

00567
3.
20j

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUÍMICA



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE
MEXICO

MEJORAMIENTO GENETICO DE

Rhizopus delemar

PARA LA PRODUCCION DE LIPASA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIA DE ALIMENTOS

(QUIMICA DE ALIMENTOS)

P R E S E N T A

ZENAIDA PERALTA INGA



MEXICO, D.F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1994



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).

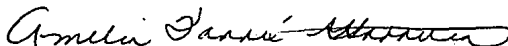
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

JURADO ASIGNADO:

Dr. Hermilo Lara Leal
Dr. Sergio Sánchez Esquivel.
M en B. Rebeca Ramírez Carrillo.
Dr. Guillermo Aguilar Osorio.
M. en C. Sara Solís S.

El presente trabajo fue realizado en la Facultad de Química,
Conjunto E, Departamento de Alimentos y Biotecnología UNAM.

Director de Tesis:


Dra: Amelia Guadalupe Farrés González Saravia.

Sutentante:


Zenaida Peralta Inga.

A mis Padres:

Florentino y Corina.

A mis hermanos:

Delmi, Delia, Maruja, Jorge
Cesar Roberto y Carlos Ivan.

y al Pequeño:

R. Ali.

A Dios, mi Creador:

Por haberme dado la vida y su amor
Por enseñarme a caer y poder levantarme
Por permitirme alcanzar una meta más en mi vida.

A mi Asesora de Tesis Amelia Farres:

Por guiarme en el Conocimiento, por su amistad, y apoyo incondicional

A los miembros Sinodales:

Por sus atinadas sugerencias que permitieron mejorar la presentación de este trabajo.

A la M en B. Rebeca Ramirez Carrillo:

Por sus aportes en la parte estadística de esta tesis.

A mis maestros de la maestría:

Por sus enseñanzas, que han permitido ampliar mis conocimientos y por su amistad.

A mis maestros de licenciatura de la UNPRG. Lambayeque - Perú.

Quienes contribuyeron a mi formación académica y me iniciaron en el camino de la investigación.

A mis amigos y compañeros de maestría y compañeros de laboratorio

Por su amistad y apoyo brindado.

Alicia. R., Ana, M., Blanca, T., Gaby, B., Idalia, F., Juanita, P., Lety, G., Luisa, D., Laura, K., Laura, M., Ma. Eugenia, H., Ma. Luisa, A., Martha, G., Magdalena, A., Mónica, P., Norma, C. Paty, M., Rocio, S., Sara, F., Fabian, C., Antonio, C., Luis, D., Ricardo, P., Rodrigo, R., Salvador, S., Sergio, A., y de manera especial a: Adelfo E., Ismaél, B., Jesús, V., Rodolfo, C., René de los R., y Alicia, M., por su contribución en el diseño de esta tesis.

A mis amigas:

Adeni Fioreze, Herminia Jimenez, Satoko Ishinuma, María de los Angeles y Patricia Aguirre por su amistad y apoyo incondicional, alentándome siempre para seguir adelante.

A Bob Jhonson y la Dra. Ma. Crecer

Por su apoyo y amistad.

A la Fmla. Jimenez Soto, Fmla. Valverde, Fmla. Leal, Alfredo Navarrete, Jacob gonzales, Por su amistad y acogida en este País

A a todas Aquellas personas que de una u otra contribuyeron a la realización de este trabajo e hicieron mi estancia más agradable en esta hermosa tierra Mexicana.

Mis más sinceros agradecimientos.

INDICE

	Página
RESUMEN	1
LISTA DE FIGURAS	2
LISTA DE TABLAS	3
1. INTRODUCCION	4
1.1 Generalidades de enzimas	4
Fuentes de enzimas.	6
1.2 Lipasas	8
1.3 Factores que afectan la producción de enzimas.	13
1.3.1 Factores ambientales	15
Temperatura	15
pH	15
Transferencia de oxígeno	15
agitación	16
1.3.2 Factores nutricionales	16
Fuente de carbono	16
Fuente de nitrógeno	17
Fuente de fósforo	17
Fuente de azufre	17
Otros nutrientes inorgánicos	18
1.3.3 Regulación de enzimas	18
Inducción	18
Represión "Feed back" o retrorepresión	18
Represión por fuente de carbono	19
Regulación catabólica por nitrógeno	19
Regulación por fuente de fósforo	20
Retroinhibición	21
1.4 Mecanismos para mejorar la producción de enzimas	22
Mejoramiento genético	22
Algunas estrategias en la obtención de mutantes	24
Obtención de cepas constitutivas	26
Obtención de cepas resistentes a retrorepresión	26
Obtención de cepas resistentes a represión por fuente de carbono	27
2. JUSTIFICACION	29

3. OBJETIVOS	32
4. MATERIALES Y METODOS	33
Microorganismos	33
Medio de cultivo	33
Suspensión de esporas	33
Preparación de inóculo	33
Condiciones de fermentación	33
Actividad lipolítica	34
Proteína extracelular	34
Biomasa	34
Relación entre el tamaño de halo y la concentración de la enzima	34
Determinación de la variabilidad natural	32
Determinación de la estabilidad	35
Determinación del efecto de los constituyentes del medio de selección.	35
Determinación de sensibilidad a 2 - Desoxiglucosa	36
Condiciones de mutagénesis	36
Condiciones de selección de mutantes.	36
Caracterización de mutantes	36
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
Estandarización del método de selección relación del diámetro del halo con la concentración de la enzima	39
Variabilidad de la cepa	39
Estabilidad de la cepa	42
Establecimiento de las condiciones de selección de mutantes	44
Medio de selección en base sólida	44
Producción en medio líquido.	45
Determinación de la sensibilidad a 2 - desoxiglucosa	47
Mutagénesis	48
Selección de mutantes	48
Caracterización de mutantes	49
Actividad lipolítica	50
Secreción	51
Estabilidad	56
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	59
BIBLIOGRAFIA.	61

FALTA

PAGINA

1

LISTA DE FIGURAS

	Página
Fig. 1 Reacción catalizada por lipasas.	8
Fig. 2 Procedimiento de Mutagénesis y selección.	37
Fig. 3 Procedimiento para la caracterización de mutantes	38
Fig. 4 Relación del diámetro del halo con el logaritmo de concentración de enzima.	40
Fig. 5 Variabilidad de halo de lipólisis de aislados diversos de <i>Rhizopus delemar</i>	42
Fig. 6 Verificación de la estabilidad de producción de lipasa en <i>Rhizopus delemar</i> .	43
Fig. 7 Curva de supervivencia.	49
Fig. 8 Actividad lipolítica en fermentación sumergida con glucosa 1% y aceite de oliva al 2%.	53
Fig. 9 Actividad lipolítica en fermentación sumergida con glucosa 4% y aceite de oliva al 2%	54

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla. 1 Clase de enzimas.	5
Tabla. 2 Algunas enzimas de importancia industrial y su fuentes	7
Tabla. 3 Microorganismos productores de lipasas.	9
Tabla. 4 Fuentes industriales de lipasas.	11
Tabla. 5 Areas de aplicación industrial de las lipasas microbianas	12
Tabla. 6 Patentes que muestran el uso de enzimas lipolíticas en la manufactura o procesamiento de ingredientes en Alimentos.	14
Tabla. 7 Represión por fuente de carbono en enzimas de interés comercial	21
Tabla. 8 Algunos ejemplos de mejoramiento por mutagénesis y selección con luz UV.	26
Tabla. 9 Medios probados en sólido y en fermentación sumergida.	35
Tabla 10 Análisis de estabilidad de la producción de lipasa en la cepa CDBH313 tras siete resiembras	43
Tabla. 11 Efecto de los constituyentes del medio de selección en crecimiento y producción de lipasa en medio sólido.	45
Tabla. 12 Efecto de los constituyentes del medio de selección en crecimiento y actividad enzimática en fermentación sumergida.	46
Tabla. 13 Clasificación de los medios de acuerdo a la prueba de Duncan	46
Tabla. 14 Colonias desarrolladas en medio "D" con 2-desoxiglucosa.	50
Tabla. 15 Diámetro de halo de lipólisis de colonias desarrolladas en 0.1 g/l. de 2-desoxiglucosa	50
Tabla. 16 Colonias probadas en fermentación sumergida	51
Tabla. 17 Actividad lipolítica y Biomasa de las cepas con glucosa al 1% y glucosa al 4%.	52
Tabla 18 Clasificación de las cepas respecto a la actividad lipolítica y biomasa producida en medio con glucosa al 1% y glucosa al 4% de acuerdo a Duncan.	53
Tabla. 19 Fermentación sumergida con glucosa 1%, sin aceite	55
Tabla. 20 Fermentación sumergida con glucosa 4%, sin aceite	56
Tabla. 21 Determinación de proteína extracelular en las cepas mutantes con mayor actividad lipolítica glucosa 1%	56
Tabla. 22 Determinación de proteína extracelular en las cepas mutantes con mayor actividad lipolítica en medio con glucosa 4%	57
Tabla. 23 Estabilidad de la producción de lipasa cepas mutantes medida por halos de lipólisis tras seis resiembras	57
Tabla. 24 Clasificación de cepas mutantes de acuerdo a su estabilidad según Duncan	38

CAPITULO 1

INTRODUCCION

1.1 GENERALIDADES DE ENZIMAS.

La aplicación de enzimas en la industria constituye, sin duda, una de las áreas de mayor impacto en la Biotecnología. La especificidad, eficiencia, condiciones de operación y la gran variedad de reacciones en que intervienen, constituyen el atractivo de las enzimas para su uso en procesos industriales.

Su alta especificidad trae como resultado la síntesis de grandes volúmenes de compuestos con una generación mínima de subproductos. Sus condiciones de operación media de pH, temperatura y presión permiten una reducción potencial del gasto de energía, disminuyendo considerablemente los costos en los procesos (Posorske, 1984). La gran variedad de reacciones que catalizan hacen posible su aplicación en diversas áreas, como la de alimentos, química, farmacéutica, textil, curtiduría, papelería y contaminación ambiental.

En la industria alimentaria el uso de enzimas se remonta a épocas prehistóricas. Nuestros antepasados, aunque ignorando los procesos y practicando un arte más que una ciencia, han explotado las enzimas en actividades como la elaboración de la cerveza, vino, pan, modificación y preservación de alimentos (queso, vinagre, salsa de soya). Se podría decir que ha existido un tipo de simbiosis entre la industria de alimentos y la enzimología, ya que los alimentos ofrecieron un punto de inicio a la enzimología aplicada.

El descubrimiento de Büchner de que el filtrado de extracto de levadura podía catalizar una fermentación, permitió que las enzimas fueran estudiadas *in vitro* y facilitó su purificación, análisis y estudios cinéticos (Chaplin y Bucke, 1990). Posteriormente un sinnúmero de investigaciones con fines específicos se han realizado, habiéndose logrado un gran avance en la aplicación práctica de estos conocimientos, beneficiando significativamente a la tecnología de alimentos en el presente. Además, se ha facilitado el desarrollo y elaboración de una gran variedad de productos, mejorando su calidad y alargando el período de vida de anaquel.

Se estima que existen 25000 diferentes enzimas y de éstas sólo 2100 han sido reconocidas por la Unión Internacional de Bioquímica y se han clasificado dentro de 6 clases de acuerdo a la reacción que catalizan (Neidleman, 1986): como se muestra en la **Tabla 1**.

