siguiente:

Fosfatos	$5.10 \pm 0.06$ u/cc
Tris-malatos	$7.63 \pm 0.10$ u/cc

Se observó menor actividad en el sistema con fosfatos, posiblemente debido a una precipitación de sales la cual ocurrió al agregar el  $\text{CaCl}_2$  o bien a un efecto del fosfato sobre la enzima.

La actividad enzimática fué reducida en un 33.1% cuando se utilizó el buffer de fosfatos.

La concentración de tris-malatos afectan la actividad lipolítica posiblemente debido al incremento de la fuerza iónica del medio. A continuación se muestra este efecto (Fig. 7.10).

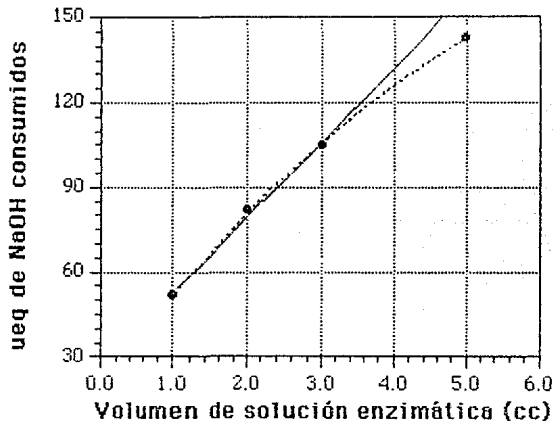


En el ensayo de actividad propuesto, se utilizó un volumen de 6 cc de buffer tris-malatos, en el medio de reacción.

### 7.2.6. Efecto de la concentración del extracto enzimático

La gráfica siguiente (Fig. 11) muestra que un aumento de la concentración enzimática, en el ensayo de actividad, resulta en un decremento del pH y de la velocidad de reacción. Este efecto resulta por la acidez generada en el medio mas que por limitación de sustrato como ya se ha señalado anteriormente.

**Efecto de la concentración enzimática en el ensayo de actividad**



En el ensayo de actividad se utilizó de 1 a 3 cc de extracto enzimático, dependiendo de la concentración de enzima en el extracto.

### 7.2.7. Relación de la actividad lipolítica cuantificada en el titulador automático y en matraz Erlenmeyer

La actividad lipolítica también fue cuantificada en matraces Erlenmeyer sin seguir la caída de pH.

Este ensayo mostró otro punto de vista con respecto a las diferencias existentes entre la agitación suave, la cual existió en los matraces, y la agitación empleada en el titulador DL-20.

Este método de cuantificación fue útil cuando se conocía que existía poca actividad enzimática en los extractos y por tanto era necesario realizar una incubación prolongada de la enzima en presencia del sustrato.

La principal diferencia en este ensayo fue la agitación del medio de reacción (200rpm), el tiempo de incubación (30 minutos) y el no conocer si el pH tuvo

efectos significativos sobre la actividad enzimática, debido a que no se conoció el pH final de la reacción. Las demás condiciones fueron similares con respecto al ensayo en el titulador automático.

La siguiente tabla muestra la relación entre los métodos de cuantificación de actividad lipolítica que fueron realizados.

**Tabla 7.3 Relación de la actividad cuantificada en matraz y en titulador DL-20**

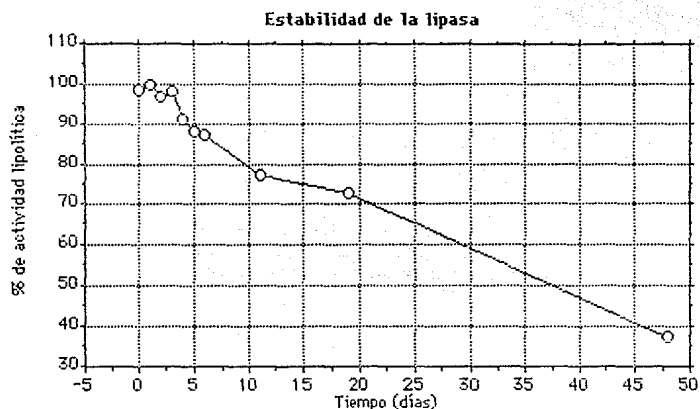
No	Actividad en matraz (u/cc)	Actividad en titulador Mettler DL-20 (u/cc)
1	0	0
2	6.60	21.00
3	10.70	34.25
Act. en titulador=3.199 Act. en matraz -0.032; r <sup>2</sup> =1		

La actividad obtenida mediante el uso de matraces agitados fué tres veces menor a la cuantificada mediante el uso del titulador automático. La diferencia fué debida a la diferente agitación de los medios y posiblemente a un efecto del pH sobre la enzima.

#### **7.2.8. Estabilidad de la enzima en líquido**

La enzima fue almacenada a -4 °C y a un pH de 5-6. La enzima fué significativamente estable (n.s.=0.05), en solución, durante los primeros tres días. La actividad disminuyó posteriormente.

La siguiente figura (Fig 7.12) muestra la estabilidad de la enzima en un periodo de 45 días a un pH de 5-6.



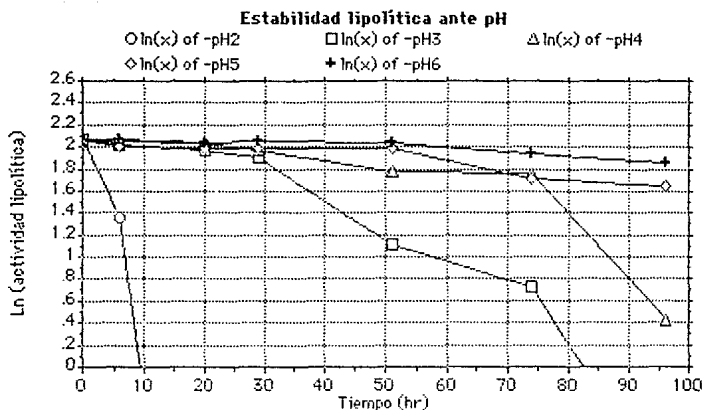
La estabilidad de la enzima no dependió de la posible acción de proteasas generadas durante el crecimiento del microorganismo, las cuales pudieron hidrolizar a las lipasas.

No se encontró actividad de proteasas en los extractos enzimáticos de *Yarrowia lipolytica* 681 cuando se realizaron ensayos sobre actividad proteolítica ácida y neutra.

#### 7.2.8.1. Estabilidad de la enzima ante el pH

Extractos enzimáticos fueron ajustados a pH de 2, 3, 4, 5 y 6, posteriormente se incubaron a 30 °C y 200 rpm. La actividad lipolítica fue medida a diferentes tiempos de incubación.

La figura (Fig. 7.13) siguiente muestra la estabilidad de lipasa ante diferentes pH.



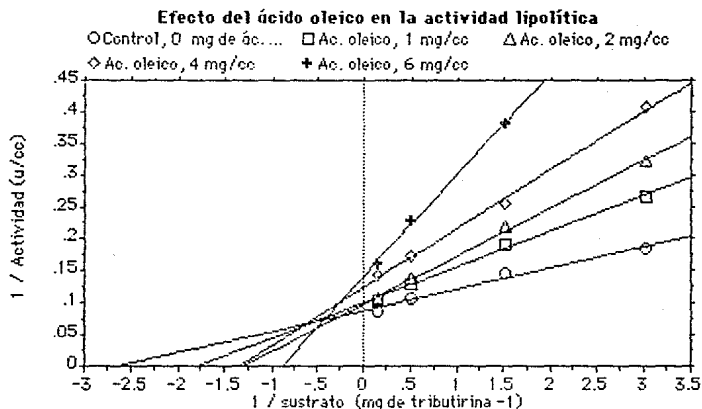
Los resultados mostraron que la lipasa fué afectada irreversiblemente a pH 2, siendo el rango de pH entre 5-6 el mas estable para la enzima, estos resultados concuerdan con los obtenidos por Ota y Yamada (1966a).

### 7.2.9. Inhibición por productos de la hidrólisis de triacilglicéridos

La estabilidad de la enzima también depende de la concentración del producto final de la hidrólisis como son los ácidos grasos.

Concentraciones de 0.5 a 6 mg/cc de ácido oleico, principal ácido graso del aceite de oliva, tuvieron un efecto inhibitorio sobre la lipasa. Otro producto de la hidrólisis es el glicerol. Concentraciones de 2 a 48 mg/cc de glicerol no afectaron la actividad enzimática.

La siguiente figura (Fig. 7.14) muestra el efecto del ácido oleico en la actividad lipolítica.



De esta manera observamos que la estabilidad de la lipasa de *Yarrowia lipolytica* 681 en el medio de cultivo puede ser afectada por la acumulación de ácido oleico como producto de la hidrólisis del aceite de oliva.

El efecto del ácido oleico sobre la actividad se ajustó a un modelo enzimático (Levenspiel, 1989), el cual es una modificación del modelo de Michaelis-Menten. Con este ajuste se determinó la concentración crítica de ácido oleico en la actividad lipolítica, así como el tipo de inhibición de este ácido graso.

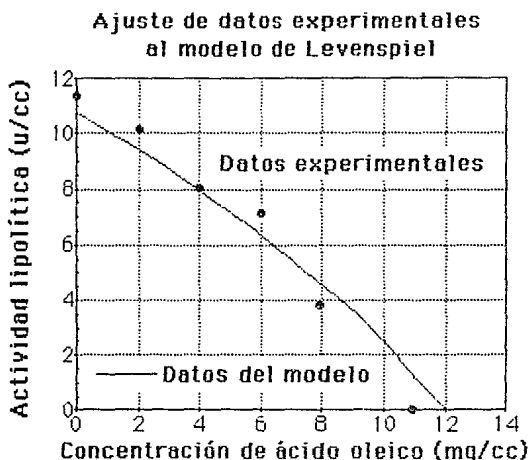
$$U = U_{max} * S * (1 - C_i / C_i^*)^n / K_s + S * (1 - C_i / C_i^*)^m$$

- U = actividad enzimática  
 U<sub>max</sub> = actividad enzimática máxima  
 C<sub>i</sub> = concentración de inhibidor  
 C<sub>i</sub><sup>\*</sup> = concentración crítica de inhibidor  
 K<sub>m</sub> = constante de saturación de la enzima  
 S = concentración de sustrato  
 n, m = parámetros de ajuste sobre el tipo de inhibición en la enzima



Al desarrollar el modelo y ajustar los datos, se determinó la concentración crítica de ácido oléico en 12 mg/cc. Los valores de los parámetros  $n$  y  $m$  fueron 0.672 y -1.609, respectivamente. Según el criterio del modelo de Levenspiel (1989), para  $n > 0$  y  $m < 0$  se trata de un tipo de inhibición general, donde varía  $U_{max}$  y  $K_s$  a diferentes concentraciones de inhibidor, los resultados teóricos concuerdan con lo observado en la siguiente figura.

A continuación (Fig 7.15) se muestra el efecto del ácido oléico sobre la actividad lipolítica con datos reales y datos obtenidos del modelo.



### 7.2.10. Afinidad de la lipasa ante diferentes sustratos

La afinidad de la lipasa de *Yarrowia lipolytica* 681 por sustratos naturales y sintéticos fue observada de la siguiente manera.

Los siguientes sustratos fueron utilizados:

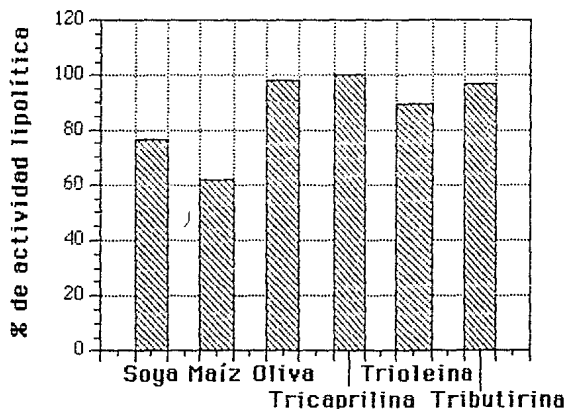
**Tabla 7.4 Composición de algunos triglicéridos naturales y sintéticos**

Sustratos naturales	Composición aproximada de ácidos grasos (% peso)			
	16:0	18:0	18:1	18:2
Aceite de soya	7-12	2-6	19-30	48-58
Aceite de maíz	8-19	0.5-4	19-50	34-62
Aceite de oliva	9.4	10.3	80.5	6.9

(Swern, 1979)

Sustratos sintéticos	Composición de ácidos grasos
Tributirina	Triglicérido del ácido butírico 4:0
Tricaprilina	Triglicérido del ácido caprílico 8:0
Trioleína	Triglicérido del ácido oleico 18:1

La siguiente figura (Fig. 7.16) muestra la afinidad de la lipasa por los sustratos mencionados anteriormente.

**Actividad de la lipasa de *Yarrowia lipolytica* 681 por diferentes sustratos**

Se observó una preferencia por ácidos grasos de cadena corta 4:0 y 8:0.

El aceite de oliva es el aceite vegetal con mayor proporción de ácido oleico con respecto a los aceites de soya y maíz. Como se observó una considerable actividad por la trioleína es de suponer que esta lipasa también tiene gran afinidad por sustratos de cadena larga como el ácido oleico (18:1). Es posible que *Yarrowia lipolytica* 551 tenga mayor afinidad por el aceite de oliva que por la trioleína, ya que el aceite de oliva también posee una proporción de ácidos grasos de menor tamaño como lo es el ácido palmítico (16:0).

### 7.2.11. Conclusiones

El sistema de cuantificación de actividad lipolítica utilizado fué reproducible, esto permitió utilizar el ensayo como medio de comparación en los experimentos que siguieron a continuación. El sistema de cuantificación de lipasas es sensible a cambios como el tipo y concentración de sustrato, tipo y concentración de buffer, pH y temperatura.