El mercado mundial de las enzimas se ha estimado en un valor de 625 millones de dólares al año. Cerca del 62% de las enzimas producidas encuentran su aplicación en alimentos, 33% dentro de detergentes y 5% en textiles. Aproximadamente el 80% de las

enzimas producidas a nivel industrial son hidrolíticas y, de éstas, 60% son proteasas, 30% carbohidrasas, 3% lipasas y el resto enzimas especiales (Dziezak, 1991)

TABLA 1. Clases de enzimas

CLASE	FUNCION	NUMERO RECONOCIDO
Hidrolasas	Hidrólisis de enlaces C-C, C-N, C-O	490
Oxireductasas	Oxigenación o adición de un átomo de hidrógeno	537
Isomerasas	Isomerizaciones, racemizaciones	98
Transferasas	Transferencia de grupos acil, azúcar fosforil, metil, aldehídico, cetónico o sulfuro de una molécula a otra	559
Liasas	Adición o formación de C=C, C=O, C=N	231
Ligasas	Formación de enlaces C-C, C-O, C-N con ATP u otros nucleósidos-trifosfatados	83

(Tomado de Neidleman, 1986)

Son varias las aplicaciones de las enzimas en el área de alimentos (Adler-Nissen 1987; Dziezak, 1991; Fellows, 1988; Lopez -Mungia, 1986; Neidleman, 1991; Penet 1991; Holsiger y Kligerman 1991; Posorko, 1984). Las más importantes son:

* En la industria de edulcorantes, para la producción de jarabes fructosados. El proceso involucra el uso de amilasa, amiloglucosidasa, pululanasa y glucosa isomerasa.

* En la industria láctea, para la modificación y elaboración de leches, quesos, cremas, empleando proteasas, lactasas y lipasas.

* En la industria cervecera, para la producción y clarificación de cerveza con amilasas, celulasas, beta-glucanasas y proteasas.

* En la industria de bebidas, pectinasas para la clarificación de jugos de fruta y vinos .

* En la panadería se emplean alfa y beta-amilasas, así como proteasas, para mejorar la calidad de los productos de panadería, en hidrólisis parcial del gluten y retardar el envejecimiento de la harina. Otras enzimas usadas son amiloglucosidasas, glucanasas, fitasas, y lipo-oxigenasas.

* En la producción de aminoácidos, procedimiento el cual demuestra la superioridad de la catálisis enzimática sobre la química, se emplean enzimas como aminoacilasas, aspartasas, fumarasas, triptofanasas, tirosinasas etc.

Esta breve revisión demuestra el impacto de las enzimas en el sector alimentario. Mucho del futuro de la Biotecnología de alimentos puede depender del aprovechamiento racional de las enzimas. Las aplicaciones en el procesamiento de los alimentos pueden extenderse enormemente y revolucionar la producción de alimentos, ahora aún más con el auxilio de la herramienta que constituye la tecnología de DNA recombinante y la ingeniería de proteínas.

El mayor problema que limita el desarrollo de la tecnología enzimática es la baja disponibilidad de las enzimas para aplicaciones en gran escala. Solamente el 10% del total de enzimas conocidas están disponibles comercialmente (Demain, 1990). De ahí que gran parte de los esfuerzos de la investigación en la actualidad están orientados a mejorar las condiciones de producción de estas macromoléculas. Este esfuerzo implica la búsqueda de nuevas fuentes de enzimas, el análisis de los factores ambientales y nutricionales que inciden sobre su producción, el mejoramiento genético tradicional y las técnicas de clonación molecular.

FUENTES DE ENZIMA:

Las enzimas son extraídas de todo tipo de organismos vivos, sean plantas animales o microorganismos. Durante la década pasada se diversificó e incrementó el uso de enzimas de origen microbiano para aplicaciones en las cuales tradicionalmente se empleaban enzimas de plantas y animales. De los cientos de enzimas que están siendo usadas industrialmente más de la mitad son de hongos y levaduras y más de la tercera parte son de bacterias, el 3% de animales y del 1 - 4% de plantas (Chaplin y Bucke, 1990)

Las razones por las cuales se prefiere el uso de células microbianas como fuente de enzimas obedece a que ellas ofrecen ciertas ventajas como:

- a) Las fermentaciones resultan relativamente económicas en gran escala debido a que presentan ciclos cortos de fermentación en medios de producción de bajo costo.
- b) Los cantidades de enzimas son predecibles y controlables.
- c) El abastecimiento es seguro y la composición es constante y ordenada.
- d) Los procedimientos de aislamiento de nuevas cepas son simples, por lo que cientos de cultivos pueden ser examinados en un tiempo razonablemente corto
- e) Especies distintas producen enzimas diferentes que catalizan la misma reacción.

Esta versatilidad explica el hecho que enzimas clásicas sean reemplazadas por otras que ofrecen mejores condiciones de operación.

En la Tabla 2 se presenta algunas enzimas, su aplicación industrial y su fuente de obtención. En la práctica la gran mayoría de enzimas microbianas proceden de un número limitado de géneros por la necesidad de contar con organismos conocidos como seguros (GRAS). La variedad de cepas usadas en la industria se ha incrementado por el empleo de técnicas de mutación y selección (Demain, 1990, Chaplin y Bucke, 1990).

TABLA 2. Algunas enzimas de importancia industrial y sus fuentes

ENZIMA	FUENTE	USO
ANIMALES		
Lipasa	Páncreas	Alimentos
Renina	Abomaso	Queso
Tripsina	Páncreas	Curtiduría
PLANTAS		
α amilasa	Cebada malteada	Cervecería
β amilasa	Cebada malteada	Cervecería
Bromelina	Látex de piña	Cervecería
Papaina	Látex de papaya	Carnes
BACTERIANAS		
α amilasa	<i>Bacillus</i>	Almidón
β amilasa	<i>Bacillus</i>	Almidón
Glucosa isomerasa	<i>Bacillus, Streptomyces</i>	Jarabes fructosados
Proteasas	<i>Bacillus</i>	Detergentes
FUNGALES		
6-Amilasa	<i>Aspergillus</i>	Panadería
Aminoacilasa	<i>Aspergillus</i>	Farmacéutica
Glucoamilasa	<i>Aspergillus, Rhizopus</i>	Almidón
Catalasa	<i>Aspergillus</i>	Alimentos
Celulasa	<i>Trichoderma</i>	Desechos
Dextranasa	<i>Penicillium</i>	Alimentos
Glucosa oxidasa	<i>Aspergillus</i>	Alimentos
Lactasa	<i>Aspergillus</i>	Leche
Lipasa	<i>Rhizopus</i>	Alimentos
Renina	<i>Mucor miehei</i>	Queso
Pectinasa	<i>Aspergillus</i>	Bebidas
Proteasas	<i>Aspergillus</i>	Panadería
LEVADURAS		
Invertasa	<i>Saccharomyces</i>	Confitería
Lactasa	<i>Kluyveromyces</i>	Leche
Lipasa	<i>Candida</i>	Alimentos

(Tomada de Chaplin y Bucke, 1990)

1.2 LIPASAS:

Las glicerol éster hidrolasas (EC, 3.1.1.3) o lipasas se caracterizan por su capacidad de catalizar la hidrólisis de enlaces éster en la interfase entre el sustrato insoluble y la fase acuosa, en la cual la enzima es soluble. Así, las lipasas catalizan preferencialmente la hidrólisis de triglicéridos, aunque pueden hacerlo con una gran variedad de ésteres de ácidos grasos. La longitud y la solubilidad de los ácidos grasos que sirven como sustrato distingue a las lipasas de otras estererasas, las cuales catalizan hidrólisis de ésteres solubles (Macrae, 1983).

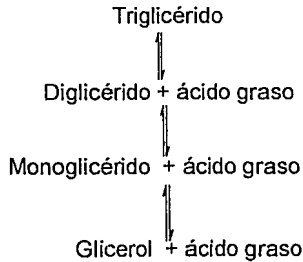


Figura 1: Reacción catalizada por lipasa

(Tomada de Macrae, 1983)

La actividad de las lipasas depende del área de contacto disponible, y es usualmente medida sobre emulsiones con un exceso de superficie, comparando con la cantidad de proteína enzimática presente. No es posible interpretar la medición en la misma forma que para enzimas que actúan sobre sustratos solubles. El porcentaje de hidrólisis puede acelerarse repentinamente ya que los monoglicéridos son uno de los productos de reacción y son también emulsificantes, de manera que queda disponible un área de contacto mayor. El requerimiento de sustratos agregados, en forma de micelas o partículas en emulsión, es importante para las lipasas, pues éstos proveen una interfase para la catálisis.

Las lipasas, están presentes universalmente. Son secretadas por bacterias, hongos, plantas, animales o páncreas humano y están involucradas en procesos anabólicos (Tombs, 1991). En el pasado, la mayoría de los estudios sobre su modo de acción han sido dirigidos hacia las enzimas de los mamíferos, tales como la lipasa pancreática, lipasa lipoproteica y fosfolipasa (Godtfredesen, 1990). Las lipasas de plantas no han tenido muchas aplicaciones comerciales, pero, las lipasas microbianas y animales han sido usadas extensivamente (Kilara, 1985)

Los microorganismos productores de lipasa, que incluyen levaduras, mohos y bacterias, están ampliamente difundidos y han sido materia de varias revisiones (Godtfredesen, 1990, Sugihara, et al., 1989, Vorderwülbecke, et al., 1992). La **Tabla 3** proporciona ejemplos de microorganismos productores de lipasas y la **Tabla 4** presenta las lipasas comúnmente disponibles industrialmente y sus fabricantes.

TABLA 3. Microorganismos Productores de Lipasa

MICROORGANISMO	MICROORGANISMO
<i>Absidia corymbifera</i>	<i>Flavobacterium arborescens</i>
<i>Absidia hyalospora</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	<i>Fusarium solari</i>
<i>Acinetobacter pseudoalcaligenes</i>	<i>Geotrichum candidum</i>
<i>Achromobacter</i> sp.	<i>Humicula grisea</i>
<i>Alcaligenes</i> sp.	<i>Humicula insulens</i>
<i>Alcaligenes dinitrificans</i>	<i>Humicula lamiginosa</i>
<i>Amylomyces rouxi</i>	<i>Lactobacillus</i> sp.
<i>Arthrobacter</i> sp.	<i>Leishmania donovani</i>
<i>Aspergillus awamori</i>	<i>Malbrancheae pulcella</i>
<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Micrococcus freudenreichii</i>
<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Mucor</i> sp.
<i>Aspergillus japonicus</i>	<i>Mucor javanicus</i>
<i>Aspergillus niger</i>	<i>Mucor lypolyticus</i>
<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Mucor miehei</i>
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Mucor pusillus</i>
<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Myxococcus xantus</i>
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	<i>Penicillium crustosum</i>
<i>Candida antarctica</i>	<i>Penicillium cyclopium</i>
<i>Candida auricularia</i>	<i>Penicillium roquefortii</i>
<i>Candida curvata</i>	<i>Phycomyces nitens</i>
<i>Candida cylindraceae</i>	<i>Pichia miso</i>
<i>Candida deformans</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>
<i>Candida foliorum</i>	<i>Propionibacterium granulosum</i>
<i>Candida humicola</i>	<i>Proteus</i> sp.
<i>Candida lipolytica</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.
<i>Candida rugosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Candida tsukubaensis</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>Chaetomiium thermophile</i>	<i>Pseudomonas fragi</i>
<i>Chromobacterium chocolateatum</i>	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>
<i>Chromobacterium viscosum</i>	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
<i>Corynebacterium acnes</i>	<i>Rhizopus</i> sp.

Continuación de la TABLA 3

MICROORGANISMO	MICROORGANISMO
<i>Rhizopus arrhizus</i>	<i>Saccharomyces lipolytica</i>
<i>Rhizopus chinensis</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
<i>Rhizopus delemar</i>	<i>Sporotrichum thermophile</i>
<i>Rhizopus japonicus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Rhizopus microsporus</i>	<i>Staphylococcus carnosus</i>
<i>Rhizopus niveus</i>	<i>Streptococcus lactis</i>
<i>Rhizopus nodosus</i>	<i>Streptomyces coelicolor</i>
<i>Rhizopus oligosporus</i>	<i>Streptomyces fradiae</i>
<i>Rhizopus oryzae</i>	<i>Streptomyces panayensis</i>
<i>Rhodotorula minuta</i>	<i>Talaromyces thermophilus</i>
<i>Rhodotorula pilimonae</i>	<i>Thielavia mino</i>
<i>Saccharomyces fragilis</i>	<i>Torula thermophila</i>

(Tomada de Godtfredesen, 1990)

Muchas de las lipasas conocidas han sido materia de purificación y caracterización, usualmente en relación a su pH, estabilidad, actividad, temperatura y posición específica en hidrólisis de triglicéridos y especificidad de ácidos grasos (Chen y McGill, 1992; Gerhartz, 1990; Hegedus y Khachatourians, 1988; Iwai y Tsujisaka, 1974; Muderhawa et al., 1985; Nahas, 1988; Odera et al., 1986; Yamaguchi, 1991)

Según su especificidad las lipasas microbianas pueden ser divididas en dos grupos:

- 1) No específicas.- liberan ácidos grasos de las tres posiciones del glicerol y por lo tanto catalizan la hidrólisis completa de triglicéridos a ácidos grasos libres y glicerol., aunque, pueden aparecer como intermediarios 1, 2 (2, 3) diglicéridos o 1, 3 diglicéridos y monoglicéridos.
- 2) Específicas.- liberan ácidos grasos solamente de las posiciones 1 y 3 de glicerol. Con estas lipasas el producto de reacción son ácidos grasos libres, 1, 2 (2, 3) diglicéridos y 2-monoglicéridos, los cuales son inestables y por migración acil dan 1, 3-diglicéridos y 1-monoglicéridos, respectivamente (Macrae, 1983).

La especificidad es importante en relación al uso industrial y analítico de las lipasas y ha sido determinado para algunas lipasas en el curso de su caracterización. Así, *Aspergillus niger*, *Rhizopus delemar*, *Mucor miehei* y *Humicola lanuginosa* parecen ser fuentes atractivas de lipasas específicas 1,3, mientras que las lipasas producidas por *Geotrichum candidum* y *Penicillium cyclopium* han mostrado ser inespecíficas posicionalmente. La lipasa de *G. candidum* se ha encontrado preferencialmente adherida a ácidos grasos insaturados en hidrólisis de triglicéridos, mientras que la de *Fusarium*

oxysporum al parecer prefiere adherirse a ácidos grasos saturados (Godtfredesen, 1990; Park et al., 1988).

TABLA 4. Fuentes industriales de lipasas

MICROORGANISMO	FABRICANTE
<i>Achromobacter</i> sp.	Meito Sangyo
<i>Alcaligenes</i> sp.	Meito
<i>Arthrobacter</i> sp.	Sumitoni
<i>Aspergillus niger</i>	Amano, Novo, Röhm,
<i>Candida cylindraceae</i>	Amano, Enzyme Dev.Co, Meito
<i>Chromobacterium viscosum</i>	US Biochemicals, Toyo Jozo,Amano, Novo
<i>Humicola lanuginosa</i>	
<i>Mucor miehei</i>	Amano, Gist, Röhm, Novo
<i>Phycomyces nitens</i>	Takeda
<i>Pseudomonas</i> sp.	Amano
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Amano
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Amano
<i>Rhizopus</i> sp.	Serva, Nagase
<i>Rhizopus arrhizus</i>	Precibio (France) Boehringer-Mannheim Rapidase,Gist-Brocades
<i>Rhizopus delemar</i>	Chemical Dynamics, Tanabe
<i>Rhizopus japonicus</i>	
<i>Rhizopus niveus</i>	Amano, Nagase
<i>Rhizopus oryzae</i>	Osaka Saiken Lab Amano Amano

(Tomado de Godtfredesen, 1990)

Hasta hace unos diez años las lipasas ocupaban sólo una pequeña parte del mercado total de las enzimas, pero recientemente esta situación ha empezado a cambiar con la identificación de nuevas e importantes aplicaciones industriales en el área de la oleoquímica, en la industria de alimentos y bebidas, en la industria farmacéutica y en la química, así como en la hidrólisis de grasas (Linfield et al., 1984^a, Chen y Macgill, 1993), para la síntesis de glicéridos (Ergan et al, 1988 ;Lanfield^b, 1984; Seinoy Uchibori, 1984;) y procesamiento del aceite (y Bati et al., 1984; Koritala et al., 1987; Rattray, 1984; Park,

1988) Según la literatura hay un incremento interesante en la aplicación de lipasas en la síntesis orgánica. En este campo las lipasas son ahora utilizadas experimentalmente para la síntesis de ésteres quirales simples, para la síntesis y producción de bloques quirales y para la esterificación regioselectiva de alcoholes polifuncionales (Miyazawa, 1992).

La aplicación de lipasas como aditivos de detergentes para facilitar la remoción de grasas en los procedimientos de lavado es hoy en día la aplicación que representa un mayor volumen de uso. Por el número y diversidad de aplicaciones enunciadas, existen expectativas de que en un futuro próximo el mercado de enzimas lipolíticas adquirirá mayor importancia.

En la Tabla 5 se presentan las diferentes áreas de aplicación industrial de las lipasas microbianas

TABLA 5. Areas de Aplicación Industrial de las lipasas microbianas.

INDUSTRIA	EFEECTO	PRODUCTO
Alimentos lácteos	Hidrólisis de grasa de leche Maduración de queso	Agentes saborizantes Queso
Panadería	Modificación de mantequilla Mejora el sabor y prolonga la vida media	Mantequilla Productos de panadería
Bebidas	Mejora el aroma	Bebidas
Condimentos	Mejora la calidad	Mayonesas, condimentos
Complementos alimenticios	Transesterificación	Complementos alimenticios
Cárnicos	Desarrollo de sabor y remoción de grasa	Productos cárnicos.
Grasas y aceites	Transesterificación Hidrólisis	Mantequilla de cacao, Margarina Acidos grasos, glicerol, Mono y diglicéridos.
Química	Enantioselectividad	Bloques quirales y químicos
Farmacéutica	Síntesis Transesterificación Hidrólisis	Químicos Lípidos especiales Digestivos
Cosméticos	Síntesis	Emulsificadores y agentes humectantes
Peletera	Hidrólisis	Productos de peletería
Papelera	Hidrólisis	Productos de papel
Limpieza	Hidrólisis	Removedores de limpieza y agentes surfactantes

(Tomado de Godtfredesen, 1990)

En alimentos el uso más extendido de lipasas ha sido la modificación de productos lácteos para obtención de saborizantes y la maduración acelerada de quesos (Chen y Chang, 1993; Arnold et al., 1974; Fox, 1993; Langrand et al., 1988). Sin embargo, el proceso que probablemente tenga mayor trascendencia futura sea la interesterificación de grasas, que genera un cambio en las propiedades físicas como consecuencia de la alteración en las proporciones de ácidos grasos componentes de triglicéridos y de la obtención como producto de reacción fracciones enriquecidas en cierto tipo de ácidos grasos. Se pueden usar lipasas microbianas en vez del sodio metálico para catalizar este proceso. El producto de mayor mercado obtenido de esta manera es un sustituto de manteca de cacao, que funde a 37°C, propiedad que es conferida por la presencia del estearil, oleoil, estearil glicerol (SOS) y palmitoil, oleoil, estearil glicerol (POS) en la grasa (Tombs, 1991). Estos triglicéridos son predominantes en la manteca de cacao. El producto obtenido compite por su precio con el producto del cacao, que alcanza altos precios. Las técnicas de inmovilización pueden contribuir a abaratar aún más el proceso (Kilara, 1985; Rucka y Turkiewicz, 1990).

La caracterización de las propiedades únicas de varias enzimas lipolíticas y el reconocimiento del potencial de sabor de la grasa de leche, resultante de la composición característica de ácidos grasos de cadena corta han conducido al desarrollo de numerosas aplicaciones de lipólisis controlada para generación de sabor. Se ha usado crema parcialmente hidrolizada por adición de lipasas como fuente de ácidos grasos de cadena corta para adición a quesos. En éstos también se han empleado preparaciones crudas de lipasas para intensificar el sabor (Tombs, 1991; Moskowitz y Noelck, 1986) mediante el incremento de los niveles de ácidos grasos libres. Se pueden citar como ejemplos los casos de los quesos Feta, Samsur, Domiati y Cephaloytre Ras (Kilara, 1985). Numerosas patentes involucran aplicaciones de varias enzimas lipolíticas. En la **Tabla 6** se presentan algunos ejemplos.

1. 3 FACTORES QUE AFECTAN LA PRODUCCIÓN DE ENZIMAS

El primer aspecto a considerar en el desarrollo de un sistema de producción de enzimas es, desde luego, la selección de un microorganismo adecuado para el proceso. Precisamente es en este campo donde la biotecnología tiene mayor impacto.

Principalmente se debe tener en cuenta que el microorganismo no sea patógeno; para que su uso sea posible en alimentos. Preferentemente debe ser GRAS (Bernard et al., 1985). Si la enzima es extracelular se facilita su obtención y se evitan problemas en los procesos de purificación a gran escala. La enzima debe ser producida con altos rendimientos, por ello en general el desarrollo de un microorganismo implica algún tipo de mejoramiento. Los costos de producción deben ser razonables, lo que implica que el microorganismo pueda crecer rápidamente y con pocos requerimientos nutricionales. Se prefieren enzimas constitutivas a las que tienen un inductor en el medio tanto por simplificar el proceso como por representar posibles incrementos en costos (Fellows,

1988). Un ejemplo típico es el de producción de glucosa-isomerasa cuyo inductor, la xilosa, es un componente de alto costo.

TABLA 6: Patentes que incluyen el uso de enzimas lipolíticas en la manufactura o procesamiento de ingredientes en alimentos.

APLICACIÓN	PAIS	Nº PATENTE	AÑO
Modificación de grasa en leche	EU	1 966 460	1939
	EU	3 469 933	1969
Uso de queso italiano	EU	2 531 329	1950
	EU	2 794 743	1957
Uso en queso americano	GB	1 326 516	1971
	Canadá	911 248	1971
	Canadá	911 250	1971
	EU	3 650 768	1972
Polvo de enzima modificada de leche	EU	2 531 329	1950
	EU	2 794 743	1957
Lipolizado de leche	EU	2 638 418	1953
Lipolizado de mantequilla de leche Sabor	Japón	3 187/ 70	1970
	GB	1 251 272	1971
	Japón	72-45108	1972
	Canadá	912 905	1971
	EU	3 653 921	1972
Cultivo lipolizado de grasa de leche saborizantes de cremas	EU	3 469 993	1969
	EU	2 965 492	1960
Lipolizado de grasa de leche saborizante de queso azul	EU	3 100 153	1963
	EU	3 072 488	1963
	GB	1 326 516	1971
Lipolizado de grasa de leche similar a queso, uso en yoghurt	EU	3 780 182	1973
	Japón	3107/71	1971

(Tomada de Kilara, 1985)

Esto significa que si se obtiene una buena cepa los parámetros de fermentación deben ser optimizados para lograr un máximo de producción de enzima. Si existe una relación entre la misma y el crecimiento, habrá que lograr las mejores condiciones para producción de biomasa, o detectar la fase de máxima producción de enzima, puesto que el crecimiento microbiano y la formación de producto ocurren en respuesta al medio ambiente (Cooney, 1981). Entre los factores ambientales importantes, se tienen

temperatura, pH, agitación, transferencia de oxígeno, etc. Igualmente importante es la nutrición del microorganismo, especialmente con respecto a las fuentes de carbono, nitrógeno, fósforo, azufre y sales minerales (Weinberg, 1982; Zahner y Kurth, 1982). En ciertos casos debe considerarse también la adición de surfactantes. Estos parámetros deben ser cuidadosamente monitoreados (Stanbury y Whitaker, 1984.) Además de los factores ambientales y nutricionales es extremadamente importante tener en cuenta la regulación genética de la biosíntesis de enzimas. A continuación se analizan con mayor detalle algunos de estos factores.

1.3.1. FACTORES AMBIENTALES QUE AFECTAN LA PRODUCCIÓN DE ENZIMAS

Temperatura.