La actividad lipolítica fué relativamente estable, siendo el pH la variable que más influyó en la estabilidad. La reacción lipolítica depende de los productos de hidrólisis de la enzima. Lo anterior demuestra que pueden existir procesos de regulación de hidrólisis y síntesis de la enzima durante el crecimiento de la levadura.

### **7.3. Producción de lipasas por el crecimiento de *Yarrowia lipolytica* 681 en cultivo sumergido.**

*Yarrowia lipolytica* 681 fué crecida en cultivo sumergido en las condiciones de cultivo mencionadas en la sección **Material y Métodos**.

La actividad lipolítica fué cuantificada tomando en cuenta los resultados de la sección anterior (sección 7.2).

La estrategia seguida en esta parte del trabajo fue determinar algunas condiciones de cultivo para aumentar la producción de lipasas mediante el crecimiento de *Yarrowia lipolytica* 681 en cultivo sumergido.

Las metas fijadas en esta sección fueron:

- Determinar la concentración de inóculo para los medios de cultivo.
- Observar el efecto del tween 80 en la producción extracelular de lipasas.
- Determinar una(s) fuente de carbono, nitrógeno e inductores que permitieran mejorar la producción de enzima.
- Observar el efecto de la concentración de inductor.
- Observar el efecto de la relación Carbono/Nitrógeno (C/N) del medio de cultivo en la producción enzimática.
- Fijar las condiciones de pH inicial y temperatura mas favorables en la producción de enzima.
- Observar el efecto de la relación volumen de medio de cultivo/volumen de reactor, como medida indirecta de la aireación del medio de cultivo en la producción de lipasas.

Los medios de cultivo inóculados fueron incubados por un periodo de 48 horas, excepto cuando se observó el efecto de la relación C/N en la producción de enzima; el tiempo de incubación en ese experimento fue de 24 horas y en el segundo experimento donde se observó el efecto del tween 80, el tiempo de incubación ahí fue de 60 horas.

La temperatura de cultivo fue de 30 °C, pH inicial de 4.5 y agitación de 200 rpm.

#### **7.3.1. Efecto del inóculo**

El determinar una concentración de inóculo para los medios de cultivo resulta importante desde el punto de vista de preveer el tiempo en el cual se obtendrá la respuesta buscada del microorganismo, en este caso la presencia de lipasas.

Experimentos sobre la cantidad inicial de biomasa mostraron los siguientes resultados:

**Tabla 7.5 Efecto del inóculo en la producción de lipasas**

Inóculo (% v/v)	pH	Biomasa (g/l)	Glucosa (g/l)	Actividad (u/cc)
0.5	3.40	10.26	7.11	9.6
1.0	3.47	11.30	5.56	8.7
2.0	3.65	10.08	7.11	15.6
4.0	3.52	10.43	6.66	10.3
6.0	3.32	11.12	6.00	2.4
6.0	3.52	10.78	5.78	3.5
8.0	2.82	9.57	4.45	0

Se observa que cantidades entre 2.0 y 4.0% de precultivo inicial rinden mejor producción de lipasas a 48 horas y que a cantidades mayores se asocia un crecimiento más rápido con poca producción de enzima.

El pre-cultivo o inóculo fue crecido por 24 horas en las mismas condiciones físicas señaladas anteriormente.

Es posible que el pH haya afectado la producción de enzima en el experimento con mayor concentración de inóculo, debido al rápido crecimiento de *Yarrowia lipolytica* 681 y por tanto la subsecuente acidificación del medio.

### 7.3.2. Efecto del tween 80

El tween 80 (polioxi-etilén sorbitán monooleato) además de emulsificador puede actuar como inductor de lipasas o como detergente en la membrana para liberar enzimas de ella.

Se ha observado que algunos surfactantes, entre ellos tween 80, aumentan la producción de lipasas extracelulares. Lo anterior ha sido comprobado en microorganismos como *Acinetobacter calcoaceticus* 69V (Fischer y Kleber, 1987), *Humicola lanuginosa* (Omar, I.C. et. al., 1987), *Rhizopus oligosporus* (Nahas, 1986), *Geotrichum candidum* (Jacobsen et. al., 1989), *Acremonium strictum* (Okeke y Okolo, 1990). Aunque se conocen casos contrarios en donde el efecto del tween 80 disminuye la producción de enzimas como en *Beauveria bassiana* (Hegedus y Khachatourians, 1988).

El tween 80 fue probado como complemento en el medio de cultivo con el fin de liberar la posible enzima asociada a la membrana.

El efecto del tween 80 como inductor se determinó en medios de cultivo con

1% de tween 80, sin la presencia de aceite de oliva.

El efecto detergente del tween 80 se observó en experimentos con y sin la presencia de tween 80 manteniendo constante la concentración de inductor (aceite de oliva).

También se observó el efecto del tween 80 a varias concentraciones.

Los resultados fueron los siguientes:

**Tabla 7.6a Efecto del tween 80 en la actividad lipolítica**

Experimento	Condición del experimento	Actividad (u/cc)
1	Medio sin tween 80 s/ inductor	0
2	Medio sin tween 80 c/ inductor	3.53
3	Medio con tween 80 1.0% s/ inductor	0
4	Medio con tween 80 0.2% c/ inductor	6.16
5	Medio con tween 80 0.4% c/ inductor	7.76
6	Medio con tween 80 0.6% c/ inductor	7.50
7	Medio con tween 80 0.8% c/ inductor	6.60
8	Medio con tween 80 1.0% c/ inductor	6.30

El medio de cultivo con levaduras fué homogeneizado después de la esterilización con el fin de emulsificar al inductor.

Los resultados de actividad mostraron que la presencia de tween 80, en los medios de cultivo, aumentan la concentración de lipasas. Las lipasas pueden estar asociadas a la membrana y ser extraídas por una acción detergente, o bien, el incremento en la producción de enzima puede ocurrir por una inducción debida a la emulsificación del inductor.

En estos experimentos no se cuantificó biomasa. El tween 80 pudo tener un efecto estimulante en el crecimiento, o bien actuar como fuente de carbono disponible para incorporarse a la levadura y por tanto aumentar el rendimiento de enzimas.

No se observó efecto del tween 80 como inductor, ya que no hubo actividad en el experimento 3.

Posteriormente, se realizó el mismo experimento con una concentración de tween menor al 0.2%, con el propósito de encontrar una concentración de tween mínima que permitiera el incremento de actividad extracelular y eliminar el efecto del tween como fuente de carbono importante durante el crecimiento de *Yarrowia lipolytica* 681. Este experimento fué incubado por 60 horas, 12 horas mas con respecto al tiempo de incubación del experimento

anterior.

Los resultados fueron los siguientes:

**Tabla 7.6b Efecto del tween 80 en la actividad lipolítica**

Experimento	Condición del experimento	Actividad (u/cc)
1	Medio sin tween 80 s/ inductor	0
2	Medio sin tween 80 c/ inductor	3.54
3	Medio sin tween 80 c/ inductor	2.75
4	Medio con tween 80 1.0% s/ inductor	0
5	Medio con tween 80 0.05% c/ inductor	14.66
6	Medio con tween 80 0.10% c/ inductor	15.25
7	Medio con tween 80 0.15% c/ inductor	14.44
8	Medio con tween 80 0.20% c/ inductor	17.10
9	Medio con tween 80 0.20% c/ inductor	15.10
10	Medio con tween 80 0.20% c/ inductor	16.16

Los experimentos 4 a 8 se homogeneizaron después de la esterilización.

El experimento 9 se homogeneizó antes de la esterilización.

El experimento 10 no se homogeneizó.

Observamos que a concentraciones de tween del 0.05%, existió un incremento de 3 a 4 veces la actividad extracelular, con respecto al control sin tween, debiéndose este efecto a una acción detergente sobre la membrana o a una emulsificación del inductor (aceite de oliva). Ota et. al. (1982) reportan actividad intracelular en *Yarrowia lipolytica*, siendo esta actividad mayor a la extracelular.

Con estos experimentos se descarta el posible efecto inductor del tween, ya que los controles con tween 80 y sin inductor no tuvieron actividad.

El efecto detergente del tween 80 en la membrana también se observó sobre levaduras crecidas en presencia de aceite de oliva que, posteriormente, se extrajeron y se trataron con una solución de tween 80.

Los medios de cultivo no homogeneizados presentaron similar actividad lipolítica por lo cual la acción del tween 80 se realiza sin necesidad de homogeneización.

Se extrajeron células de un medio de cultivo con aceite de oliva sin tween 80, las cuales presentaron poca actividad (células de los experimentos 2 y 3 anteriores). Las células fueron lavadas con tween 80 al 0.05% en un medio con buffer pH 6 conservando el mismo volumen, temperatura y agitación del medio

cultivo.

El experimento se llevó a cabo con parte de las células del experimento 2 y 3, las cuales en un principio fueron tratadas sin tween 80.

Los resultados fueron los siguientes:

**Tabla 7.7 Efecto del tween 80 en la extracción de la enzima**

Experimento	Actividad extracelular (u/cc)	Actividad asociada a la membrana (u/cc)	Actividad total (u/cc)
2	3.54	6.74	10.28
3	2.75	6.6	9.35
3 (sin tween)	2.75	0.52	3.27

En estos resultados se observa el efecto detergente del tween 80, liberando la lipasa intracelular o asociada a la membrana. También se observa que el efecto mecánico (agitación de las células) permite la liberación de la enzima asociada a la membrana, o bien podría deberse a la lisis celular.

Se consideró al tween como un posible sustrato de la lipasa. Las pruebas de actividad sustituyendo a la tributirina con tween 80 fueron negativas.

### 7.3.3. Efecto de la fuente de carbono, nitrógeno e inductores

Las fuentes de carbono, nitrógeno e inductores utilizados fueron sustratos seleccionados para incrementar la actividad enzimática dado su efecto en el incremento de actividad en otros microorganismos (Hegedus y Khachatourians, 1988; Nahas, 1988; Novotny et. al., 1988; Omar, I.C. et. al., 1987; Okeke y Okolo, 1990).

Se tomaron dos puntos de la cinética del crecimiento de *Yarrowia lipolytica* 681 para cuantificar el crecimiento y actividad.

Se partió del medio control descrito anteriormente. El tween 80 al 0.05% fué incluido como componente del medio de cultivo.

Se mantuvo la relación C/N de 8.6

Los inductores fueron añadidos en la misma proporción que el aceite de oliva (1%).

La concentración de inóculo en volumen, sales y vitaminas, así como el pH, temperatura, agitación y tiempo de fermentación fueron constantes en cada lote de experimentos.



**Tabla 7.8 Efecto de la fuente de carbono**

Fuente de carbono	36 horas			52 horas		
	Biomasa (g/l)	Actividad (u/cc)	Actividad específica (u/mg)	Biomasa (g/l)	Actividad (u/cc)	Actividad específica (u/mg)
Glucosa	7.14	27.35	3.83	8.73	29.50	3.37
Glucosa	7.21	28.50	3.95	8.61	30.94	3.59
Glicerol	3.87	0	0	6.90	0	0
Sacarosa	5.84	14.47	2.47	8.57	13.88	1.62
Aceite de maíz	7.21	25.02	3.47	9.18	31.89	3.47
Aceite de oliva	7.51	25.27	2.03	9.93	30.90	2.10
Aceite de soya	6.00	6.94	1.15	9.48	21.75	2.29
Manosa	6.30	17.85	2.83	8.12	19.87	2.44
Citrato	5.69	7.97	1.40	7.66	2.06	0.26

Las mejores fuentes de carbono fueron la glucosa, el aceite de oliva y el aceite de maíz.

**Tabla 7.9 Efecto de la fuente de nitrógeno**

Fuente de nitrógeno	42 horas			66 horas		
	Biomasa (g/l)	Actividad (u/cc)	Actividad específica (u/mg)	Biomasa (g/l)	Actividad (u/cc)	Actividad específica (u/mg)
Urea	6.26	13.91	2.22	11.26	13.22	1.17
Urea	5.82	13.45	2.31	11.47	13.19	1.14
Extracto de levadura	7.78	5.93	0.76	12.34	5.07	0.41
Extracto de levadura	7.34	4.97	0.67	12.13	4.00	0.32
Sulfato de amonio	4.08	0	0	6.26	0	0

continuación...

Peptona	6.47	2.19	0.33	10.17	2.33	0.23
Peptona + Urea	6.26	5.93	0.94	13.86	5.63	0.40
Licor de maíz	5.17	3.04	0.58	9.95	2.31	0.23

La urea fue la mejor fuente de nitrógeno en la producción de lipasas.

**Tabla 7.10 Efecto de los inductores**

Inductores	36 horas			52 horas		
	Biomasa (g/l)	Actividad (u/cc)	Actividad específica (u/mg)	Biomasa (g/l)	Actividad (u/cc)	Actividad específica (u/mg)
Aceite de oliva	6.60	14.59	2.21	8.27	24.48	2.96
Aceite de oliva	6.90	14.73	2.11	7.96	25.04	3.14
Aceite de soya	6.60	11.86	1.79	7.96	12.69	1.59
Aceite de maíz	6.90	17.90	2.59	7.96	20.58	2.58
Aceite de maíz	6.90	18.14	2.62	7.96	20.84	2.6
Sebo	6.00	4.72	0.78	7.21	7.27	1.00
Aceite de coco	2.06	0	0	3.57	0	0
Acido oleico	5.69	2.51	0.44	6.90	6.52	0.94
Aceite de ricino	2.66	1.56	0.58	3.72	0.53	0.14

El aceite de maíz y el aceite de oliva fueron los mejores inductores en la producción de lipasas.

continuación...