Es un parámetro de control importante en un proceso de fermentación (Weinberg, 1982). El crecimiento microbiano, así como las reacciones metabólicas, están en función de la temperatura. En general, los microorganismos crecen en un rango de 20 a 50°C. Sin embargo, es importante notar que hay en el medio ambiente microorganismos que crecen a temperaturas abajo de 0°C (*Micrococcus cryophilus* y *Bacillus globisporus*) y el límite superior parece ser de 110°C (*Thermus aquaticus* y *Pyrodictium occultum*) (Neidhart et al., 1990). No es sorprendente que la temperatura afecte la variedad de procesos metabólicos en la célula, ya que la composición macromolecular, especialmente el contenido de RNA, está en función de la temperatura, así como el porcentaje de crecimiento del microorganismo, el que se incrementa lentamente con el aumento de temperatura, hasta que se alcanza un punto máximo, que cae rápidamente con temperaturas superiores. La temperatura también afecta la eficiencia de conversión de sustrato en energía para la masa celular, punto particularmente importante en un proceso de optimización cuando éste involucra crecimiento (Cooney, 1981; Weinberg, 1982). La producción de enzimas no escapa a este efecto. Por ejemplo, la producción de lipasa por *P. caseicolum* es nula a 37° C, con un ligero crecimiento, mientras que a 29°C se produce enzima y crece abundantemente (Cuervo, 1994).

pH

Es necesario un pH óptimo para el crecimiento del microorganismo y para la formación de producto. La mayoría de los microorganismos crecen a un pH cercano al neutro, pero existen extremos como las bacterias lácticas que actúan en fermentaciones ácidas y muchos hongos, especialmente levaduras, son también ácido- tolerantes, con pH de crecimiento alrededor de 3. Habría también que considerar los microorganismos alcalófilos que soportan pH superiores a 7 (Penn, 1990). Durante los procesos de fermentación los microorganismos sintetizan productos metabólicos los cuales pueden cambiar drásticamente el pH del medio. La excesiva producción de ácidos como productos finales, amonio, CO₂ o aminoácidos pueden causar cambios de pH, que a menudo dificultan mantener el medio a un cierto pH (Berry, 1985). Los agentes con capacidad amortiguadora son ampliamente usados en fermentaciones para reducir las

fluctuaciones del pH (Aunstrup et al., 1979). El efecto del pH en producción de enzimas puede ilustrarse con el ejemplo de la producción de lipasa por *Rhizopus delemar*, en el que se produce un incremento de 2.5 veces en fermentaciones con control de pH a lo largo de la fermentación comparado con aquéllas en las que sólo se ajusta al inicio (Martínez y Farrés 1993).

Transferencia de oxígeno.

La mayoría de los procesos de fermentación son aeróbicos y por tanto requieren de provisión de oxígeno, y si no es adecuada limita la productividad de muchas fermentaciones.

Las fermentaciones pueden ser llevadas a cabo en superficie o en medio líquido. El crecimiento en sólido usualmente provee abastecimiento de nutrientes pero puede restringir el intercambio gaseoso. En cultivo sumergido los nutrientes están más disponibles y el medio ambiente puede mantenerse homogéneo por una adecuada agitación. Sin embargo, no todos los sustratos son solubles en soluciones acuosas; el oxígeno, en particular, tiene baja solubilidad en agua. El abasto adecuado dependerá entonces de altos niveles de aereación. En hongos filamentosos la tendencia a formar esferas en medio líquido puede restringir su adecuada aereación. Actualmente la mayoría de fermentaciones se llevan a cabo en medio líquido usando fermentadores en los cuales las condiciones se mantienen bajo control (Bushell, 1989). En el caso de la producción de enzimas y, en particular, de lipasas, no pueden establecerse reglas generales acerca del efecto del oxígeno. Giuseppin (1984) analiza el efecto del mismo sobre la producción de lipasa por *R. delemar*, y encuentran que a bajas concentraciones de oxígeno hay baja concentración de enzima al incidir negativamente sobre el metabolismo fungal.

Agitación.

El tipo de agitación es importante pues repercute en la difusión y concentración de nutrientes al afectar el contacto del microorganismo con el sustrato (Davis y Blevins, 1979) Además, la agitación desempeña un papel importante en la prevención de formación de esferas en fermentaciones fúngicas. La mayoría de los avances recientes en tecnología de fermentaciones ha sido concernientes al diseño de fermentadores que proporcionen un buen grado de homogeneidad y mejoren el abastecimiento de oxígeno. Por lo expuesto anteriormente, esto repercutirá en la formación de enzimas.

1. 3. 2 FACTORES NUTRICIONALES.

La disponibilidad de nutrientes es extremadamente importante en determinar la magnitud del crecimiento y los niveles de producción de metabolitos. Todos los microorganismos requieren de agua, fuente de energía, carbono, nitrógeno, elementos minerales, posiblemente vitaminas, además de oxígeno si son aerobios. Dentro de las células estos componentes son convertidos a través de una serie de vías metabólicas en moléculas complejas que el organismo utiliza para su crecimiento y reproducción. La

mayoría de hongos pueden crecer sobre medios conteniendo una fuente de carbono simple, nitrógeno, fósforo, azufre y elementos traza.

Fuente de carbono

Un abastecimiento adecuado de la fuente de energía y carbono es crítico para el crecimiento y la formación de producto. Las fuentes de carbono más comúnmente utilizadas por los microorganismos son carbohidratos, ácidos grasos, cetoácidos, hidroxiácidos, alcoholes, CO_2 , H_2CO_3 , etc. Todos los sustratos tienen una concentración límite, por encima o por debajo de la cual se puede afectar el crecimiento celular y la biosíntesis de un determinado producto. De allí la importancia de calcular la concentración adecuada y seleccionar la fuente de carbono apropiada para cada proceso, ya que no todas son igualmente metabolizables por los diversos microorganismos. Entre los hongos normalmente se emplean carbohidratos, si bien los ácidos grasos y los ácidos orgánicos son también fácilmente metabolizables. La mayoría de hongos pueden utilizar un rango amplio de monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos, aunque los sistemas de transporte son más eficientes para monosacáridos (Berry, 1985). La selección de fuente de carbono debe realizarse tanto en función del microorganismo como del metabolito a producir pues no se puede predecir cuál fuente de carbono resulta represiva o estimuladora. Ejemplos específicos se encuentran en la tabla 7.

Fuente de nitrógeno.

Como fuente de nitrógeno los microorganismos pueden utilizar: N_2 , NH_3 , NO_2 , NO_3 , diversos aminoácidos como glicina, alanina, serina, cisteína, leucina, tirosina, triptófano, arginina, ácido aspártico, ácido glutámico y otros; además de algunas proteínas. De las formas inorgánicas de nitrógeno, el amonio es la fuente más fácilmente asimilable dado que los constituyentes celulares, tales como aminoácidos, purinas y pirimidinas están al mismo nivel de oxidación. La capacidad del microorganismo para utilizar amonio como única fuente de nitrógeno depende de la presencia de enzimas involucradas en procesos de aminación y transaminación. La asimilación de otras formas inorgánicas de nitrógeno requiere de reacciones enzimáticas adicionales y no todos los organismos las poseen (Gaudy, 1981). La producción de enzimas, particularmente catabólicas, puede ser afectada por la fuente de nitrógeno empleada, como en el caso de las proteasas y de las enzimas involucradas en metabolismo de aminoácidos, por los posibles efectos regulatorios ejercidos, que se detallan más adelante. Una estrategia para evitarlos consiste en la utilización de medios complejos (Demain, 1990).

Fuente de fósforo.

El fosfato se requiere para mantener el equilibrio ácido-base de la célula. El fósforo inorgánico está involucrado en muchas reacciones enzimáticas de la célula fungal. Su concentración en el medio de cultivo puede afectar o favorecer la síntesis de determinados metabolitos secundarios o enzimas. En particular resultan afectadas las

enzimas directamente involucradas con su metabolismo, como la fosfatasa alcalina (Demain, 1990).

Fuente de azufre.

La mayoría de hongos pueden utilizar azufre como sulfato, persulfato y tiosulfato, sulfito y disulfito y en forma orgánica como cisteína y metionina. Los requerimientos de sulfuro en hongos son de muy bajas concentraciones. El posible efecto en la producción de enzimas está poco estudiado pero Demain (1990) cita el efecto de represión por sulfuro en la producción de proteasas, por lo que se obtiene el máximo rendimiento en condiciones de limitación del mismo.

Otros nutrientes inorgánicos.

Los elementos traza K, Fe, Cu, Mn, Mg, Zn, Mo y Ca son esenciales para el crecimiento; mientras que los requerimientos de V, Ni, Sn, Cl, I, Br no lo son, aunque generalmente están presentes en el medio. El papel que desempeñan estos elementos es variado, algunos funcionan como grupos prostéticos de enzimas, como Fe, Cu, Zn, o como activadores de las mismas, Co, Fe y Ca. La presencia o ausencia de éstos ha resultado en efectos dramáticos sobre ciertas fermentaciones fungales, como la producción de ácido cítrico, que es inhibida por el ión Fe, mientras que se ha establecido un requerimiento de Zn para la síntesis de fumarato (Lockwood, 1985). Diferentes mecanismos han sido propuestos para explicar los procesos de estimulación a bajas concentraciones e inhibición por altas cantidades de metal. Por ejemplo, una pequeña cantidad de metal puede igual mejorar la formación de enzimas anabólicas o reprimir la síntesis de enzimas catabólicas y altas cantidades pueden hacer lo contrario, alternativamente una proteína regulatoria puede actuar como mediadora (Weinberg, 1982). Aunque es difícil generalizar, se postula que las sales de Fe y Cu inhiben la producción de lipasas mientras que la de magnesio la incrementan (Hegedus y Khachatourians, 1988). La actividad de las lipasas se incrementa por sales de calcio que precipitan a los ácidos grasos liberados en forma de sales insolubles de calcio (Benzonana, 1968). De igual manera las sales de Na, K, Mg, Mn tienen un efecto favorable para la producción de lipasas (Petrovic et al., 1990).

1. 3. 3 REGULACIÓN DE ENZIMAS

La actividad y producción de enzimas está controlada por importantes patrones de regulación (Bushell, 1989; Demain, 1990; Drew y Wallis. 1985; Gutierrez, et al 1993 Sánchez y Farrés, 1987; Shiiio, 1982; Vanek, et al. 1990; Vining y Chatterjee, 1982;) que finalmente determinan su grado de disponibilidad. A modo de revisión se describirán los más generales: aquéllos que afectan la síntesis de enzimas: inducción, retrorrepresión, represión catabólica y aquéllos que afectan la actividad de las enzimas, como la retroinhibición.

Inducción .

Los genes estructurales que codifican para muchas enzimas están normalmente inactivos en ausencia de sustrato. Cuando se añade un sustrato, el gen estructural se activa y la enzima es producida. Tal proceso se llama inducción o derepresión y la enzima es considerada inducible. Muchas enzimas catabólicas caen dentro de esta categoría (Demain, 1990; Drew y Wallis 1985). El inductor es, generalmente, un sustrato enzimático, aunque en algunos casos puede ser el producto de la reacción. Con frecuencia existen análogos químicos que, si bien pueden inducir, no son atacados por la enzima, y los denominados inductores gratuitos, que a menudo son excelentes inductores. Jacob y Monod (1961) elaboraron un modelo para explicar el fenómeno de la inducción. Dicho modelo fue confirmado años más tarde con los estudios realizados en sistemas *in vitro*. El modelo de sistema de enzimas inducibles más estudiado es el de la lactosa en *E. coli*, el cual ofrece las bases para el modelo de regulación positiva y negativa.

Represión "feedback" o retrorepresión.

Esta consiste en la inhibición de la síntesis de una o varias enzimas de una vía metabólica, como respuesta a la acumulación del producto final de biosíntesis o de un derivado del mismo (correpresor). El aporrepresor es inactivo en ausencia de correpresor e incapaz de unirse al operador. Sin embargo, en presencia de éste se forma un represor activo, el que una vez formado se une con el operador, impidiendo la transcripción por parte de la RNA polimerasa y, por consiguiente, la síntesis de enzima. La retrorepresión es un mecanismo regulador que generalmente está presente en la operación de vías de biosíntesis para metabolitos primarios, como son los aminoácidos, las purinas, las pirimidinas y vitaminas.

Represión por fuente de carbono

Este fenómeno es conocido también como represión catabólica. Es un mecanismo conservativo que protege a la célula del desgaste de su maquinaria de síntesis de proteínas. La célula produce enzimas para catabolizar la fuente de carbono más rápidamente asimilable, mientras que reprime la síntesis de enzimas para la utilización de otros sustratos hasta que el sustrato primario se haya consumido. Esta estrategia permite el aprovechamiento gradual de las fuentes de carbono existentes en base a su facilidad de utilización. El fenómeno de represión catabólica es usualmente causado por glucosa; pero en diferentes organismos pueden provocarlo otras fuentes de carbono fácilmente metabolizables. En bacterias entéricas el fenómeno ha sido caracterizado en forma fina a nivel molecular y éste es mediado por insuficiencia de los niveles intracelulares de 3', 5' monofosfato cíclico de adenosina (cAMP) en una regulación positiva. Este nucleótido tiene un sitio de unión en el promotor, después de adherirse a la proteína específica. (cAMP-Proteína receptora o CRP).

Se carece de información a este nivel de detalle en otros microorganismos. En *Pseudomonas putida* y *P. aureoginosa* donde se ha encontrado cAMP, éste no está

asociado con la represión (Phillips y Mulfinger, 1981). En bacilos la situación no es muy clara, pues *B. subtilis* ha sido considerado incapaz de hacer cAMP, sin embargo, el nucleótido regulador se ha producido bajo condiciones limitantes de oxígeno (Mach et al., 1984). Estudios en *Streptomyces griseus* sugieren que ni el 3', 5' monofosfato cíclico de adenosina (cAMP) ni el 5'-difosfato 3'-difosfato de guanosina (ppGpp) están asociados en la forma esperada como control de mecanismos de represión en la síntesis de antibióticos durante el crecimiento rápido o derrepresión en la síntesis cuando el crecimiento es lento (Vining, 1982).

En hongos se ha considerado que el cAMP no tiene ningún papel en la represión por carbono (Arst y Cove, 1969). Pero, al mismo tiempo, se ha considerado importante en la represión por carbono en levaduras (Dombek e Ingram, 1988). Así por ejemplo el contenido de cAMP en *Saccharomyces fragilis* de células crecidas en lactato fue más alto que en las crecidas en glucosa y el contenido de cAMP en *Saccharomyces cerevisiae* de células crecidas en galactosa fue un 70% más alto que las crecidas en glucosa. Sin embargo, más tarde se mostró que la represión de galactocinasa por glucosa no involucra cAMP. Por otro lado el cAMP estimula la síntesis de galactocinasa en ausencia de glucosa. (Matsumoto et al., 1983). Así el cAMP desempeña un papel en la formación de enzimas en levadura, pero éste es distinto al de represión por fuente de carbono en otros microorganismos (Demain, 1990).

La represión catabólica es particularmente importante cuando se desea producir enzimas a gran escala ya que la glucosa es normalmente la fuente de carbono más asequible en precio y volumen. Un gran número de enzimas con un gran potencial industrial están sujetas a este tipo de regulación. (Arguelles, et al., 1990; Demain, 1982; 1990; Dombek e Ingram, 1988; Khowala y Sengupta, 1992; Lebríhi, et al., 1988; Sánchez y Farrés, 1987; Tsuchiya, y Kimura, 1984) y es reportado para la lipasa de *Rhizopus delemar* por Kawasaki (1991). En la **Tabla 7** se presentan algunas enzimas de interés comercial sujetas a represión por fuente de carbono.

Regulación catabólica por nitrógeno

La represión catabólica puede ejercerse también por la fuente de nitrógeno. Grafe (1982) considera que el fenómeno puede dividirse en control positivo y control negativo. La mayoría de los casos reportados se refieren a efectos sobre el metabolismo secundario, particularmente de aquéllos que contienen precursores derivados de aminoácidos. El nivel y tiempo de adición de los mismos afecta la actividad y la concentración de enzimas durante la idiofase; así como el transporte de precursores y la expresión de genes del metabolismo secundario de regulación general del nitrógeno.

Un gen que controla la represión por fuente de nitrógeno ha sido identificado en *Aspergillus*. El gen codifica para una proteína reguladora que ejerce control positivo sobre la transcripción. La proteína reguladora parece ser activa bajo condiciones de derrepresión (bajo abastecimiento de amonio) e inactiva bajo condiciones represivas (alto

abastecimiento de amonio). El efector intracelular parece ser la glutamina la cual se piensa se une a la proteína regulatoria y disminuye la afinidad de la misma para reconocimiento del nitrógeno. En condiciones limitantes de amonio; la concentración de glutamina podría bajar, y la proteína regulatoria adoptaría una conformación activa, se uniría a los sitios de reconocimiento en los genes estructurales e iniciaría la transcripción (Demain, 1990).

TABLA 7.- Represión por fuente de carbono en enzimas de interés comercial

ENZIMA	MICROORGANISMO	FUENTE DE CARBONO REPRESORA
Proteasa ácida	<i>Aspergillus niger</i>	Glucosa, fructosa, xilosa
α - Amilasa	<i>Bacillus licheniformes</i>	Glucosa, fructosa, maltosa, glicerol, acetato, succinato
β Amilasa	<i>Bacillus megaterium</i>	Glucosa, maltosa.
Celulasa	<i>Trichoderma reesei</i>	Glucosa, glicerol, almidón
Glucoamilasa	<i>Aspergillus niger</i>	Glycero, sorbitol, xilosa fructosa, piruvato, α -cetogluturato.
β -1,3 Glucanasa	<i>Streptomyces</i> sp.	Glucosa, glicerol
β - Glucosidasa	<i>Trichoderma reesei</i>	Glucosa
α -Galactosidasa	<i>Monascus</i> sp.	Glucosa, sacarosa, glicerol
β -Galactosidasa	<i>Escherichia coli</i>	Glucosa
Invertasa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Glucosa, fructosa, manosa
Pectinasa	<i>Acrocyndrium</i> sp.	Glucosa, fructosa, manosa, xilosa, glicerol, malato, α -cetogluturato, piruvato, succinato, fumarato, acetato
Glucosa isomerasa	<i>Streptomyces. phaeochromogenes</i>	Glucosa
Proteasa	<i>Bacillus megaterium</i>	Glucosa
Proteasa ácida	<i>Aspergillus niger</i>	Glucosa, fructosa, xilosa
Aspartasa	<i>Escherichia coli</i>	Glucosa
Penicillin acylasa	<i>Escherichia coli</i>	Glucosa
Triptofanasa	<i>Escherichia coli</i>	Glucosa

(Tomada de Demain, 1990)

Regulación por fuente de fósforo.

La inhibición en la producción de metabolitos por altas concentraciones de fosfato se ha observado en diferentes vías biosintéticas (Drew y Wallis., 1985). Dos mecanismos generales han sido propuestos para explicar este fenómeno; represión o inhibición de las fosfatasa biosintéticas y regulación indirecta vía efectores intracelulares, tales como

adenosina fosfataza. La represión de la biosíntesis de enzimas por fosfato extracelular ha sido reportada para la fosfatasa alcalina (Demain, 1990) y para las enzimas biosintéticas de tetraciclina por Behal et al., (1979). La idea de carga-energética ha sido definida por Atkinson 1969 y la evidencia en contra de esto son los estudios de Curdova et al. en 1976, según señala Bushell (1989)

Retroinhibición.

Es un mecanismo ampliamente distribuido en los sistemas biológicos para modular rápidamente un determinado camino metabólico. En este mecanismo el producto final de una secuencia biosintética inhibe la actividad de una de las primeras enzimas involucradas en la misma. El inhibidor no requiere parecerse al sustrato en tamaño, carga o forma, ya que se une a la enzima en un sitio físico diferente al del sustrato natural. La unión del inhibidor al sitio regulatorio o alostérico provoca un cambio en la estructura tridimensional de la enzima lo cual impide que el sustrato pueda combinarse con la misma. Un ejemplo representativo es la retroinhibición de las dos formas moleculares de la heptulosonato-7-fosfato (primer paso en la biosíntesis de aminoácidos aromáticos) en *Saccharomyces cerevisiae* por los aminoácidos tirosina y fenilalanina (Sánchez y Farrés, 1987). Como puede verse este mecanismo se aplica a vías metabólicas importantes para producir metabolitos primarios, particularmente y afectaría a enzimas comerciales derivadas de estas vías, que en realidad son pocas y estarían relacionadas con producción de aminoácidos.

1. 4. MECANISMOS PARA MEJORAR LA PRODUCCIÓN DE ENZIMAS

Aunque existen diferencias entre los tipos de microorganismos, así como diferencias fundamentales entre procariotes y eucariotes, los mecanismos básicos de la síntesis de enzimas son lo suficientemente similares para permitir un tratamiento general de procesos de producción microbiológica. Sin embargo, las diferencias en cinéticas de producción entre los organismos son tan amplias que hacen necesarios programas de optimización individuales. La complejidad y poca comprensión acerca de los mecanismos de regulación incluye elementos estructurales del sistema regulatorio que conducen a un mejoramiento genético de la cepa, así como a la selección de condiciones ambientales y nutricionales. (Gerhartz, 1990)

En términos cinéticos, la optimización de la síntesis de enzimas significa encontrar el más alto porcentaje de síntesis específica para una cantidad de biomasa dada. La síntesis de enzimas depende del metabolismo primario, pues la maquinaria celular debe estar funcionando todo el tiempo. Por tanto, las condiciones que favorecen la síntesis de enzimas también deben favorecer el crecimiento. La investigación de condiciones óptimas para la síntesis de enzimas podría reducirse a la investigación de:

- 1) condiciones que afectan el crecimiento.
- 2) relación entre el porcentaje de síntesis específica de enzima y el crecimiento, que expresa la actividad metabólica de la célula. (Cooney, 1981)

Las vías metabólicas de metabolismo secundario son más activas después de un máximo de crecimiento del microorganismo. Este se logra cuando hay un abastecimiento adecuado de nutrientes y las vías del metabolismo primario están completamente activas. Se puede producir una reducción en el crecimiento por limitación de algunos nutrientes esenciales, generando el crecimiento no balanceado y desviación de los nutrientes a vías metabólicas no esenciales. El problema de desarrollo de un medio es precisamente encontrar la composición tal que permita que los metabolitos primarios sean usados preferentemente dentro de las vías metabólicas deseadas. (Berry, 1985). Los constituyentes deben satisfacer los requerimientos elementales para la formación de la biomasa celular, la producción de metabolitos y brindar un adecuado abastecimiento de energía para el mantenimiento celular.

El primer paso a considerar en la formulación de un medio, es la relación entre crecimiento y la formación de producto. Así debe ser posible calcular las cantidades mínimas de nutrientes requeridas para producir una cantidad específica de biomasa. Esta debe ser suficiente para producir una cantidad definida de producto. Se realizan cálculos de las concentraciones de sustrato necesarias para producir los rendimientos de productos esperados. Lo anterior implica el conocimiento de la composición elemental (C, H, O, N, S, P, Mg, K) de los microorganismos para realizar el balance de masa. Además debe tenerse en cuenta que algunos componentes del medio puede influenciar la disponibilidad de oxígeno en diversas formas debido, por ejemplo, a la presencia de azúcares fácilmente metabolizables que demandan alto consumo de oxígeno, o bien, alterar la viscosidad final del medio y como consecuencia afectar la transferencia de oxígeno. Finalmente, la presencia de ciertos nutrientes, particularmente proteínas, puede provocar la presencia de espuma, lo que hace necesario el empleo de antiespumantes, muchos de los cuales actúan como agentes surfactantes y reducen el porcentaje de transferencia de oxígeno (Stanbury y Whitaker, 1984). Cuando el abastecimiento de oxígeno llega a ser limitante los microorganismos pueden responder con cambios en su patrón de producción. (Gerhartz, 1990)

Entre los criterios generales que deben tenerse en cuenta en la optimización de un medio pueden señalarse:

1. Producir el máximo rendimiento de producto o biomasa por gramo de sustrato usado.
2. Producir la máxima concentración de producto o biomasa.
3. Permitir el máximo porcentaje de la formación de producto.
4. Generar el mínimo rendimiento de productos no desados.
5. Poseer una calidad consistente, ser barato y de fácil disponibilidad todo el año.
6. Causar problemas mínimos en otros aspectos del proceso de producción, particularmente aireación y agitación, extracción y purificación.
7. Considerar la problemática de escalamiento del laboratorio a planta piloto y subsecuentemente a escala industrial.

Hoy en día el establecimiento de condiciones ambientales y el éxito de una fermentación depende de la disponibilidad de sistemas de control, en el que las computadoras desempeñan un papel importante (Edwards, 1993).