Peptona	6.47	2.19	0.33	10.17	2.33	0.23
Peptona + Urea	6.26	5.93	0.94	13.86	5.63	0.40
Licor de maíz	5.17	3.04	0.58	9.95	2.31	0.23

La urea fue la mejor fuente de nitrógeno en la producción de lipasas.

**Tabla 7.10 Efecto de los inductores**

Inductores	36 horas	52 horas
------------	----------	----------

	Biomasa (g/l)	Actividad (u/cc)	Actividad específica (u/mg)	Biomasa (g/l)	Actividad (u/cc)	Actividad específica (u/mg)
Aceite de oliva	6.60	14.59	2.21	8.27	24.48	2.96
Aceite de oliva	6.90	14.73	2.11	7.96	25.04	3.14
Aceite de soya	6.60	11.86	1.79	7.96	12.69	1.59
Aceite de maíz	6.90	17.90	2.59	7.96	20.58	2.58
Aceite de maíz	6.90	18.14	2.62	7.96	20.84	2.6
Sebo	6.00	4.72	0.78	7.21	7.27	1.00
Aceite de coco	2.06	0	0	3.57	0	0
Acido oleico	5.69	2.51	0.44	6.90	6.52	0.94
Aceite de ricino	2.66	1.56	0.58	3.72	0.53	0.14

El aceite de maíz y el aceite de oliva fueron los mejores inductores en la producción de lipasas.

### 7.3.4. Efecto de la concentración del inductor

*Yarrowia lipolytica* 681 fué crecida por 48 horas en diferentes concentraciones de aceite de oliva.

*Yarrowia lipolytica* 681 fué inducible por el aceite de oliva a niveles mayores de 1% tal como se observa en los resultados siguientes:

**Tabla 7.11 Efecto de la concentración de inductor**

Aceite de oliva (%)	Biomasa (g/l)	Glucosa residual (g/l)	Actividad (u/cc)
0	4.98	3.46	0
0.2	7.44	0	0
0.6	9.33	6.53	0
1.0	11.8	7.57	9.1
1.4	11.94	7.31	13.1
1.8	12.09	6.79	7.8

Los resultados muestran un máximo de producción de enzima con 1.4% de aceite de oliva. Una mayor concentración de inductor resultó en un decremento de actividad lipolítica. Kosaric et. al. (1979) determinó un máximo de la producción de lipasas en concentraciones de 1 a 2% de aceite de oliva como inductor cuando *Candida lipolytica* fué crecida en un medio de cultivo con keroseno como fuente de carbono.

*Candida lipolytica*, así como *Yarrowia lipolytica* 681 mostraron un incremento en la biomasa, pero no en actividad enzimática, a incrementos en la concentración de inductor

### 7.3.5. Efecto de la concentración de urea

La relación C/N fué observada variando la concentración de urea. *Yarrowia lipolytica* 681 fue crecida en el medio base con las siguientes concentraciones de urea:

**Tabla 7.12 Efecto de la concentración de urea**

Urea (%)	Biomasa (g/l)	Glucosa residual (g/l)	Aceite de oliva consumido (g/l)	Actividad (u/cc)
0.05	2.26	18.0	3.27	0.52
0.10	2.58	18.8	3.49	2.15
0.20	2.81	18.4	3.59	3.60
0.40	2.75	18.2	3.83	1.10
0.80	3.28	18.4	4.50	2.22

La mejor relación carbono-nitrógeno, en el medio de cultivo, para la producción de lipasas fue la de 0.2% de urea.

Como ya ha sido indicado, la concentración inicial, en el medio de cultivo, de aceite de oliva fue de 10 g/l y de glucosa 20 g/l.

Durante 24 horas de crecimiento *Yarrowia lipolytica* 681 consumió entre el 3 y 4.5% del aceite de oliva inicial y aproximadamente el 2% de la glucosa inicial. Lo anterior demuestra que esta levadura puede consumir al inductor como al carbohidrato en paralelo.

Kosaric et. al. (1979) demuestra que existe un máximo de producción de lipasas cuando *Candida lipolytica* es crecida en concentraciones de 0.2 a 0.3% de urea.

### 7.3.6. Efecto de la temperatura y el pH inicial en la producción de lipasas.

Se realizó un diseño experimental con el objeto de estudiar dos factores físicos que afectan la producción de lipasas en el microorganismo (Eitenmiller, 1970). Las variables, temperatura y pH inicial, se estudiaron a tres niveles a 48 y 60 horas de tiempo de incubación de la levadura.

Los niveles de las variables fueron los siguientes:

Variable/nivel	Bajo (-1)	Medio (0)	Alto (+1)
pH inicial	3.0	4.5	6.0
Temperatura (°C)	26	30	34

Las variables de respuesta fueron actividad lipolítica y biomasa.

Los resultados fueron los siguientes:

**Tabla 7.13 Diseño experimental del efecto del pH inicial y la temperatura**

		48 horas			60 horas		
pH	T (°C)	Biomasa (g/l)	Actividad (u/cc)	Actividad específica (u/mg)	Biomasa (g/l)	Actividad (u/cc)	Actividad específica (u/mg)
-1	-1	9.53	10.75	1.12	14.35	7.69	0.53
-1	+1	4.35	8.70	2.00	6.19	11.55	1.86
+1	-1	11.50	18.42	1.60	14.26	21.11	1.48
+1	+1	5.42	7.61	1.40	7.92	6.68	0.84
-1	0	10.78	17.31	1.60	12.21	29.03	2.37
+1	0	8.82	17.51	1.98	11.49	22.56	1.96
0	-1	11.32	21.89	1.93	14.71	16.16	1.09
0	+1	5.07	17.05	3.36	7.57	14.53	1.91
0	0	10.42	19.55	1.87	12.92	24.31	1.90
0	0	10.28	19.25	1.87	12.75	25.28	1.95

Los experimentos fueron realizados por duplicado y el error entre muestras fue semejante al obtenido en el duplicado del control (0,0).

Los resultados del análisis de varianza se muestran a continuación:

**Tabla 7.14 Análisis de varianza de los resultados del diseño experimental**

Tiempo: 48 horas.

	Biomasa		Actividad		Actividad específica	
Efecto	% S.C.	n.s	% S.C.	n.s	% S.C.	n.s
pH	2.97	.107	38.52	.023	32.73	0
Temperatura	90.59	.012	39.40	.023	25.26	0
pH-Temperatura	6.42	.070	22.06	.047	42.01	0
Residual	.02		.02		0	

continuación...

Tiempo: 60 horas.

	Biomasa		Actividad		Actividad específica	
Efecto	% S.C.	n.s.	% S.C.	n.s.	% S.C.	n.s.
pH	1.43	.106	1.28	.249	1.62	.148
Temperatura	95.43	.013	68.03	.035	54.29	.026
pH-Temperatura	2.06	.132	25.84	.086	41.14	.046
Residual	.02		.09		.04	

% S.C. = porciento de la suma de cuadrados.

n.s. = nivel de significancia.

El crecimiento de *Yarrowia lipolytica* 681 y la actividad lipolítica son afectados por la temperatura. La actividad lipolítica es afectada en las primeras 48 horas de igual manera por el pH y por la temperatura esto podría deberse a que existe un pH óptimo de producción y/o estabilidad de la enzima.

La hipótesis propuesta es que la levadura en las primeras horas trata de ajustar su medio a un pH óptimo de producción y/o estabilidad de la lipasa. Alcanzado ese pH óptimo el efecto ya no es significativo en la actividad.

Durante el crecimiento de la levadura no hay control externo del pH. El pH es ajustado inicialmente.

Posteriormente se determinó, mediante un análisis de superficies de respuesta, la posible temperatura y pH que permitiera alcanzar los mejores valores de biomasa y actividad. Los datos se ajustaron a un polinomio de la forma siguiente:

$$\text{Max} = A_0 + A_1 * \text{pH} + A_2 * \text{Temp} + A_3 * \text{pH}^2 + A_4 * \text{Temp}^2 + A_5 * \text{pH} * \text{Temp}$$

Con este polinomio se buscó un punto máximo, en el intervalo de datos generado, en donde intervinieron los efectos simples, cuadráticos y de interacción de las variables temperatura y pH inicial.

Los resultados de pH inicial y temperatura para obtener rendimientos máximos en la biomasa, actividad lipolítica y actividad específica se muestran en la siguiente tabla:

**Tabla 7.15 Resultados del análisis de superficies de respuestas del diseño experimental**

	48 horas			60 horas		
	Biomasa	Actividad	Actividad específica	Biomasa	Actividad	Actividad específica
pH	5.0	4.8	4.2	4.2	5.0	3.0
T (°C)	27.2	28.0	34.0	26.0	29.4	32.0

Los datos obtenidos muestran que podría observarse una mayor actividad si se mantuviera un pH inicial y una temperatura de crecimiento entre 4.8-5.0 y 28-29.4 °C, respectivamente.

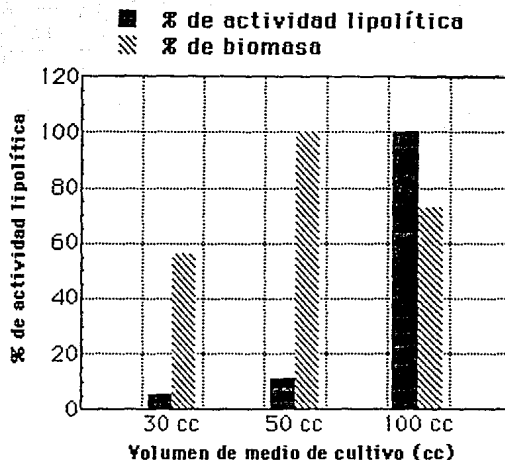
### 7.3.7. Efecto de la aireación

La producción de lipasas depende de la concentración de oxígeno en el medio tal como lo reporta Giuseppin (1984) para el caso de *Rhizopus delemar*. Para este microorganismo incrementos en la concentración de oxígeno aumentaron la producción de lipasas.

*Yarrowia lipolytica* 681 fué crecida en matraces de 250 cc con diferentes volúmenes de medio de cultivo. La agitación fue constante a 200rpm.

La siguiente figura (Fig 7.17) muestra la relación de la biomasa y la producción de lipasas con respecto al volumen de medio de cultivo por volumen de reactor.





Para el caso de *Yarrowia lipolytica* 681, la producción de lipasas se incremento a volúmenes mayores de medio de cultivo en los cuales, posiblemente, existieron menores concentraciones de oxígeno.

La morfología de la levadura en los medios fue diferente; los medios con volumen de 30 cc contuvieron células unicelulares, los medios con 50 cc presentaron células unicelulares y pseudomicelio, los medios con 100 cc presentaron células con pseudomicelio y pocas células unicelulares. Existe la posibilidad que la producción de lipasas este asociada a la concentración de oxígeno en el medio y a la morfología de *Yarrowia lipolytica* 681.

### 7.3.8. Cinética del crecimiento de *Yarrowia lipolytica* en cultivo sumergido en condiciones de pH controladas

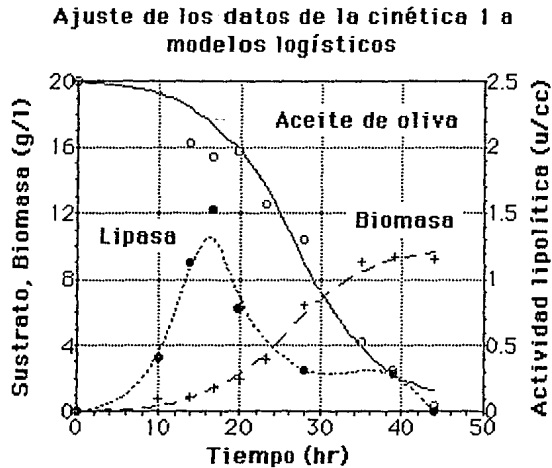
*Yarrowia lipolytica* 681 fué crecida en condiciones de pH controladas y en aceite de oliva como única fuente de carbono. Se utilizó aceite de oliva debido a que experimentos anteriores con el sustrato del medio de cultivo inicial (glucosa al 2% y aceite de oliva al 1%) resultaron en producir demasiada biomasa, difícil de muestrear bajo las condiciones de cultivo ya mencionadas en **Material y Métodos**.

El uso de una sola fuente de carbono simplificó el análisis de los datos de consumo de sustrato y de los rendimientos de biomasa en base al sustrato.

Se realizaron dos cinéticas de crecimiento, las cuales sirvieron para

modelar la generación de biomasa, el consumo de sustrato y la producción de lipasa por parte de este microorganismo.

A continuación (Fig. 7.18) se muestran los datos obtenidos de la "cinética 1" del crecimiento de *Yarrowia lipolytica* 681 en condiciones de pH controladas.



*Yarrowia lipolytica* 681 creció durante un periodo de 50 horas, en donde el crecimiento máximo, así como el consumo total del sustrato fueron alcanzados al final de este periodo. La producción de enzima se inició en las primeras horas del crecimiento y un máximo de actividad se alcanzó durante el inicio de la fase exponencial del crecimiento de la levadura.

Kosaric et. al. (1979) observaron una cinética similar a la mostrada en esta figura cuando crecieron a *Candida lipolytica* en un medio suplementado con 2% de aceite de oliva, 4% de keroseno y 0.3% de urea.

### 7.3.8.1. Modelo de crecimiento

Los datos experimentales de biomasa fueron ajustados al modelo siguiente:

$$dx/dt = ux(1-x/x_m) \dots \dots \dots (\text{ecuación logística})$$

La ecuación anterior es también conocida como la ecuación de Verhulst-Pearl, quienes fueron los primeros en aplicarla al modelamiento del crecimiento de poblaciones (Mulchandani et. al., 1988).