Los criterios anteriores han permitido incrementar la producción de diversas enzimas modificando las condiciones de crecimiento o variando los factores nutricionales. (Demain, 1990; Vanek, Z. et al 1990; Xu, et al 1989; Davis & Calvo, 1977). Además de la manipulación de los factores ambientales y nutricionales es extremadamente importante tener en cuenta la regulación genética de la biosíntesis de enzimas, pues la sobreproducción de metabolitos usualmente ocurre solamente después del rompimiento de algún control regulatorio. Los organismos vivos poseen redes finas de regulación de vías metabólicas para impedir la síntesis excesiva de productos. Por ello, los cultivos deregulados son menos aptos para competir en la naturaleza en contra de otros microorganismos que poseen mecanismos regulatorios normales. Esto está de acuerdo con afirmaciones de diversos autores, quienes describen a los microorganismos mejorados genéticamente como monstruos que sólo pueden sobrevivir bajo condiciones artificiales, o como lisiados a causa de trastornos genéticos (Vanek et al., 1990)

Existen ejemplos de hiperproducción en la naturaleza, los cuales son comercialmente relevantes: *Bacillus thuringiensis* puede sintetizar durante la esporulación una proteína denominada del cristal, que se usa como insecticida, la cual constituye el 20 a 30% del peso seco de un cultivo esporulado. Otro ejemplo es el de *Penicillium notatum* y *Penicillium chrysogenum*. *P. notatum* fue el primer microorganismo productor de penicilinas que se descubrió y fue subsecuentemente reemplazado en procesos comerciales por cepas de *P. chrysogenum*, que naturalmente producen mayores niveles de antibiótico y que fueron mejoradas por varios métodos de mutación y selección que permitieron incrementar la producción de la penicilina y, a la vez, proveyeron varias líneas independientes de cepas mejoradas (Cape et al., 1982).

Se pueden reconocer varios tipos de sobreproducción de productos microbianos:

- 1) Sobreproducción de cepas silvestres creciendo bajo condiciones naturales.
- 2) Sobreproducción de cepas silvestres creciendo con exceso de nutrientes.
- 3) Sobreproducción debido a un insuficiente abastecimiento de nutrientes (moléculas señal, acarreadores, etc.)
- 4) Sobreproducción debido a la presencia de componentes tóxicos o inductores para varios tipos de estrés (ej. metales pesados).
- 5) Sobreproducción fisiopatológica por desórdenes o destrucción de mecanismos regulatorios inducidos en cepas mejoradas genéticamente (Vanek et al, 1990).

MEJORAMIENTO GENETICO

El mejoramiento genético hoy en día representa la mejor opción para alcanzar el objetivo de hiperproducir metabolitos. Las técnicas de mejoramiento genético comúnmente usadas en el laboratorio pueden ser divididas en: mutación y selección,

recombinación en vivo, e ingeniería genética. Las técnicas de recombinación requieren del uso de métodos de intercambio de DNA, tales como: conjugación, transformación, ciclo sexual o la técnica de fusión de protoplastos (Gerhartz, 1990).

Los mecanismos genéticos que controlan la producción de enzimas en cada especie no son totalmente conocidos, lo que lleva a que la mutación-selección sea la técnica preferida en el mejoramiento de cepas (Aunstrup et al, 1979). Con este propósito resulta importante optimizar las condiciones de mutagénesis en términos de dosis y tipo de mutágeno para obtener una máxima frecuencia de mutantes que nos permita hacer una selección. La frecuencia de mutaciones deseadas es baja por la naturaleza aleatoria de la mutación si el método de selección no es suficientemente discriminatorio. Esto se aplica también a la selección de recombinantes. Por ello, se debe tratar a una población elevada para el proceso de mutagénesis o recombinación y la subsecuente selección de las características deseadas, inclusive empleando mecanismos de presión selectiva.

Los mutágenos son clásicamente divididos en de tres tipos: agentes físicos, como la luz ultravioleta y las radiaciones gama; agentes químicos, como el etil metano sulfonato (EMS), Nitrosoguanidina (NTG) y mostazas tales como la ICR170. Finalmente; se emplean agentes biológicos como los virus y transposones.

Mucho más importante que el mutágeno empleado es la distinción del tipo de mutación inducida, la cual depende de dos factores: el tipo de daño causado en el DNA por el mutágeno y la acción de las vías de reparación sobre este daño. La mayoría de mutágenos producen más de un tipo de alteración en el DNA, con diferentes grados de intensidad. Por ejemplo, la luz ultravioleta da una alta proporción de dímeros de pirimidina, mientras las radiaciones ionizantes dan un alto grado de rompimiento de cromosomas, y el EMS y el NTG son agentes alquilantes; sin embargo la luz UV. lejana también puede producir bases hidroxilantes y entrecruzamiento de bandas de DNA. Se debe señalar que los dímeros de pirimidina son la mayor causa letal y de daño mutagénico (Rowlands, 1984).

Las células poseen mecanismos de reparación para lesiones genéticas (Jacobson, 1981; Mullenders et al., 1993). El primer sistema involucrado es la fotoreparación o fotoreactivación, sistema enzimático el cual depende de la luz visible. Un segundo sistema es la reparación-escisión, aplicado principalmente a los dímeros de pirimidina. Ambos mecanismos ocurren antes de la replicación de DNA. Un tercer sistema involucrado es postreplicacional. Las lesiones que escapan a estos sistemas entran en el sistema denominado propenso a errores (error prone), cuyo mecanismo no es muy conocido. Parece actuar como vía alternativa, ya que su inactivación resulta en una variedad de mutaciones, dependiendo del sistema en estudio y se han reportado transiciones, cambios de marco de referencia, deleciones y duplicaciones.

A nivel molecular es difícil predecir que tipo de mutágeno es específico para el mejoramiento de una cepa determinada. En el éxito del tratamiento influyen una variedad de factores, incluyendo las condiciones ambientales bajo las cuales se lleva a cabo la

mutagénesis. A veces es necesario el uso combinado o secuencial de diversos mutágenos con el fin de generar un amplio rango de mutantes para una selección subsecuente. Sin embargo, algunos mutágenos pueden producir daños a nivel cromosomal, denominados aberraciones cromosómicas, mientras que otros, como la luz ultravioleta, generan sólo pequeños cambios estructurales en los genes. Otros factores involucrados en la selección de un mutágeno incluyen la facilidad de manipulación y la seguridad, dado que todos los agentes mutagénicos son potencialmente carcinógenos. En virtud de estos criterios, la luz UV cercana es muy conveniente y se prefiere entre otros mutágenos (Bridges, 1976; Elander 1976). Entre los agentes químicos algunos, como el EMS, son más fáciles de manipular que otros como el NTG, pero el nivel de riesgo de exposición es mayor. Además el NTG tiene una gran desventaja, esta es la tendencia a producir clusters o grupos de mutaciones estrechamente relacionadas, lo que dificulta la caracterización posterior de mutantes, además de que al ser varias lesiones el fenotipo puede ser resultado del efecto aditivo de las mismas.

Entre los procesos donde la mutagénesis con luz UV. ha sido utilizada ampliamente se cuenta el incremento en el rendimiento de varias enzimas y metabolitos de interés industrial. En la Tabla 8 se presentan algunos ejemplos. Estos incrementos pueden lograrse al generar cambios en genes estructurales que repercuten en mayor actividad enzimática o en alteración de péptidos o regiones regulatorias, con el consiguiente mejoramiento de la producción de enzima (Demain, 1990; Jhonston, 1985)

TABLA 8. Algunos ejemplos de mejoramiento por mutagénesis con U.V.

ORGANISMO	PRODUCTO	REFERENCIA
<i>Aspergillus cinnamomeus</i>	Amilasas	Kurushima et al., 1972 *
<i>Aspergillus niger</i>	Acido cítrico	Siechertova, 1969 *
	Glucosa oxidasa	Fiedurek et al., 1986
		Markwell et al., 1989
<i>Cephalosporium aceremonium</i>	Cefalosporina C	Dennen y Carver 1969*
		Matsumura et al., 1982
		Jeffries, 1984
<i>Pachysolen tannophilus</i>	Etanol	Joglekar y Karanth, 1983
<i>Penicillium funiculosum</i>	Celulasa	Elander et al., 1973*
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Penicilina	Boze et al., 1989
<i>Schwanniomyces castelli</i>	Amilasa	Eriksson y Johnsrud, 1983
<i>Sporotrichum pulverulentum</i>	Celulasa	
	β -D-glucosidasa	
<i>Trichoderma reesei</i>	Celulasa	Cuskey et al., 1982

(* Fuente Jhonston, 1985)

A continuación se presenta algunas estrategias generalmente empleadas en la obtención de mutantes específicas para contrarrestar los mecanismos de regulación de enzimas

Obtención de cepas constitutivas.

Se puede eliminar la dependencia de formación de la enzima, a la presencia del inductor. Esto se logra cuando el locus regulatorio está genéticamente modificado para producir un represor no funcional o mediante una mutación en el locus operador que elimina la posibilidad de unión del represor. Si la regulación es positiva, el gen mutado podría ser un activador que no requiere inductor.

Se han diseñado numerosos procedimientos para seleccionar mutantes constitutivos, algunos de los cuales se basan en la supervivencia y crecimiento de mutantes bajo condiciones pobres de inducción. Mientras las células parentales requieren inducción, están en desventaja ante las mutantes debido a la baja utilización del sustrato, por lo que pasan a ser una pequeña proporción de la población. Una estrategia similar puede seguirse para la selección de mutantes afectadas en la utilización de fuentes de carbono (Demain, 1990). Un caso importante entre las enzimas de mayor interés comercial es la glucosa isomerasa y esta estrategia fue empleada por Sánchez y Quinto (1975) para obtener mutantes constitutivos e insensibles a efecto de glucosa.

Obtención de cepas resistentes a retrorepresión.

Entre las estrategias empleadas para contrarrestar este efecto está el limitar la acumulación intracelular de productos finales corepresores. Esto se logra agregando al medio un inhibidor de la vía. Una forma más económica es obtener una mutante auxotrófica, la que generalmente no se reprime por el producto si no que lo requiere para su crecimiento. Otra estrategia consiste en obtener mutantes resistentes a análogos tóxicos del producto final de la vía, las cuales a menudo están alteradas en el nivel de síntesis de enzimas y las producen constitutivamente debido a la modificación del aporepresor o a que éste no se une al corepresor o lo hace en forma poco eficiente. Estos ejemplos, como puede verse, se presentan en vías para la producción de metabolitos primarios o secundarios y difícilmente para la producción de una enzima de valor comercial por sí misma.

Obtención de cepas resistentes a represión por fuente de carbono.

Existen estrategias nutricionales para evitar el efecto, las que consisten en usar fuentes de carbono no represoras, sin problemas de disponibilidad y con costos competitivos. Asimismo, se puede limitar el crecimiento por alimentación controlada de la fuente de carbono represiva e incrementar la producción mediante el uso de inductores gratuitos. Otra forma consiste en transferir el organismo seriamente de una fuente de carbono represiva a otra no represiva, contando con el hecho de que la síntesis de enzimas normalmente reprimidas toma lugar después de un período de tiempo particular que el organismo ha sido transferido seriamente de una fuente a otra.

Las estrategias de selección de mutantes consisten en adicionar un análogo de la fuente de carbono represiva (Matsumura et al., 1982). Uno de los más empleados es la 2-desoxiglucosa (DOG) (Barredo et al., 1988; Boze et al., 1989; Mot y Verachetert, 1987; Maloney et al., 1983; Novak et al., 1990). Las mutantes resultantes generalmente estarán modificadas en la vía catabólica de la glucosa, con la consiguiente disminución en la utilización de la glucosa y derrepresión de un número de enzimas usualmente reprimidas. El método de selección ideal consiste en hacer este tipo de mutación obligatoria para el crecimiento, ya sea para el uso de la fuente de carbono o con la presencia combinada del sustrato y DOG o un antimetabolito de glucosa. Esta poderosa técnica ha sido exitosamente usada en muchos microorganismos. Un ejemplo con resultados interesantes del uso de esta metodología fue el aislamiento de una mutante resistente a glucosa en *Candida wickerhamii* productora de β -glucosidasa (Leclerc et al., 1985). La mutante fue hiperproductora generando 6 a 10 veces más de enzima. Actualmente se pueden emplear mutantes insensibles a represión catabólica para la producción de diversas enzimas: como la glucosa isomerasa, histidasa (Sánchez y Farrés 1987), invertasa, glucoamilasa, maltato deshidrogenasa, glucoamilasa, α amilasa, celulasa y β -glucosidasa (Demain, 1990).