La integración del modelo anterior es la siguiente:

$$x(t) = x_0 e^{ut} / (1 - x_0 w (1 - e^{ut}))$$

donde

$x$  [=] mg/cc, es la biomasa al tiempo "t".

$t$  [=] hr, es el tiempo de cultivo.

$u$  [=] 1/hr, es la velocidad específica de crecimiento.

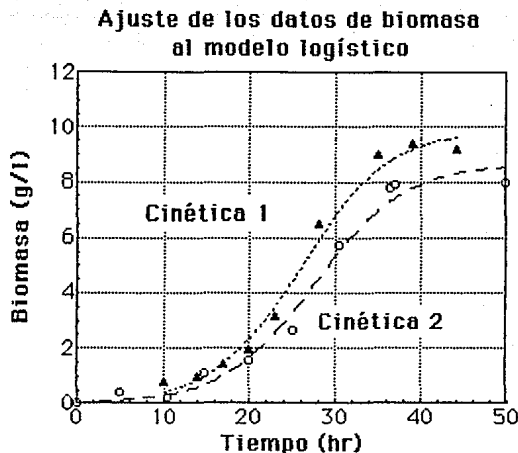
$x_m$  [=] mg/cc, es la biomasa máxima en el sistema.

$x_0$  [=] mg/cc, es la biomasa inicial a "t=0".

$w$  [=] cc/mg, es el inverso de  $x_m$ .

Los datos experimentales de biomasa fueron ajustados, no linealmente, por mínimos cuadrados al modelo logístico integrado.

A continuación (Fig. 7.19) se muestran los datos experimentales de la biomasa y los datos obtenidos utilizando el modelo logístico. Dos cinéticas del crecimiento de *Yarrowia lipolytica* 681 sobre aceite de oliva fueron tratadas con dicho modelo.



Los parámetros obtenidos del ajuste fueron los siguientes:

Parámetro	Cinética 1	Cinética 2
u	0.197	0.192
x <sub>0</sub>	0.057	0.043
x <sub>m</sub>	9.91	8.67

Valero et. al. (1991) encuentran una velocidad máxima de crecimiento de 0.15 hr<sup>-1</sup> cuando *Candida rugosa* fué crecida sobre 1% de aceite de oliva y 0.2% de urea, como fuente de carbono y nitrógeno, respectivamente.

### 7.3.8.2. Modelo de consumo de sustrato

Los datos experimentales del consumo de sustrato fueron tratados con la siguiente ecuación:

$$-ds/dt = (1/Y_{xs}) dx/dt + mx$$

donde

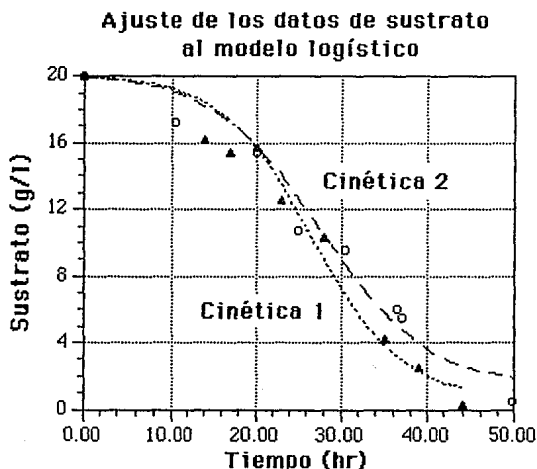
s [=] mg/cc, es la cantidad de sustrato al tiempo "t".

Y<sub>xs</sub> [=] mgx/mgs, es el rendimiento celular en miligramos (mg) de

biomasa por mg de aceite de oliva consumido.

$m$  [=] mgs/mgx hr, es la cantidad de aceite de oliva por unidad de biomasa y tiempo, necesaria para el mantenimiento celular.

La siguiente figura (Fig. 7.20) muestra los datos de consumo de aceite de oliva ajustados al modelo anterior.



Los parámetros obtenidos del ajuste fueron los siguientes:

Parámetro	Cinética 1	Cinética 2
$Y_{xs}$	0.621	0.623
$m$	0.206	0.211

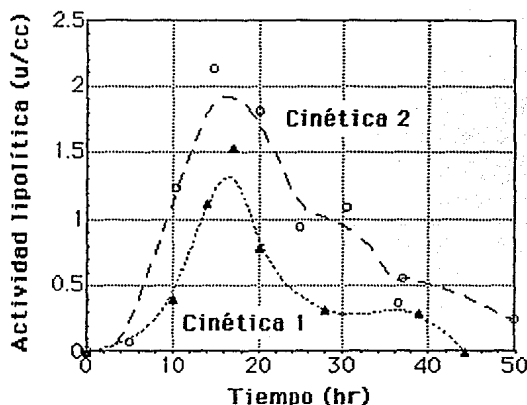
### 7.3.8.3. Modelo de producción de enzima

Los datos de actividad enzimática fueron ajustados al modelo de Luedeking-Piret (1959).

El modelo de Luedeking-Piret pudo explicar el comportamiento de la lipasa en las primeras horas de crecimiento, pero la fase decreciente de la producción de enzima no pudo ser modelada.

A continuación (Fig. 7.21) se muestra el comportamiento de la lipasa durante el crecimiento de *Yarrowia lipolytica* 681.

### Datos experimentales de actividad enzimática



La formación de producto, bajo las condiciones de cultivo ya señaladas, muestra un comportamiento poco común con respecto a otras cinéticas de producción de metabolitos primarios. Posiblemente, la actividad lipolítica es inhibida por productos de la hidrólisis de triacilglicéridos, como ya se ha observado.

Otra posible causa puede ser la represión de la producción de "cofactores" de la actividad lipolítica como es el caso del ácido 3,5-dihidroxi-7 tetradecenoico, necesario para la activación de la "lipasa I" de *Saccharomycopsis lipolytica* (Ota et. al., 1980; Gomi et. al., 1986).

La producción de enzima, después de alcanzar un máximo de actividad en el medio de cultivo, decrece, lo cual indica su desnaturalización ó inhibición irreversible.

Bailey (1977) propone un modelo, de producción de enzima, con una constante de destrucción de la enzima por la formación de esta, debido a las condiciones físicas y químicas en las que se encuentra la enzima durante el crecimiento del microorganismo. La constante de destrucción puede ser dependiente de la estabilidad, inhibición, regulación y degradación de la enzima.

El modelo propuesto, según Bailey, fue el siguiente:

$$dp/dt = a dx/dt - bp$$

donde

$p$  [=] u/cc, es la actividad lipolítica al tiempo "t".

$a$  [=] u/cc mgx, es el rendimiento de producto (u/cc) por gramo de biomasa.

$b$  [=] u/cc mgx hr, es la constante de destrucción.

El modelo contempla un término negativo por la formación de producto, donde la constante de este término explica la destrucción de la enzima.

El ajuste de los datos de producto al modelo de Bailey explicó solamente la formación de enzima hasta que esta alcanzó su máximo en el medio de cultivo. Al igual que el modelo de Luedeking-Piret, el modelo de Bailey no pudo ajustar la parte correspondiente a la destrucción de la enzima.

Con base a los experimentos sobre inhibición de la enzima por productos de la hidrólisis de triacilglicéridos, se consideró como posible factor de destrucción o inhibición de la enzima al ácido oleico u a otro producto del crecimiento de la levadura, presente en el medio de cultivo.

La constante de destrucción fue entonces considerada como una variable del crecimiento, la cual fue proporcional a la cantidad de inhibidor acumulado en el medio de cultivo.

El inhibidor, es un producto intermedio, entre el consumo de sustrato y la generación de biomasa, podemos considerar como un ejemplo a la producción de ácidos grasos.

Los ácidos grasos liberados por la actividad lipolítica son consumidos por el microorganismo, pero como el ácido graso es un inhibidor de la lipasa, debe entonces también existir una acumulación de este inhibidor en el medio de cultivo, el cual deberá afectar la actividad de la enzima.

Considerando una acumulación de inhibidor en el medio de cultivo se propuso la siguiente relación:

$$dk/dt = c ds/dt - d x$$

donde:

$k$  [=], g/l, es la concentración de inhibidor en el medio de cultivo.

$c$  [=], gs/gk, es la relación de conversión de aceite de oliva a ácidos grasos, considerando a estos como el inhibidor.

$-ds/dt$  [=], gs/hr, es la tasa de consumo de sustrato, en este término esta involucrada la lipasa ya que relaciona el consumo de sustrato y la generación de biomasa.

$d$  [=], gk/gx\*t, es la velocidad de consumo de los ácidos grasos por la biomasa.

$x$  [=], gx, es la biomasa.

La acumulación de ácidos grasos depende de la velocidad de hidrólisis del sustrato y del consumo de estos por generación y mantenimiento de la biomasa.

La producción de lipasas fué modelada tomando en cuenta un término de destrucción por formación de producto. Por otro lado, la producción de ácidos grasos fué modelada tomando en cuenta un término de destrucción por el crecimiento de la levadura. La producción de lipasas pudo haber sido modelada tomando en cuenta un término de destrucción por generación de biomasa al igual que en el modelamiento del inhibidor. Se consideró que la levadura no consume a la lipasa ya que la enzima le es útil para hidrolizar al triglicérido y generar ácidos grasos y glicerol para su crecimiento.

Los datos experimentales del consumo sustrato corresponden a la materia hidrofóbica del medio de cultivo, la cual es extraída con cloroformo, por tanto, los datos de sustrato son, entre otros, los correspondientes al aceite de oliva y ácidos grasos.

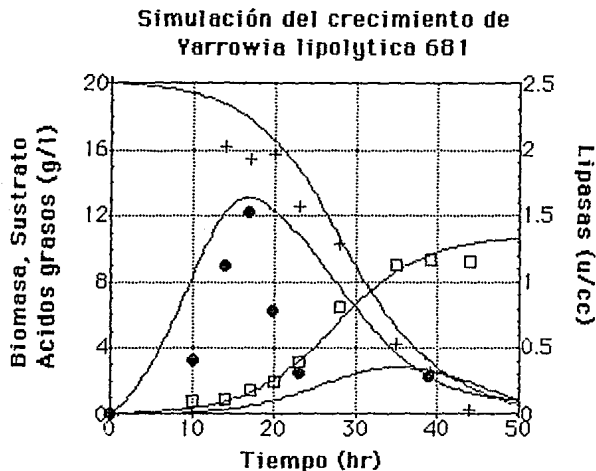
Existe la hipótesis de que la enzima podría hidrolizar todo el triglicérido, en un periodo similar en donde la producción de lipasa alcanza su máximo, y posteriormente esta enzima ser asimilada por la levadura.

#### 7.3.8.4. Simulación del crecimiento de *Yarrowia lipolytica* 681

Los parámetros obtenidos de los diferentes modelos fueron utilizados en una simulación del crecimiento de *Yarrowia lipolytica* 681, empleando los modelos logísticos de biomasa y sustrato, y el modelo de producción de lipasas, considerando en este último una variable de destrucción ó inhibición de la enzima.



La siguiente figura (Fig. 7.22) muestra la simulación de la producción de enzima por *Yarrowia lipolytica* 681.



Las constantes involucradas en los modelos de producción de enzima y de inhibidor fueron calculados mediante ensayo y error de la generación de datos de las ecuaciones planteadas.

Las cinéticas obtenidas del crecimiento de *Yarrowia lipolytica* 681 corresponden a los datos experimentales obtenidos. Los modelos describen el comportamiento del crecimiento de esta levadura.

La producción de enzima tiene un comportamiento poco común a otros metabolitos microbianos, es importante señalar que existe la presencia de un inhibidor de la enzima, el cual depende del crecimiento celular.

En el ensayo de actividad lipolítica el extracto enzimático fué diluido lo cual en términos de concentración podría dejar libre una determinada concentración de enzima y esta cantidad podría presentar actividad. La inhibición de la enzima podría ser reversible o irreversible, lo cual podría determinarse mediante la diálisis de los extractos enzimáticos con y sin la presencia de ácido oleico.

Es necesario realizar un estudio mas profundo sobre los mecanismos de producción de lipasas por este microorganismo y proponer otros modelos relacionados a la inhibición de la enzima que seguramente ocurren durante el crecimiento.

### 7.3.9. Conclusiones

El medio inicial ó medio base, con la adición de tween 80, resultó en ser un medio que aumenta la producción de lipasas extracelulares. Las lipasas, las cuales siempre fueron medidas del medio de cultivo, estan asociadas a la membrana celular de *Yarrowia lipolytica* 681, las lipasas son liberadas al medio mediante una acción detergente del tween 80. La producción de lipasas no esta asociada completamente al crecimiento celular, ya que incrementos en la concentración de urea y aceite de oliva aumentaron la concentración de biomasa pero no la concentración de enzima.

La morfología de la levadura y la concentración de oxígeno en el medio de cultivo parecen ser importantes en la producción de enzima. La formación de pseudomicelio, así como bajas concentraciones de oxígeno mostraron incrementos en la formación de lipasas.

La temperatura y el pH inicial juegan un papel importante en la producción de enzima. El manipular el pH y la temperatura durante el crecimiento del microorganismo podría generar importantes resultados en el estudio de la síntesis y estabilidad de la enzima "in vivo".

Existen diferencias en la estabilidad de la enzima dependiendo del tipo de reactor utilizado. La estabilidad de la enzima "in vivo" en matraces agitados es mayor a la producida en condiciones de pH controladas. En matraces agitados se encontró actividad durante un lapso de 24 a 66 horas, la estabilidad de la enzima en un reactor con condiciones de pH, agitación y aireación controladas fue por un periodo de 5 a 25 horas, estas diferencias en estabilidad pueden deberse a esfuerzos cortantes y aireación de cada reactor.

La presencia de inhibidores, como lo son ácidos grasos, afectan la actividad lipolítica. Estos efectos inhibitorios pueden ser controlados por la adición de sales, "quelantes" de los ácidos grasos. La cuantificación de ácidos grasos durante el crecimiento de la levadura podría mostrar resultados interesantes sobre el comportamiento de la síntesis de lipasas.

#### 7.4. Comportamiento de *Yarrowia lipolytica* 681 en soporte sólido

La Amberlita IRA-900 fué usada, previamente, como soporte sólido en el crecimiento de *A. niger* (Auria et. al., 1990). Con base a los resultados obtenidos por Auria et. al., *Yarrowia lipolytica* 681 fué crecida en Amberlita IRA-900 (Rhöm y Haas, 1984).

Esta resina fué seleccionada con base en sus características físicas de retención de agua, tamaño de partícula, estabilidad a diferentes pH y densidad. Además, dicha resina no es biodegradable, no presenta inhibidores del crecimiento y su estructura física no es modificada durante el crecimiento (Auria et. al., en prensa-a). La Amberlita IRA-900 presenta algunas desventajas ya que esta resina esta básicamente formada por radicales amonio, los cuales representan una dificultad ante algunas pruebas comunes de cuantificación de biomasa como Lowry, uv, Azul de Coomassie, Biuret y Kjeldahl, así como desventajas por la retención de proteína debido a sus características de intercambiador iónico.

En esta última parte del trabajo los objetivos fueron los siguientes:

- Proponer un método de extracción de la lipasa, debido a sus propiedades de intercambiador iónico de la amberlita IRA-900.
- Proponer un método de extracción de la biomasa, dados los problemas que representa el cuantificar el crecimiento en soportes sólidos.
- Producir lipasas mediante el crecimiento de *Yarrowia lipolytica* 681 sobre la amberlita IRA-900 con el medio de cultivo "optimizado" anteriormente, bajo las condiciones de temperatura y pH inicial mas favorables.
- Comparar algunas características de las lipasas, producidas por medios líquido y sólido, en el sistema de cuantificación de actividad lipolítica propuesto.

##### 7.4.1. Extracción de la enzima del soporte sólido.

La Amberlita IRA-900 es una resina de intercambio aniónico. De acuerdo a sus características de intercambiador iónico se demostró que dicha resina adsorbe a las lipasas y a otras proteínas como seroalbumina de bovinos.

Para demostrar la adsorción de la lipasa en la resina se realizó lo siguiente:

Veinticinco gramos de amberlita seca fueron puestos en contacto con 75 cc de una solución de lipasa con una actividad de  $3.48 \pm 0.095$  u/cc. La mezcla fué agitada a una temperatura de 25 °C por un periodo de 16 horas. La actividad final del sobrenadante fue de 0.054 u/cc.

La resina adsorbió el 99% de la enzima, la cantidad de enzima retenida en el soporte fue de 15.2 u/g de soporte seco.

Posteriormente, la resina, con actividad lipolítica, fue puesta en contacto con diferentes soluciones con el fin de extraer a la enzima cambiando el pH de

la resina.

La resina fué tratada en un rango de pH de 2.5 a 11.5, los "buffer" utilizados fueron de citratos, tris-malatos, tris y carbonatos en concentración 0.2M. Un control con agua destilada fue también utilizado. No se detectó actividad lipolítica en los extractos obtenidos de los tratamientos anteriores. En cambio, si se observó actividad enzimática en el soporte húmedo siendo esta de 7.9 u/g de soporte seco, aproximadamente, el 50% de la actividad retenida en la mezcla inicial. Lo anterior, posiblemente, se debió a que el otro 50% de la enzima tuvo bloqueados sus sitios activos cuando la lipasa estuvo adherida a la amberlita IRA-900.

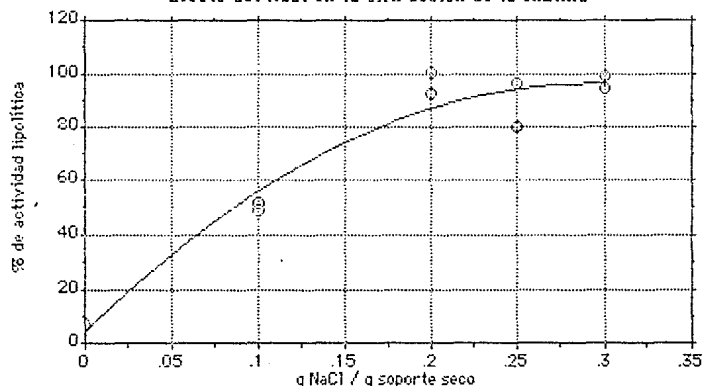
Un tratamiento con una solución de 10% de NaCl (0.23 g de NaCl/g de soporte seco) permitió recuperar el 46% de la enzima adherida, inicialmente, a la resina. La extracción anterior se realizó en un lapso de 2 horas con una temperatura de 25 °C.

Considerando que la enzima pudo ser extraída con NaCl se prosiguió con lo siguiente:

El soporte fué tratado con una solución de NaCl tal que existió una relación de 0.245 g de NaCl/g de soporte seco, en la solución de extracción. Dicho tratamiento permitió el intercambio de la enzima por iones cloruros entre el soporte y el medio líquido.

La siguiente figura (Fig. 7.23) muestra el efecto del NaCl en la extracción de la enzima.

Efecto del NaCl en la extracción de la enzima



La lipasa adherida a la resina fué extraída mediante una solución salina de NaCl manteniendo una relación mínima de 0.2 g de NaCl/g de soporte seco. La lipasa no fué removida totalmente del soporte; posiblemente, se necesite un tiempo de extracción mayor, o bien realizar el tratamiento a diferentes temperaturas, un estudio mas profundo en la relación lipasa-soporte podría generar mejores rendimientos en la extracción.

#### 7.4.2. Cuantificación de la biomasa.

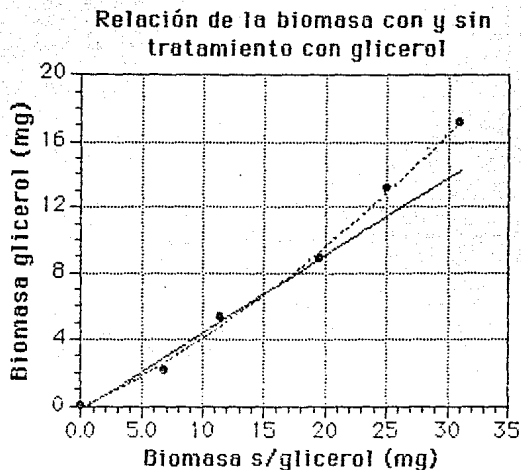
La cuantificación de biomasa, como medida del crecimiento de la levadura en soporte sólido, resultó difícil de valorar por métodos comunes debido a la presencia de la resina en el medio y a la composición química de esta.

La biomasa fué cuantificada mediante la separación de las células por diferencia de densidades mediante el siguiente procedimiento:

Las células en el soporte fueron separadas por agitación y suspendidas en una solución isotónica de NaCl. Posteriormente, la mezcla soporte-células fué centrifugada y separada por densidad (la densidad del soporte es ligeramente mayor a la de las células, ver características de la amberlita IRA-900), el agua excedente fué eliminada y se agregó una solución de glicerol al 80%. El efecto de la solución de glicerol fue aumentar la densidad de las células y formar tres fases. Las células se depositaron en el fondo del tubo de centrifuga seguido de la solución de glicerol y amberlita. La Amberlita-IRA 900 fue entonces fácilmente separada. Posteriormente se realizaron lavados de la biomasa con solución isotónica de NaCl al 1% con el propósito de eliminar el glicerol. Las células fueron finalmente cuantificadas por peso seco a 60 °C durante un período de 24 horas.

A continuación se muestra una curva patrón (Fig. 7.24) de la relación células-soporte tratadas con glicerol y células-soporte sin tratamiento.

La curva patrón fué elaborada con cantidades de biomasa conocida y posteriormente mezclada con el soporte, realizando el tratamiento arriba mencionado.



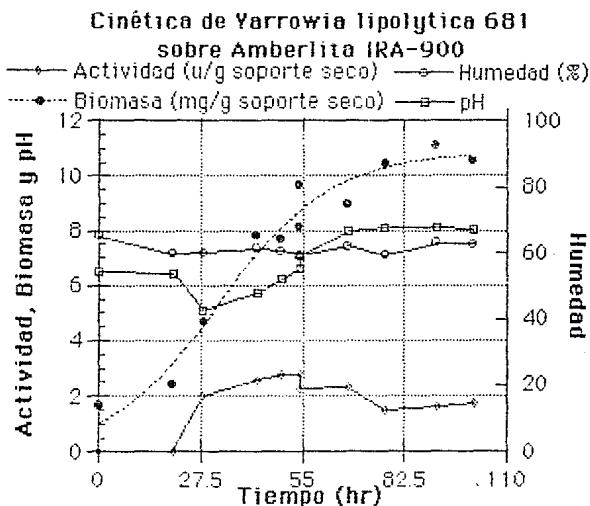
La relación de la biomasa tratada con glicerol y la biomasa control sigue una relación no lineal. Lo anterior, posiblemente, es debido a los lavados a que se somete a la biomasa tratada con glicerol, lo cual resulta en una pérdida significativa ( $n.s.=0.5$ ) de biomasa.

#### 7.4.3. Cinética de crecimiento y producción de enzima de *Yarrowia lipolytica* 681 sobre amberlita IRA-900.

*Yarrowia lipolytica* 681 fué crecida sobre el soporte en columnas empacadas. El medio de cultivo fue el medio base inicial con la presencia de tween 80 al 0.05%, el medio de cultivo fue ligeramente emulsificado para dispersar el aceite de oliva y realizar un mezclado homogéneo con el soporte.

Se realizó un análisis destructivo de cada columna para determinar la cantidad de enzima y biomasa, el pH y la humedad durante el crecimiento de la levadura.

La cinética de crecimiento de *Yarrowia lipolytica* sobre Amberlita IRA-900 fue la siguiente (Fig. 7.25):

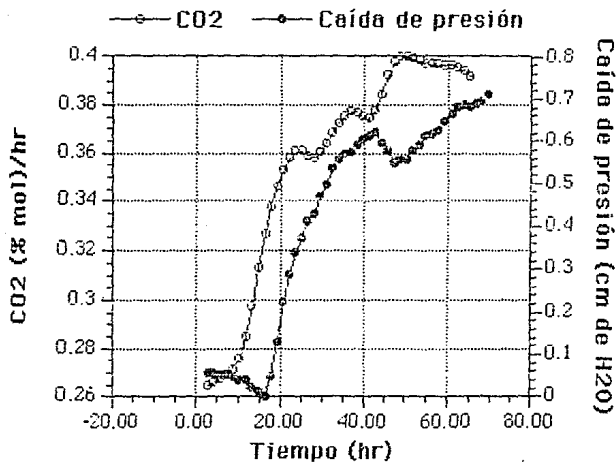
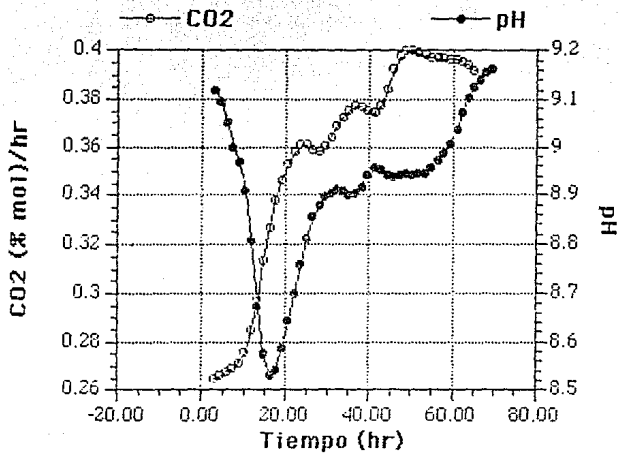


La actividad lipolítica máxima producida fue de 2.5 u/g de soporte seco en un tiempo de aproximadamente 48 horas.

La actividad lipolítica máxima en ambos tipos de medios, líquido y sólido, fué encontrada en un periodo de las 24 a 48 horas de crecimiento.

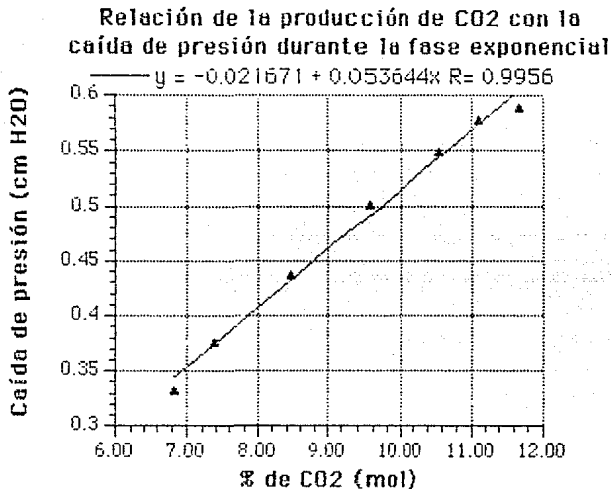
Posteriormente, *Yarrowia lipolytica* 681 fué crecida en un sistema de cultivo en sólido donde fue posible capturar datos de CO<sub>2</sub>, temperatura, pH y caída de presión, en línea. Este sistema permitió determinar, indirectamente, el tiempo donde se existió la mayor actividad metabólica del microorganismo bajo las condiciones de cultivo ya conocidas.

Las siguientes gráficas (Figs. 7.26, 7.27) muestran la evolución del CO<sub>2</sub>, el pH y la caída de presión en el sistema de cultivo mencionado anteriormente.