APITULO 2

JUSTIFICACION

La gran variedad de especies microbianas existentes hacen posible encontrar microorganismos productores de una diversidad de enzimas, las cuales tienen un potencial de aplicaciones industriales muy variadas. Los costos y la disponibilidad de enzimas son siempre una limitante de la aplicación en procesos industriales. Los microorganismos son una gran opción para su obtención, pero su producción está controlada por patrones reguladores que determinan su grado de disponibilidad. De ahí que el mejoramiento de una cepa es una parte esencial en el proceso de desarrollo de fermentaciones microbianas como medio de incrementar su productividad y reducción de costos.

La gran aplicación de las lipasas en la industria y en especial en el área de alimentos constituyen un estímulo para el desarrollo de investigaciones dirigidas a la búsqueda de nuevas fuentes enzimáticas, mejoramiento de producción de enzimas existentes y búsqueda de nuevas aplicaciones. Por otro lado, hoy en día con la disponibilidad de tecnologías más sofisticadas, la industria de alimentos se enfrenta al reto de satisfacer las necesidades de una población creciente y cumplir las exigencias de un consumidor que demanda calidad y mejores estándares de vida. La tendencia en todo el mundo a adquirir productos naturales hace indicar que en un futuro cercano los fabricantes de alimentos prefieran el uso de ingredientes naturales.

En este contexto las lipasas ofrecen un potencial para mejorar cuanti y cualitativamente diversos alimentos. Esto podrá realizarse en la medida en que estén disponibles en grandes volúmenes, se encuentre en el mercado variedad en las mismas y se ofrezcan a precios atractivos. El lograr esto dependerá, entre otros factores, del mejoramiento de cepas que permitan la obtención de microorganismos sobreproductores, pues a la fecha las lipasas pueden considerarse como enzimas con volumen reducido de aplicación y alto costo, cuatro veces superior al de proteasas o amilasas.

El grupo de investigación de la Facultad de Química de la UNAM, al cual pertenecemos, mantiene desde hace algún tiempo una línea de investigación en relación a las lipasas producidas por diversas especies de hongos filamentosos, entre los que figura *Rhizopus delemar* cuya ubicación taxonómica es la siguiente.

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

Las investigaciones del grupo están orientadas a mejorar los niveles de producción de enzima, la cual se pretende utilizar en la modificación de productos lácteos. No existen reglas generales que permitan mejorar la producción de lipasas en general, y debe estudiarse cada caso de acuerdo al microorganismo empleado. La fuente de carbono y la concentración de iones como Fe y Mg se han señalado como factores que afectan la producción de lipasas. Asimismo se ha demostrado que la adición de lípidos en el medio incrementa sustancialmente la producción de lipasas para un número de microorganismos (Chander et al., 1977; Chander et al., 1981; Macrae, 1983, Haas, 1993).

En el grupo de trabajo se han realizado estudios de mejoramiento nutricional, que indican que la cepa requiere fuentes nitrogenadas orgánicas, el aceite estimula la producción volumétrica por incremento en crecimiento pero la producción de la enzima es constitutiva y la glucosa ejerce un efecto negativo si es usada como única fuente de carbono (Díaz y Ruiz, 1994; Espinosa, 1990a; Espinosa, et al 1990b; Kawasaki, 1991; Martínez y Farrés 1993). La literatura sobre mejoramiento de condiciones de producción de lipasa en *Rhizopus delemar* es muy escasa. Además de los estudios realizados por el grupo de trabajo Iwai (1966) reporta la producción de la enzima en un medio definido. Estudios posteriores del mismo autor se centran en el papel de los fosfolípidos en interconversión de las tres lipasas que encuentran en el microorganismo (Iwai, 1980). Recientemente, Haas (1993) señala que el glicerol puede constituir una fuente de carbono adecuada para evitar el efecto negativo ejercido por glucosa.

En lo que se refiere a mejoramiento genético sólo hay un reporte acerca de sobreproducción de lipasa por Betz en 1984, quien selecciona cepas hiperproductoras de lipasa en *Rhizopus arrhizus* por citometría de flujo, según señala Queener y Lively (1986). Se han realizado diversos trabajos de mutagénesis dirigida tras la clonación de lipasas de diversos microorganismos, área de trabajo que tiene la atención de diversos grupos industriales, como la compañía Genencor (Poulouse et al., 1988).

En este estudio se pretende realizar un mejoramiento genético de la producción de lipasa en *R. delemar* haciendo uso de la mutagénesis tradicional. La necesidad de incrementar los niveles de producción deriva del hecho de que los niveles de lipasa obtenidos en el laboratorio son doce veces más bajos comparados con muestras de lipasas comerciales, en términos de unidades por miligramo de proteína. Por tanto la obtención de cepas mutantes de *Rhizopus delemar* hiperproductoras y/o derreguladas en la producción de lipasas a través de mejoramiento genético tradicional constituye una necesidad para incrementar los niveles de producción.

Experimentos previos en nuestro grupo de trabajo para selección de mutantes no fueron muy exitosos. La falta de éxito fue atribuida a la variabilidad del microorganismo y al desconocimiento del efecto de los constituyentes del medio de selección en la producción de enzima. Por tanto la primera fase de esta investigación fue dedicada a estudiar la variabilidad, la estabilidad de la producción media de enzima de *Rhizopus delemar* y el efecto de los constituyentes del medio de selección. Una vez establecidas

las condiciones de selección de mutantes se procedió a la mutagénesis, empleando UV como agente mutagénico. Se buscaron tanto colonias hiperproductoras como resistentes al efecto negativo de glucosa. Teniendo en cuenta el éxito obtenido con el uso de 2-desoxiglucosa en diferentes reportes de mejoramiento de producción de enzimas se decidió usar este análogo para la selección de mutantes, previa evaluación de la sensibilidad de la cepa a este químico

CAPITULO 3

OBJETIVOS

1.OBJETIVO GENERAL.

Este trabajo tiene como objetivo la obtención de cepas mejoradas de *Rhizopus delemar* CDBH313 en los niveles de producción de lipasa o insensibles al efecto negativo de glucosa, a través de técnicas de mutagénesis tradicionales.

2. OBJETIVOS PARTICULARES.

- a) Determinar la variabilidad natural de la producción de lipasa en la cepa silvestre de *Rhizopus delemar* .
- b) Determinar la estabilidad de la producción de lipasa en la cepa de *Rhizopus delemar*.
- c) Determinar el efecto de los constituyentes del medio en sólido y en fermentación sumergida en la producción de lipasa.
- d) Determinar la sensibilidad de *Rhizopus delemar* a 2-Desoxiglucosa.
- e) Establecer las condiciones de selección de mutantes hiperproductoras de lipasa.
- f) Establecer las condiciones de mutagénesis empleando luz ultravioleta.
- g) Caracterizar las mutantes obtenidas en términos de actividad lipolítica, resistencia a efecto negativo de glucosa y estabilidad.

CAPITULO 4

MATERIALES Y METODOS.

MICROORGANISMO

Se utilizó la cepa de *R. delemar* CDBH313 proveniente de la colección de cultivos CINVESTAV IPN. La conservación se realizó a 4°C en tubos de agar inclinado con medio agar papa dextrosa (PDA) (Difco Laboratories. Detroit Michigan USA) cubiertos con parafina estéril (Sigma chemical San Louis Mo.) y sellados con Parafilm.

MEDIO DE CULTIVO.

Se usó el medio de cultivo "D" reportado por Celerin & Ferguson (1971) suplementado con casaminoácidos (Difco Laboratories. Detroit Michigan USA) al 1% y tributirina (Sigma Chemical Co., San Louis, Mo.) al 1%. Para medio sólido se agregó agar (Difco Laboratories Detroit Michigan USA) al 1.5%. Cuando se usó aceite de olivo se añadió por separado a cada matraz en una concentración del 2 %.

SUSPENSIÓN DE ESPORAS.

Para la obtención de esporas, se sembró el hongo por picadura en matraces de 250 ml conteniendo 50 ml de medio PDA. Se incubó durante 6 días en una incubadora Gravity Convection Incubator Precision a una temperatura de 29°C hasta esporulación. Todas las demás incubaciones en medio sólido se llevaron a cabo en la misma incubadora.

Las esporas se recolectaron en una mezcla de glicerol/agua (1:1) siguiendo el procedimiento indicado por Kawasaki (1991). La suspensión obtenida se transfirió a tubos de ensayo y se almacenó a 4°C.

PREPARACION DE INÓCULO.

El inóculo para cultivo sumergido consiste en una suspensión de esporas de *R. delemar* con una densidad óptica de 0.06, leída a 540 nm en un espectrofotómetro Spectronic 21 D (Milton Roy) usando como blanco una mezcla de glicerol/agua (1:1).

CONDICIONES DE FERMENTACION.

Las fermentaciones se llevaron a cabo en matraces Erlenmeyer de 250 ml con 50 ml de medio de cultivo y fueron inoculados con 1 ml de una suspensión de esporas ($DO = 0.06$). Se incubaron durante 96 horas a 29°C y 150 rpm en una incubadora de

agitación rotatoria New Brunswick. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y los resultados se presentan como media y desviación estandar.

ACTIVIDAD LIPOLITICA.

La actividad lipolítica en medio sólido se determinó por la producción de halo de claridad en cajas petri conteniendo 15 ml de medio " D " (suplementado con tributirina al 1% y emulsificado en una licuadora a 37°C), después de 72 horas de incubación a 29°C.

En fermentación sumergida la actividad lipolítica de los filtrados libres de células se midió por caída de pH, después de dializar las muestras contra agua destilada durante 24 horas a 4°C, usando un potenciómetro (Orion M 520A) cuyo electrodo fue colocado en un tubo de 30 ml con la solución de trabajo dentro de un baño de control de temperatura (Exacal Neslab instruments U.S.A.) y agitación magnética (stirrer M 4802-00). Se usó una mezcla de solución de tributirina (99 %) (Sigma Chemical Co San Louis Mo.) al 5% (v/v) en agua destilada fría, 0.01% de tween 80 (Canamex S.A. de C.V. México) y una solución buffer tris-maleatos (tris hidroximetil- aminometano p.a. Merck F.R.G.) 5 mM pH 7

Los resultados obtenidos se compararon con una curva patrón de ácido butírico al 5%. Se obtienen valores de actividad en micromoles de ácido butírico liberados por minuto con un mililitro de enzima (Menassa 1982). Se define como una unidad de actividad a la cantidad de enzima que libera una micromol de ácido butírico en un minuto de reacción bajo las condiciones señaladas por Menassa y Lamberet en 1982, reportado por Espinosa et al. (1990).

PROTEINA EXTRACELULAR.

Fue cuantificada usando el método de Lowry (1951), después de dializar las muestras contra agua destilada durante 24 horas a una temperatura de 4°C. La lectura se realizó a 590 nm y los resultados obtenidos se compararon con una curva patrón de Albúmina (500 µg/ml)

BIOMASA

La biomasa fue cuantificada por peso seco. Después de filtrar las muestras de fermentación en sistema millipore, usando papel filtro Whatman Nº 1 a peso constante, la biomasa fue colocada en una estufa a 60°C por 24 horas, transcurrido este tiempo se pesaron las muestras y la biomas fue calculada por diferencia de peso.

RELACION ENTRE EL TAMAÑO DE HALO Y LA CONCENTRACION DE ENZIMA.

Se aplicaron 5, 10 , 15 y 25 µl de enzima comercial Amano a una concentración de 1.4 U/ml en círculos de papel de filtro Whatman Nº 1 de 0.5 cm de diámetro, sobre

medio de agar con tributirina. Se incubó a 29°C. Después de 72 horas se midió el diámetro de halo y se estableció la relación del mismo con la concentración de enzima.