La siguiente figura (Fig. 7.28) muestra la relación lineal de la caída de presión en la columna con la producción de CO<sub>2</sub> durante la fase exponencial del crecimiento.



La producción de CO<sub>2</sub>, como medida indirecta de la biomasa, está asociada a los cambios en la temperatura, pH y caída de presión dentro de la columna.

Se observa un cambio en el pH en el período en el cual existe mayor actividad metabólica por parte de la levadura. La medida de pH es de un espacio donde intervienen una fase sólida (Amberlita IRA-900), una líquida (medio de cultivo) y una gaseosa (aire saturado). Esta medida, aunque extraña al concepto de pH en fase acuosa indica un cambio en el crecimiento, asociado a otras variables. El pH encontrado al hacer un análisis destructivo de la muestra fue de 6.1 al inicio y de 6.9 al final del crecimiento. El pH observado en línea es superior al observado en el análisis.

La caída de presión es un método, indirecto de la biomasa, utilizado por Auria et. al., (en prensa-b) para observar el crecimiento de *Aspergillus niger* sobre soportes sólidos. La caída de presión es una medida de la resistencia del lecho al flujo de aire. La resistencia es proporcional a la formación de micelio intrapartícula de *Aspergillus niger*. En este experimento se observa una relación entre la producción de CO<sub>2</sub> y la caída de presión por el crecimiento de *Yarrowia lipolytica* 681. La caída de presión por el crecimiento de la levadura es mucho menor al observado en *A. niger*. *Yarrowia lipolytica* 681 crece en

forma de pseudomicelio, el cual es mas corto en comparación al micelio del hongo. Posiblemente, esta sea la causa por la que se observó una caída de presión menor a la presentada por *A. niger*.

Los datos obtenidos por el análisis destructivo de la muestra (primer sistema) y los capturados en línea demuestran una actividad metabólica en un periodo de 18 a 36 horas de cultivo. La actividad enzimática fué observada en ese mismo periodo.

Los resultados obtenidos demuestran que *Yarrowia lipolytica* 681 creció sobre un soporte sólido y fue posible extraer lipasas del medio de cultivo.

#### **7.4.4. Comparación de las lipasas obtenida en medios líquido y sólido**

Alazard y Raimbault (1981) realizaron un estudio comparativo de la producción de amilasas en cultivos líquido y sólido mediante el crecimiento de *A. niger*. En ese estudio se observó un incremento en la constante de afinidad, así como una mayor termoestabilidad de la enzima producida por cultivo sólido. Alazard y Raimbault (1981) asumen que estas diferencias significativas entre ambas enzimas, producidas en diferentes medios, están asociadas a las condiciones de cultivo.

Ramesh y Lonsane (1991) demuestran que la producción de amilasas mediante el crecimiento de *Bacillus licheniformis* M27 en cultivo sumergido es reprimida por la formación de productos finales de la hidrólisis del sustrato donde actúa la enzima. La regulación por productos finales en este microorganismo es minimizada cuando *Bacillus licheniformis* M27 es crecido en sólido. Este efecto no represivo puede deberse al lento y bajo proceso de difusión debido a la baja actividad de agua, así como a la ausencia de agitación durante el crecimiento sobre soportes sólidos.

Las condiciones de cultivo en que fué crecida *Yarrowia lipolytica* 681 influyen en su producción de lipasas.

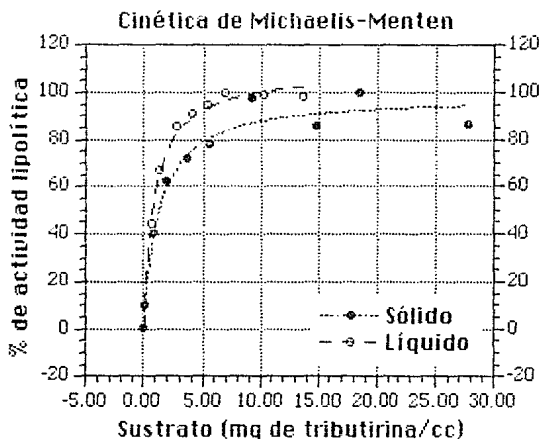
A continuación se muestran algunas características de las lipasas, las cuales fueron obtenidas por crecimiento en líquido y sólido mediante el cultivo de *Yarrowia lipolytica* 681.

##### **7.4.4.1. Cinética de Michaelis-Menten en las lipasas obtenidas por cultivos líquido y sólido.**

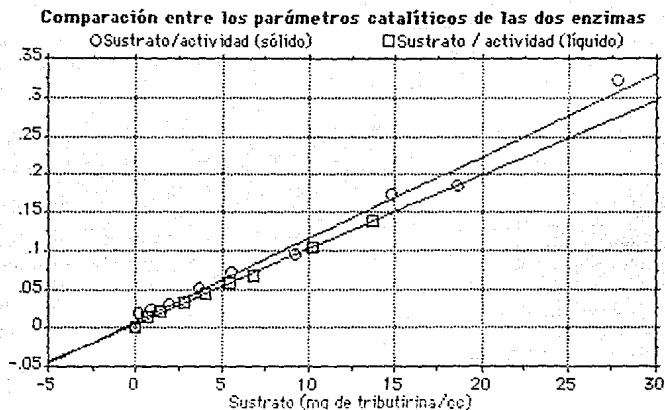
Kawase et. al. (1991) demuestra que la modificación de 1 ó 2 aminoácidos residuales, en la lipasa de *Pseudomonas* sp. KW1-56, con tetraminometano hace cambiar los parámetros cinéticos de la actividad lipolítica hacia un mismo sustrato, con respecto a la enzima nativa. En 1989, Kawase et. al.

reporta que la modificación de los aminoácidos terminales de la lipasa de *Candida cylindracea* resulta en un cambio en las constantes de afinidad y velocidad de reacción de la enzima.

La siguiente gráfica (Fig. 7.29) muestra el efecto de la tributirina en la velocidad de reacción de la enzima.



Las cinéticas de Michaelis-Menten de ambas lipasas fueron transformadas a ecuaciones lineales (Fig. 7.30) para determinar las constantes de saturación de ambos tipos de enzima.



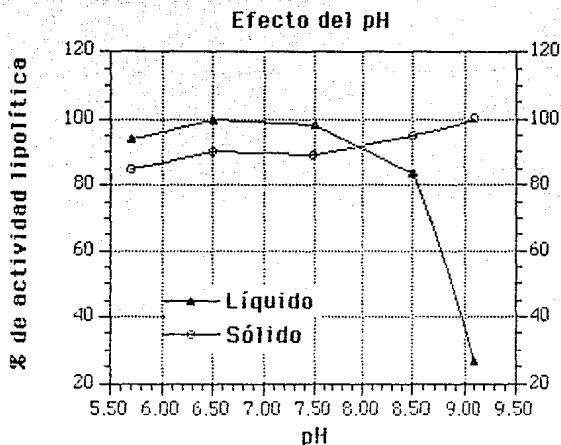
La constante de Michaelis-Menten de la enzima producida por vía líquida fue de 0.48 mg/cc y de 0.72 mg/cc para la enzima producida por cultivo sólido. El análisis estadístico muestra que no existen diferencias significativas entre la  $K_m$  de estas enzimas a un nivel de significancia de 0.05, pero sí hubo diferencias significativas entre los niveles de 0.45 y 0.50. Lo anterior implica el tener el 50% de probabilidad de que existan diferencias entre ambos  $K_m$ , esto es similar a ganar o perder en un volado.

#### 7.4.4.2. Efecto del pH en las lipasas obtenidas por cultivos líquido y sólido

Nakahara et. al. (1987) muestran el efecto de la N-acilación del aminoácido residual de la enzima lipoxigenasa. Los efectos sobre esta enzima determinaron una menor estabilidad de dicha enzima a pH altos debido al cambio en su punto isoelectrico. También se observó un decremento en la constante de afinidad y en la termoestabilidad de la enzima modificada.

La actividad de ambas lipasas, obtenidas por diferentes medios, fué observada en un rango de pH de 5.5 a 9.0 en el medio de reacción anteriormente establecido. El pH fué ajustado con buffer tris-malatos 0.2M.

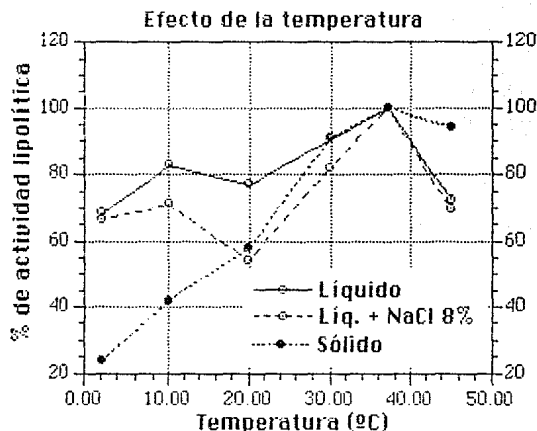
En la siguiente figura (Fig. 7.31) se compara la estabilidad de las lipasas, obtenidas por diferentes cultivos, a diferentes pH.



La actividad lipolítica del cultivo en líquido decrece por arriba de un pH de 8, contrario a la actividad que presenta el extracto enzimático del cultivo en sólido. Tal efecto, posiblemente, se deba a un cambio en el punto isoelectrico de la enzima debido a un cambio en la estructura y/o composición de la enzima, tal como lo ha observado por Nakahara et. al. (1987).

#### 7.4.4.3. Efecto de la temperatura en las lipasas obtenidas por cultivos líquido y sólido

La actividad de ambas lipasas fué observada en un rango de temperatura de 0 a 45 °C (Fig. 7.32).



El extracto enzimático obtenido por cultivo sólido presentó dos máximos de actividad; uno a 10 °C y otro a 37 °C. Posiblemente debido a la presencia de dos tipos de lipasa. El extracto enzimático producido por cultivo en sólido presentó un máximo a 37 °C.

Se observó el efecto del NaCl sobre la actividad lipolítica. El extracto enzimático del cultivo en sólido contiene una concentración de NaCl superior al del cultivo en líquido, debido al método de extracción usado.

El extracto enzimático del cultivo en líquido fué llevado a una concentración del 8% de NaCl. La actividad en esa solución se vió afectada por la sal debido, posiblemente, al incremento en la fuerza iónica del medio de reacción como ya se ha echo notar. Aún con el efecto del NaCl sobre la enzima se observaron dos puntos máximos de actividad en el extracto del cultivo en líquido.

El NaCl no tiene otro efecto sobre la enzima mas que en la actividad. La diferencia que existe entre ambos extractos enzimáticos, en cuanto a la posibilidad de dos tipos de lipasa en uno y solo un tipo de enzima en el otro, se debe, tal vez, a una forma de represión de la síntesis de una enzima en el

microorganismo durante la producción de lipasas por cultivo sólido.

#### 7.4.4.4. Productividad

El método de crecimiento de microorganismos sobre soportes sólidos biodegradables ha sido una alternativa económica a reducir los costos de producción y/o extracción de enzimas para uso industrial.

Raimbault (1968) hace una revisión sobre las ventajas y tipo de enzimas que pudieran producirse por este tipo de cultivo. Shah et. al. (1991) y, Ramesh y Lonsane (1991) realizan un estudio sobre la factibilidad económica de producir amilasas por cultivo en sólido. Este estudio demuestra ser 500 veces mas rentable la producción de amilasas por cultivo sólido que por cultivo sumergido.

En el caso de la producción de lipasas Rivera-Muñoz et. al. (1991) hace crecer *Penicillium candidum* en salvado de trigo mediante el cultivo en líquido y en sólido. La producción de lipasas fue dos veces superior cuando el microorganismo creció sobre el soporte sólido.

La siguiente tabla muestra algunos datos de producción de lipasas por *Yarrowia lipolytica* 681 en tres medios de cultivo:

**Tabla 7.16 Productividad de los medios de cultivo líquido y sólido**

Medio de cultivo	Actividad	Densidad (g/cc de reactor)	Volumen de reactor (cc)	Volumen de trabajo (cc)	Relación: vol.reactor/vol.trabajo
Líquido	3.45 u/cc	1.05 g/cc	250	100	2.5
Sólido A	1.98 u/g soporte húmedo	0.43 g soporte húmedo/cc	47	20.5	2.2
Sólido B	5.27 u/g soporte húmedo	0.43 g soporte húmedo/cc	47	20.5	2.2

Medio de cultivo	Actividad*volumen de trabajo,(u)	Actividad/volumen de reactor,(u/cc)	Actividad/volumen de medio de cultivo líquido (u/cc)
Líquido	345.0	138.0	3.45
Sólido A	17.5	19.3	3.29
Sólido B	46.5	51.5	6.76

**Tabla 7.17 Características de los medios de cultivo líquido, sólido A y sólido B**

Medio de cultivo	Composición del medio de cultivo
Líquido	100cc de medio de cultivo en matraces de 250cc de volumen.
Sólido A	12.9cc de medio de cultivo y 8.6 g de soporte seco en columnas con 50cc de volumen. En este medio agua-soporte se considera que la concentración de medio de cultivo se diluye por efecto del soporte 0.4 veces.
Sólido B	12.9cc de medio de cultivo y 8.6 g de soporte seco en columnas con 50cc de volumen. En este medio agua-soporte no se considera que la concentración de medio de cultivo se diluye por efecto del soporte, es decir, la concentración de nutrientes en el medio de cultivo líquido es 0.6 veces mayor al medio de cultivo líquido empleado en "Sólido A" y en el medio "Líquido".

Los rendimientos de lipasa, por volumen de trabajo y reactor, en medio líquido fueron mejores a los obtenidos a los respectivos en medio sólido.

Los rendimientos por volumen de medio de cultivo en medios sólidos son similares y hasta mejores a los obtenidos en medio líquido, esto es, la concentración de enzima por volumen líquido utilizado en medios sólidos es mayor al medio líquido. Existe una importante desventaja por parte de los medios sólidos, esta es que, el volumen acuoso no se encuentra libre del soporte y habría que extraerlo con alguna solución salina, lo cual implica diluir la enzima y por tanto bajar los rendimientos por unidad de volumen.

Los medios sólidos tendrían la ventaja de inmovilizar a la lipasa y mantener sus rendimientos.

Un aumento en la concentración de nutrientes por gramo de soporte seco resulta en un incremento de la actividad lipolítica, este efecto no fue analizado en los medios líquidos.

#### 7.4.5. Conclusiones

*Yarrowia lipolytica* 681 fue capaz de crecer sobre un soporte sólido y producir lipasas. La producción de enzima, en cultivo sólido, se realiza en las primeras horas del crecimiento de la levadura similar al crecimiento en cultivo líquido en condiciones de pH controladas. En ambos tipos de cultivo la aireación fue mayor a la de matraces agitados.

La lipasa producida por *Yarrowia lipolytica* 681 es adsorbida por la Amberlita IRA-900, lo cual presenta desventajas en su recuperación, aunque



pueden existir alternativas como la inmovilización "in vivo" de esta enzima, a su vez esta alternativa puede ser aplicable al cultivo en líquido.

*Yarrowia lipolytica* 681 produce lipasas con características diferentes cuando es crecida en diferentes medios de cultivo. El metabolismo microbiano cambia ante su ambiente. Resultados como estos han sido hallados en otros microorganismos, lo cual apoya la idea de buscar otras alternativas de cultivo donde puedan encontrarse beneficios para el uso humano.

## 8. Conclusiones

El crecimiento de microorganismos sobre diferentes medios de cultivo es afectado por las condiciones de estos medios. Efectos sobre la afinidad por un sustrato y, en el rango de pH y temperatura de actividad de las lipasas de *Yarrowia lipolytica* 681 fueron observados por el hecho de crecer, a esa levadura, en medios líquido y sólido.

La cuantificación de las lipasas es sensible a cambios físico-químicos en las condiciones del sistema de ensayo. Esta sensibilidad de las lipasas a esos cambios y a cambios estructurales que les confieren diferente comportamiento cinético por crecer en diferentes medios, posiblemente, no ha permitido normalizar un sistema de ensayo general que permita cuantificar y comparar lipasas de diferentes microorganismos. El sistema de ensayo propuesto en esta tesis, como otros muchos, fue sensible, repetitivo y comparativo con sus respectivas limitaciones.

El medio de cultivo propuesto permite el crecimiento de *Yarrowia lipolytica* y la producción de enzima. En este medio se conocen los elementos que lo componen, por lo que fue y es factible realizar un estudio sobre los principales elementos que afectan la producción de lipasas.

Los resultados de la tesis han generado interés sobre el modelamiento de la producción de lipasas por el crecimiento de microorganismos sobre sustratos insolubles. Estudios sobre este tema podrían dar a conocer el comportamiento de la síntesis, represión e inhibición de estas enzimas. Otro tema de interés podría ser la inmovilización de lipasas "in situ" por cultivo líquido y sólido, lo cual ofrecería, a parte de las ventajas de la inmovilización, ventajas en al evitar la separación de la enzima del medio de cultivo.

La producción de lipasas en medio sólido es factible, pero las ventajas en productividad de esta enzima en medio líquido hacen que no puedan competir por ahora desde un punto de vista económico. El cultivo sobre soportes sólidos sigue siendo una alternativa en la producción de enzimas, y en otros casos una realidad y una esperanza en el tratamiento de desechos orgánicos.

La actividad lipolítica es inhibida por productos de la hidrólisis de triglicéridos. La baja estabilidad de la enzima en el medio de cultivo, en condiciones controladas, se debe, posiblemente, a la presencia de ácidos grasos. La velocidad de hidrólisis del sustrato, posiblemente, es mayor a la velocidad de consumo de los ácidos grasos por la levadura, esto es, existe una acumulación del inhibidor en el medio.

## 9. Bibliografía

- Alazard, D. and Raimbault, M. Comparative Study of Amylolytic Enzymes Production by *Aspergillus niger* in Liquid and Solid Cultivation. *European J. Appl. Microbiol. and Biotechnol.* 12 (1981) 113-117.
- Andree, H., Muller, W.R. Schmidt, R.D.J. *Appl. Biochem.* 2 (1980), 218. Citado por Sztajer, H.-y Zbotnska, E., 1988.
- Arbige, M.V., Freund, P.R., Silver, S.C. and Zelko, J.T. Novel Lipase for Cheddar Cheese Flavor Development. *Food Technology* April (1986) 91-98.
- Arnold, R.G., Shahani, K.M. and Dwivedi, B.K. Application of Lipolytic Enzymes to Flavor Development in Dairy Products. *J. of Dairy Science.* 58 (1975) 1127-1143.
- Auria, R., Palacios, J., Revah, S. Determination of the Interparticular Effective Diffusion Coefficient for CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> in Solid State Fermentation. *Biotechnology and Bioengineering.* (en prensa-a).
- Auria, R., Morales, M., Villegas, E. and Revah, S. Influence of Mold Growth on the Pressure Drop in Solid State Fermentors. *Biotechnology and Bioengineering.* (en prensa-b).
- Auria, R., Hernández, P., Raimbault, M., Revah, S. Ion Exchange Resin: A Model Support for Solid State Growth Fermentation of *Aspergillus niger*. *Biotechnol Techn.* 4 (1990) 391-396.
- Bailey, J.E. and Ollis, F.D. *Biochemical Engineering Fundamentals.* McGraw-Hill Kogakuska. L.T.D. 1977.
- Baillargeon, M.W., Bistline, R.G., and Sonnet, P.E. Evaluation of Strains of *Geotrichum candidum* for Lipase Production and Fatty Acid Specificity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 30 (1989) 92-96.
- Baillargeon, H.W. and McCarthy, S. *Geotrichum candidum* NRRL Y-553 Lipase: Purification, Characterization and Fatty Acid Specificity. *Lipids* 26 (1991a) 831-836.
- Baillargeon, M.W. and McCarthy, S. Selective Lipid Hydrolysis by *Geotrichum candidum* NRRL y-553 Lipase. *Biotechnol. Letters* 13 (1991b) 871-874.
- Benzonana, G. and Desnuelle, P. Kinetic Study of the Action of Pancreatic Lipase on Triglycerides in Emulsion. *Enzyme Action in a Heterogeneous Medium.* *Biochimica et Biophysica Acta.* 105 (1965) 121-126.
- Beuchat, L.R. Influence of Water Activity on Growth, Metabolic Activities and Survival of Yeasts and Molds. *J. of Food Protection.* 46 (1983) 135-141.
- Borgstrom, B. Determination of Pancreatic Lipases in Human Small Intestinal Content. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 9 (1957) 226-229.
- Conn, E.E. and Stumpf, P.K. *Outlines of Biochemistry.* 3rd Edition. John Wiley and Sons, New York, 1972.
- Desnuelle, P. Pancreatic Lipase. *Advances in Enzymology* 23(1961)129-161.

Difco Manual of Dehydrated Culture Media and Reagents for Microbiological and Clinical Laboratory Procedures. Difco Laboratories. Ninth Edition. 1977.

Dixon, M. and Weeb, E. Enzymes. Academic Press (1979).

Downey, W. Review of the Progress of Dairy Science: Flavour Impairment from Pre- and Post-Manufacture Lipolysis in Milk and Dairy Products. J. of Dairy Research 47 (1980) 237-252.

Dunkley, W.L. and Smith, L.M. Hydrolytic Rancidity in Milk. IV. Relationship Between Tributyrinase and Lipolysis. J. Dairy Science 34 (1951) 940-947.

Eitenmiller, R.R. Production and Properties of *Penicillium roqueforti* Lipase. J. of Food Science 35 (1970) 130-135.

Ferhst, A. Estructura y Mecanismo de los Enzimas. Ed. Reverté, S.A. México, 1980.

Fijii, T. Tatsra, T., Minagawa, M. J. Am. Oil. Chem. Soc. 4 (1985), 1026. Citado por Sztajer, H. y Zboinska, E., 1988.

Fischer, B.E. and Kleber, H.P. Isolation and Characterization of the Extracellular Lipase of *Acinetobacter calcoaceticus* 69V. J. Basic Microbiol. 27 (1987) 427-432.

Foster, T.L., Jensen, C. and Plath, E. A Photometric Method for Estimating the Lipase Content of Milk. J. Dairy Science 38 (1955) 764-774.

Fukushima, D. "Koji as an Important Source of Enzyme in the Orient and its Unique Composite System of Proteinases and Peptidases", Use of Enzyme in Food Technology. Proc. Symp. Int. M8 Versailles, Dupuy. Ed. Lavostier, Paris, 1982.

Giuseppin, M.L.F. Effects of Dissolved Oxygen Concentration on Lipase Production by *Rhizopus delemar*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 20 (1984) 161-165.

Gomi, K., Ota, Y. and Minoda, Y. Isolation and Identification of Lipase Activators from *Saccharomyces lipolytica*. Agr. Biol. Chem. 50 (1986a) 2525-2530.

Gomi, K., Ota, Y. and Minoda, Y. Role of Lipase Activators Produced by *Saccharomyces lipolytica* and Calcium Ion in Its Lipase Reaction. Agr. Biol. Chem. 50 (1986b) 2531-2536.

Gomi, K., Ota, Y., Minoda, Y. Physical and Chemical Characterization of Cell-Bound Lipases from *Saccharomyces lipolytica*. Agric. Biol. Chem. 48 (1984), 1061.

Halling, P.J. Lipase-Catalyzed Reactions in Low-Water Organic Media: Effects of water Activity and Chemical Modification. Biochem. Soc. Transactions 17 (1989) 1142-1145.

Harrison, F.C. A Systematic Study of Some *Torulas*. Trans. R. Soc. Can., sect. V, 22 (1928) 187-225.

Hedrich, H.C., Spener, F., Menge, Y., Hecht, H.J. and Schmid, R.D. Large Scale Purification, Enzymic Characterization, and Crystallization of the Lipase from *Geotrichum candidum*. Enzyme Microb. Technol. 13 (1991) 840-847.

Hegedus, D.D., and Khachatourians, G.G. Production of an Extracellular Lipase by *Beauveria bassiana*. *Biotechnol. Letters* 10 (1988) 637-642.

Hesseltine, C.W. Solid State Fermentation. *Biotechnol. and Bioeng.* 14 (1972) 517-532.

Hernández, S. Caracterización y Evaluación Físico-biológica de Soportes inertes para la FES. *Reportes de Biotecnología*, 21 (1990).

Hodgson, D. J. of *General Microbiology*. 128 (1982) 2417-2430.

Hofelmann, M., Hartmann, J., Zink, A. and Schreier, P. Inositolin, Purification, and Characterization of Lipase Isoenzymes from a Technical *Aspergillus niger* enzyme. *J. of Food Science* 50 (1985) 1721-1725.

Ichishima, E., Metai, H., Yoshida, F. Physical and Chemical Properties of Lipase from *Torulopsis ernobii*. *Biochim. Biophys. Acta.* 154 (1968), 586-588.

Iwai, M. and Tsutsuka, Y. "Fungal Lipase" in *Lipases*. Edited by Bengt Borgström and Howard L. Brockman. Elsevier Sci. Publishing Co. Inc., 1984.

Jacobsen, T. Extracellular and Cell-Bound Lipase Activity in Relation to Growth of *Geotrichum candidum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32 (1989) 256-261.

Kaimal, T.N.B. and Saroji, M. Selective Removal of Linolenic Acid from Soybean Oil by Lipase Catalyzed Interesterification at Low Temperature. *Biotechnol. Letters* 10 (1988) 337-340.

Kalle, G.P., Gedkari, S.V. and Deshpande, S.V. Inducibility of Lipase in *Candida lipolytica*. *Indian J. Biochem. Biophys.* 9 (1972) 171-175.

Kang, S.T. and Rhee, J.S. Effect of Water on Hydrolysis of Olive Oil by Immobilized Lipase in Reverse Phase System. *Biotechnol. Letters* 10 (1988) 341-346.

Kawase, M. and Tanska, A. Effects of Chemical Modification of Amino Acid Residues on the Activities of Lipase from *Candida cylindracea*. *Enzyme Microb. Technol.* 11 (1989) 44-48.

Kawase, M., Takahashi, H., Sonomoto, K., Nakamura, K. and Tanska, A. Effect of Chemical Modification of Tyrosine Residues on Activities of Bacterial Lipase. *J. of Fermentation and Bioengineering* 72 (1991) 317-319.

Kosaric, N., Zajic, E., Aboue, T.J. and Gerson, D. Lipase Synthesis in Hydrocarbon Fermentation. *Biotechnol. and Bioeng.* 21 (1979) 1133-1149.

Kosugi, Y., Tanaka, H. and Tomizuka, N. Continuous Hydrolysis of Oil by Immobilized Lipase in a Countercurrent Reactor. *Biotechnology and Bioengineering* 36 (1990) 617-622.

Kreger, N.J.W. *The yeast a taxonomic study*. Elsevier Science Publishers (1984).

Lamberet, G. and Lenoir, J. Les Caractères du système lipolytique de L'espèce *Penicillium caseicola*. Purification et Propriétés de la Lipase Majeure. *Le Lait*. 56 (1976) 622-644.

Long's. *Handbook of Chemistry*. McGraw-Hill (1973).

- Langrand, G., Triantaphylides, C. and Baratti, J. Lipase Catalyzed Formation of Flavour Esteres. *Biotechnol. Letters* 10 (1988) 549-554.
- Lee, Y. and Choo, C. The Kinetics and Mechanism of Shear Inactivation of Lipase from *Candida cylindracea*. *Biotech. and Bioeng.* 33 (1989) 183-190.
- Lonsane, B.K., Ghidyal, N.P., Budiastman, S. and Ramakrishna, J. Review Ingenieering Aspects of Solid State Fermentation. *Enc. Microb. Technol.* 7 (1985) 258-265.
- Luedeking, R. and Piret, E.L. A Kinetic Study of the Lactic Acid Fermentation. *J. Biochem. Microbiol. Technol. Eng.* 1 (1959) 393-398.
- Macrae, A. Extracellular Microbial Lipases in Microbial Enzymes and Technology. Fogarty, W. ed. Applied Science, 1983.
- Matori, M., Asahara, T. and Ota, Y. Positional Specificity of Microbial Lipases. *J. of Fermentation and Bioengineering* 72 (1991a) 397-398.
- Matori, M., Asahara, T. and Ota, Y. Reaction Conditions Influencing Positional Specificity Index (PSI) of Microbial Lipases. *J. of Fermentation and Bioengineering* 72 (1991b) 413-415.
- Miller, G.L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry* 31 (1959) 426-428.
- Montet, D., Ratomahenina, R., Pina, M., Graille, J. and Galzy, P. Purification and Characterization of a Lipase from *Candida curvata* Lodder and Kreger Van-Rij CBS 570. *Fette-Seifen-Anstrichmittel.* 87 (1985) 161-185. Citado por Novotny et. al.
- Moo-Young, M.A., Moreira, R. and Tengerty, R.P. "Principles of Solid Substrate Fermentation", in *The filamentous Fungi*, Vol. IV, S.E. Smith, D.R. Berry and B. Yrjstiunsen, Ed. Arnold, London, 1983.
- Mulchandani, A., Luong, J.H.T. and Leduy, A. Batch Kinetics of Microbial Polysaccharide Biosynthesis. *Biotechnol. and Bioeng.* 32 (1988) 639-646.
- Muderhwa, J.M., Ratomahenina, R., Pina, M., Graille, J. and Galzy, P. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 62 (1985) 1031. Citado por Sztajer, H. y Zboinska, E., 1988.
- Nahas, E. Control of Lipase Production by *Rhizopus oligosporus* under Various Growth Conditions. *J. of General Microbiol.* 154 (1986) 227-233.
- Nair, C.S. and Bone, D.H. Production of Lipase of *Aspergillus foetidus* in a Batch Stirred Reactor. *Biotechnol. Letters.* 9 (1987) 601-604.
- Nakahara, T., Higuchi, K., Hirata, H. and Ishikawa, K. Effect of N-Acylation of Lysine Residue on Lipoxigenase Activity: Modification for Use in Organic Solvents. *Enzyme Microb. Technol.* 10 (1988) 474-478.
- Nga, B.H., Heslot, H., Gaillardin, C.M., Fournier, P., Chan, K., Chan, Y.N., Lim, E.W. and Mai, P.C. Use of nystatin for selection of tributyrin non-utilizing mutants in *Yarrowia lipolytica*. *J. of Biotechnology.* 7 (1988) 83-86.

- Nga, B.H., Gaillardin, C.M., Fournier, P. and Heslot, H. Genetic Analysis of lipase Low-producing Mutants of *Yarrowia lipolytica*. *J. of General Microbiol.* 135 (1989) 2439-2443.
- Novotny, C., Dolezalova, L., Musil, P. and Novak, M. The Production of lipases by some *Candida* and *Yarrowia* Yeasts. *J. Basic Microbiol.* 28 (1988) 221-227.
- Okeke, C.N. and Okolo, B.N. The Effect of Cultural Conditions on the Production of Lipase by *Acremonium strictum*. *Biotechnol. Letters* 12 (1990) 747-750.
- Olson, B. and Johnson, M. Factors Producing High Yeast Yields in Synthetic Media. *J. of Bacteriology* 57 (1948) 235-243.
- Omar, I.C., Nishio, N. and Nagai, S. Production of a Thermostable Lipase by *Humicola lanuginosa* Grown on Sorbitol-Corn Steep Liquor Medium. *Agric. Biol. Chem.* 51 (1987) 2145-2151.
- Omer, M.M., Abdel, A.A., Rabie, A.M. and Ashour, M.M. Free Fatty Acids and Quality of Domiati Cheese Made From Dried Milk as Affected by Added Lipase. *Food Chemistry* 24 (1987) 197-201.
- Ota, Y. and Yamada, K. Lipase from *Candida parailipolytica*. Part I. Anionic Surfactants as the Essential Activator in the Systems Emulsified by Polyvinyl Alcohol. *Agr. Biol. Chem.* 30 (1966a) 351-358.
- Ota, Y. and Yamada, K. Lipase from *Candida parailipolytica*. Part II. Alkaline Earth Metal Ions as Cofactor in Shaken System Containing no Emulsifier. *Agr. Biol. Chem.* 30 (1966b) 1030-1036.
- Ota, Y. and Yamada, K. Lipase from *Candida parailipolytica*. Part III. Further Studies on the Activation of the Enzyme Systems with Bile- or Calcium Salts. *Agr. Biol. Chem.* 31 (1967) 809-816.
- Ota, Y., Suzuki, M. and Yamada, K. Lipids and Related Substances Inducing the Lipase Production by *Candida parailipolytica*. *Agr. Biol. Chem.* 32 (1968a) 390-391.
- Ota, Y., Miyairi, S. and Yamada, K. Sterol Requirement for the Lipase Production by *Candida cylindracea*. *Agr. Biol. Chem.* 32 (1968b) 1476-1478.
- Ota, Y., Comi, K., Kato, S., Sugiura, T. and Minoda, Y. Purification and Some Properties of Cell-Bound Lipase from *Saccharomycopsis lipolytica*. *Agr. Biol. Chem.* 46 (1982) 2885-2893.
- Pal, N. J., Das, S. and Kundu, K. Influence of Culture and Nutritional Conditions on the Production of Lipase by Submerged Culture of *Aspergillus niger*. *Ferment. Technol.* 56 (1978) 593-598.
- Palmer, T. *Understanding Enzymes*. Ellis Horwood Publishers, London, 1987.
- Raimbault, M. and Alazard, D. Culture Method to Study Fungal Growth in Solid Fermentation. *European J. Appl. Microbiol. and Biotechnol.* 9 (1980) 199-209.
- Raimbault, M. *Enzymes Productin by Solid State Fermentation*. Seminar on "Solid State Fermentation in Bioconversion of Agro-Industrial Raw Materials". ORSTOM, Montpellier, 1988. Rhom and Hass Company. Amberlita IRA-900 engineering notes. 1984.
- Ramesh, M.V. and Lonsane, B.K. Regulation of Alpha Amylase Production in *Bacillus licheniformis* M27 by Enzyme End Products in Submerged Fermentation and its Overcoming in Solid State

Fermentation System. *Biotechnol. Letters* 13 (1991) 355-360.

Revah, S. and Lebeault, J.M. Accelerated Production of Blue Cheese Flavors by Fermentation on Granular Curds with Lipase addition. *Lait* 69 (1989) 281-289.

Rivera-Muñoz, G., Tinoco-Valencia, J.R., Sánchez, S. and Farrés, A. Production of Microbial Lipases in Solid State Fermentation System. *Biotechnol. Letters* 13 (1991) 277-280.

Rhodes, M.E. *J. Gen. Microbiol.* 21 (1959) 221-263.

Rostrup-Nielsen, T., Pedersen, L.S. and Villadsen, J. Thermodynamics and Kinetics of Lipase Catalyzed Hydrolysis of Oleyl Oleate. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 48 (1990) 467-482.

San Clemente, C.L. and Vadehra, V.D. Instrumental Assay of Microbial Lipase at Constant pH. *Applied Microbiology* 15 (1967) 110-113.

Sato, K., Nagatani, M., Nakamura, K. and Sato, S. Growth Estimation of *Candida lipolytica* from Oxygen Uptake in a Solid State Culture with Forced Aeration. *Ferment. Technol.* 61 (1983) 623-629.

Sato, K., Nakamura, K. and Sato, S. Solid State Ethanol Fermentation by Means of Inert Gas Circulation. *Biotechnol. and Bioengineering* 27 (1985) 1312-1319.

Schwimmer, S. *Source Book of Food Enzymology*. The AVI Publishing Co. Inc., USA, 1981.

Seitz, E.W. Industrial Application of Microbial Lipases. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 51 (1974) 12-16.

Shah, N.K., Ramamurthy, V. and Kothari, R.M. Comparative Profiles of Fungal Alpha Amylase Production by Submerged and Surface Fermentation. *Biotechnol. Letters* 13 (1991) 361-364.

Shaw, J., Wang, D. and Wang, Y. Lipase-Catalyzed Ethanolysis and Isopropanolysis of Triglycerides with Long-Chain Fatty Acids. *Enzyme Microb. Technol.* 13 (1991) 544-546.

Shimada, Y., Sugihara, A., Tominaga, Y., Iizumi, T. and Tsunasawa, S. cDNA Molecular Cloning of *Geotrichum candidum* Lipase. *J. Biochem.* 106 (1989) 383-388.

Sonnleitner, B. Dynamics of Yeasts Metabolism and Regulation. *Bioprocess Engineering* 6 (1991) 167-195.

Stavnsbjerg, M., Sietske, A., Jensen, B.F., Hazelden, K., Greenough, R. and Everett, D. Safety Evaluation of Lipase from *Mucor miehei* for Inter-Esterification of Edible Oils and Fats. *Food Additives and Contaminants*. 5 (1988) 251-265.

Sugihara, A., Shimada, Y. and Tominaga, Y. Purification and Characterization of *Aspergillus niger* Lipase. *Agr. Biol. Chem.* 52 (1988) 1591-1592.

Sugiura, T., Ota, Y. and Minoda T. Effects of Fatty Acids, Lipase Activators, Phospholipids and Related Substances on the Lipase Production by *Candida paratropicalis*. *Agric. Biol. Chem.* 39 (1975) 1489-1494.

Swern, D. *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*. John Wiley and Sons, New York, 1979.



- Sztajer, H. and Zboinska, E. Microbial Lipases in Biotechnology. *Acta Biotechnol.* 8 (1988) 169-175.
- Sztajer, H., Maliszewska, I. and Wieczorek, J. Production of Exogenous Lipases by Bacteria, Fungi, and Actinomycetes. *Enzyme Microb. Technol.* 10 (1988) 492-497.
- Tatars, T., Fijli, T., Kawase, T., Minagawa, M. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 6 (1985), 1053. Citado por Sztajer, H. y Zboinska, E., 1988.
- Takamine, J. Enzymes of *Aspergillus oryzae* and the application of its amylolytic Enzyme to the Fermentation Industry. *J. Ind. Eng. Chem.* 6 (1914) 824-28.
- Tomizuka, N., Ota, Y. and Yamada, K. Studies from *Candida cylindracea*. Part. I. Purification and Properties. *Agr. Biol. Chem.* 30 (1966a) 576-584.
- Tomizuka, N., Ota, Y. and Yamada, K. Studies from *Candida cylindracea*. Part II. Amino Acid Composition, Carbohydrate Component and Some Physical Properties. *Agr. Biol. Chem.* 30 (1966b) 1090-1096.
- Touraine, F. and Drapron, R. Influence of Water Activity on Glyceride and Glycol Ester Synthesis by Lipase from *Rhizopus arrhizus*. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* 21 (1988) 255-259.
- Ucar, T., Ekiz, H.I. and Caglar, M.A. Surface Effects of Solvents in Hydrolysis of Water Soluble Lipids by *Candidal* Lipase. *Biotechnol. and Bioengineering* 33 (1989) 1213-1218
- Valero, F., Ayats, F., López-Santín, J., and Poch, M. Lipase Production by *Candida rugosa*: Fermentation Behaviour. *Biotechnol. Letters.* 10 (1988) 741-744.
- Valero, F., Rfo, J.L. del, Poch, M. Sola, C. Fermentation Behaviour of Lipase Production by *Candida rugosa* Growing on Different Mixtures of Glucose and Olive Oil. *J. Ferm. and Bioeng.* 72 (1991) 399-401.
- Veeraragan, K. and Gibbs, B. Detection and Partial Purification of Two Lipases from *Candida rugosa*. *Biotech. Letters* 11 (1989) 345-348.
- Verger, R. and Haas, G.H. Interfacial Enzyme Kinetics of Lipolysis. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 5 (1976) 77-117.
- Walt, J.P. van der and Arx, J.A. von. The Yeast genus *Yarrowia* gen. nov. *Antonie von Leeuwenhoek* 46 (1980) 517-521.
- Welsh, F.W. and Williams, R.B. Lipase Mediated Production of Flavour and Fragrance Esters from Fusel Oil. *J. of Food Science* 54 (1989) 1565-1568.
- Westley, J. *Enzymic Catalysis*. Harper and Row Publishers. U.S.A., 1969.
- Whickerham, J. U.S. Dept. Agr. Tech. Bull. 1029 (1951). Citado por Difco Manual, 1970.
- Willart, S. and Sjostrom, G. The Influence of Sodium Chloride Upon the Hydrolysis of Milk Fat in Milk and Cheese. *Intern. dairy Congr.* 15th, London 3 (1959) 1482-1484.

Wood, W.B., Wilson, J.H., Benbow, R.M. and Hood, L.E. Biochemistry—A Problems Approach. Ed. W.A Benjamin, Inc. U.S.A., 1974

Yarrow, D. Four New Combinations in Yeast. *Antonie von Leeuwenhoek* 38 (1972) 357-360.