DETERMINACION DE LA VARIABILIDAD

Se sembró *R. delemar* en cajas petri conteniendo 15 ml de medio " D " con tributirina 1% y desoxicolato de sodio 0.3 g/l. Después de 72 horas de incubación a 29°C se midió el halo de 500 colonias, y se estableció la frecuencia de tamaño de halos de la población. El valor del halo se obtuvo por diferencia entre el diámetro total y el diámetro de la colonia.

DETERMINACION DE LA ESTABILIDAD

Se realizaron resiembras sucesivas de *R. delemar* cada diez días por 7 veces consecutivas, en medio PDA y conservando la cepa a temperatura ambiente. Las fermentaciones y medida de actividad lipolítica se llevaron a cabo bajo las condiciones ya mencionadas.

DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LOS CONTITUYENTES DEL MEDIO DE SELECCIÓN

Teniendo como base el medio " D " suplementado con aminoácidos se diseñaron 6 diferentes medios (Tabla 9) en los que se alternaron la fuente de carbono, tributirina al 1%; el inhibidor, desoxicolato de sodio 0.3 g/l (Sigma Chemical Co., San Louis, Mo.) y el estimulador, aceite de oliva al 2% (Formex Ybarra, S.A. DE C.V. México). Se probaron en sólido y en fermentación sumergida.

En medio sólido la actividad fue determinada a las 72 horas de incubación a 29°C y en fermentación sumergida a las 96 horas bajo las condiciones ya señaladas.

TABLA 9: Medios probados en sólido y en fermentación sumergida

MEDIOS	FUENTE DE CARBONO Tributirina	INHIBIDOR Desoxicolato de sodio	ESTIMULADOR Aceite de oliva
1	+	+	+
2	+	-	+
3	+	-	-
4	+	+	-
5	-	-	+
6	-	+	+

SENSIBILIDAD DE *Rhizopus delemar* A 2- DESOXIGLUCOSA.

Se plaqueó una suspensión de 1×10^7 esporas / ml de *Rhizopus delemar* en medio "D" con desoxiglucosa a tres diferentes niveles de concentración: 0.01, 0.05 y 0.1 gr/l para determinar el grado de sensibilidad de la cepa a este químico.

MUTAGENESIS.

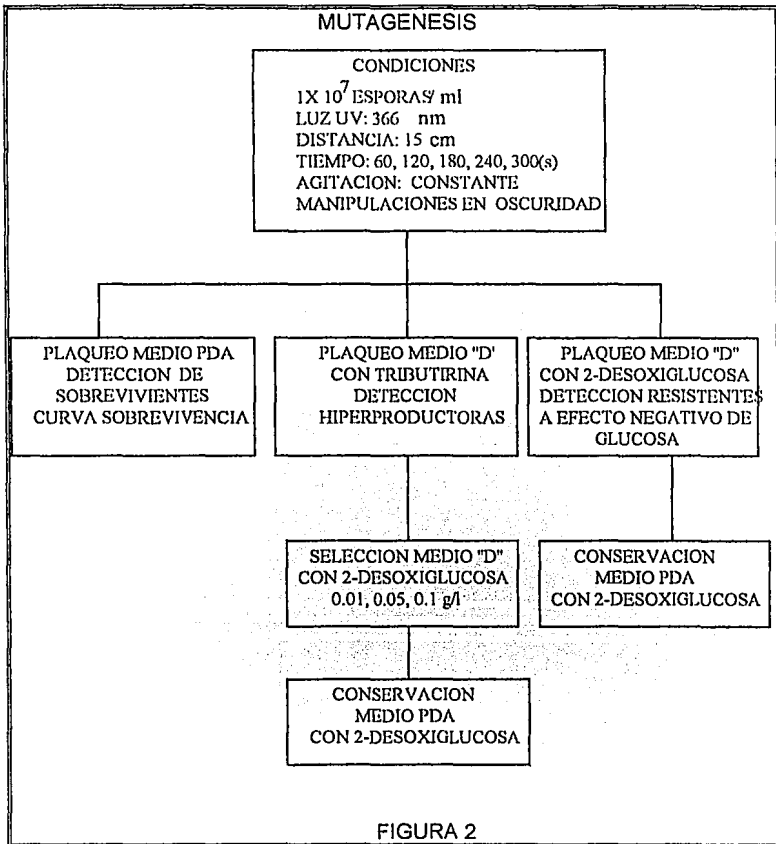
10 ml de una suspensión de esporas con una concentración de 1×10^7 esporas / ml., sobre una caja petri bajo agitación constante, se expusieron a la acción de la luz ultravioleta de una lámpara manual (UVP, INC. modelo UVL- 21) de 366 nm de longitud de onda, a una distancia de 15 cm. Se tomaron muestras de 1 ml cada 60 segundos por 5 minutos y se realizaron las respectivas diluciones para evaluar sobrevivencia en medio PDA. Las muestras originales se conservaron a 4°C. Todas las manipulaciones se realizaron bajo una campana de flujo laminar y en completa oscuridad. Las cajas petri para determinar el número de sobrevivientes fueron cubiertas con papel aluminio e incubadas a una temperatura de 29°C +/- 1°C durante 72 horas. En la **Figura 2** se presenta el procedimiento seguido en el proceso de mutagénesis

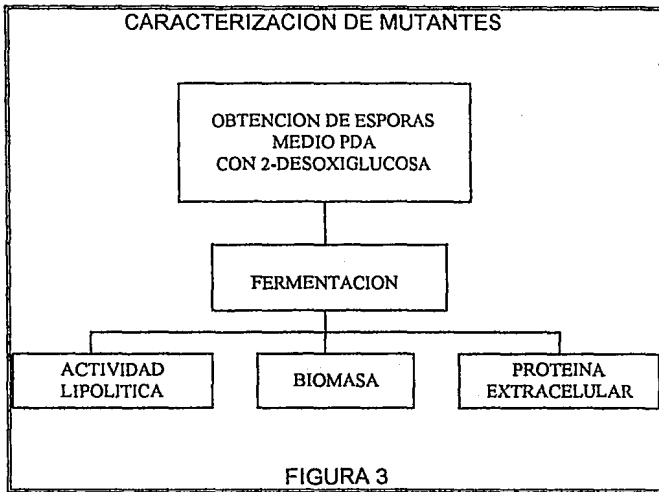
CONDICIONES DE SELECCION DE MUTANTES

Las mutantes se seleccionaron por su capacidad de producir halos de claridad sobre medio "D" con tributirina emulsificada como única fuente de carbono y tomando como nivel base el mayor tamaño de halo encontrado en la población no mutagenizada. Con el propósito de detectar mutantes resistentes al efecto negativo de glucosa, las colonias fueron después plaqueadas en medio conteniendo tributirina y 2-desoxiglucosa a tres diferentes niveles de concentración 0.01, 0.05 y 0.1 g/l. Un plaqueo directo en este medio de selección usando la concentración de 0.1 g/l fue también realizado. Las cajas petri fueron cubiertas con papel aluminio e incubadas a una temperatura de 29°C +/- 1°C durante 72 horas. en medio "D" y durante 84 horas en medio con 2-desoxiglucosa. La **Figura 2** muestra el procedimiento seguido en el proceso de mutagénesis y selección.

CARACTERIZACION DE MUTANTES.

Después de crecer las cepas en medio PDA con 2-desoxiglucosa durante 6 días a 29°C hasta esporulación se obtuvo una suspensión de esporas y las fermentaciones se llevaron a cabo en la condiciones ya señaladas. Se determinaron la actividad lipolítica, biomasa y proteína extracelular. La **Figura 3** presenta el procedimiento realizado para la caracterización de mutantes.





CAPITULO 5

RESULTADOS Y DISCUSION

ESTANDARIZACION DEL METODO DE SELECCION. RELACION DEL DIAMETRO DE HALO CON LA CONCENTRACION DE LA ENZIMA.

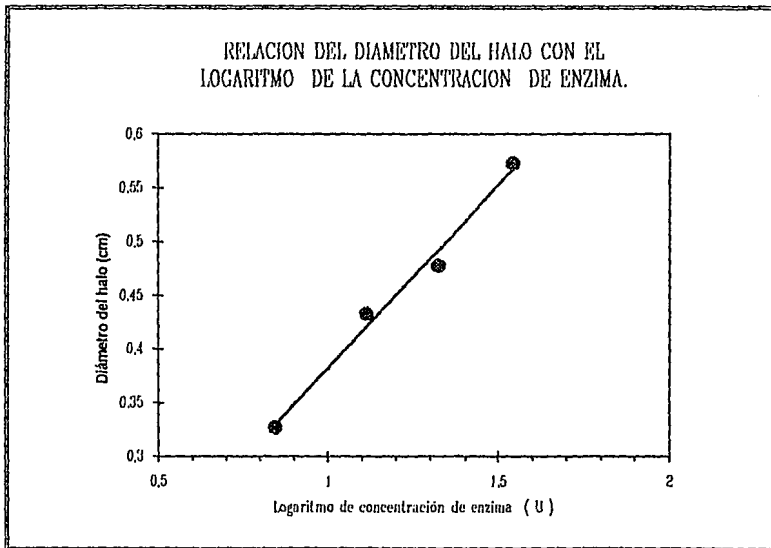
Una de las técnicas que permite identificar microorganismos lipolíticos en medio sólido es la técnica de difusión radial, la cual se fundamenta en la difusión de la enzima en agar emulsificado con tributirina. Al actuar la enzima y romper el triglicérido genera halos de claridad alrededor de las colonias productoras de la misma (Fox, 1983). Con el propósito de establecer un parámetro indicador de actividad que pudiera facilitar la selección de cepas hiperproductoras de lipasa en *Rhizopus delemar*, el primer paso en el desarrollo de este trabajo consistió en determinar la relación existente entre el diámetro del halo y la concentración de la enzima (en relación a volumen). Para esto, círculos de papel filtro, según se describe en materiales y métodos, impregnados con 5, 10, 15 y 25 μ l de enzima comercial (1.4 U/ μ l) se incubaron sobre medio con tributirina. Después de 72 horas se midieron los halos de claridad producidos y se relacionaron con el logaritmo de concentración de la enzima, determinándose de este modo la relación existente entre el diámetro del halo y la concentración de la enzima. La relación obtenida se presenta en **Figura 4**.

Los resultados muestran que existe una correlación lineal entre el halo de claridad producido y la concentración de enzima, lo que indicaría que a mayor diámetro de halo hay mayor actividad. Sin embargo, no es posible determinar valores en unidades a partir de mediciones de halo. Esto puede deberse a que factores como la difusión de la enzima pueden influir en la extensión de la zona de claridad, ya que la actividad de las lipasas no sólo depende de la concentración de la enzima, sino también del área en contacto entre la enzima y el sustrato. Por lo que en el presente trabajo los valores de actividad se expresan en función de diámetro de halo cuando así se midieron y sólo se expresarán en términos de unidades cuando se evaluó la actividad por el método de caída de pH. La medición de diámetro de halo se empleará para analizar a las colonias en términos de variabilidad y estabilidad, pues, permite evaluar un gran número de colonias con facilidad y economía. La técnica de caída de pH se empleará para determinar los valores de actividad en unidades internacionales en muestras provenientes de fermentación sumergida.

VARIABILIDAD DE LA CEPA:

La producción de metabolitos microbianos presentan normalmente variabilidad y es importante establecer los valores extremos que se presentan en una población para reconocer cepas hiperproductoras. En virtud de lo anterior el siguiente paso en el desarrollo del presente trabajo consistió en determinar el grado de variabilidad para

lipasa de *Rhizopus delemar*. Para ello se plaqueó una suspensión de esporas sobre medio de agar con tributirina y se midieron los halos de claridad de 500 colonias.



La relación lineal descrita en esta figura muestra una pendiente de 0.041803729, una ordenada al origen de 0.340680845 y un coeficiente de correlación de $r = 0.994046098$.

FIGURA 4

La población tuvo una distribución normal, en donde la mayoría de colonias produjeron halos de 0.5 -0.6 cm, el 33% alcanzó 0.6 cm. y menos del 5% presentaron halos de claridad de 0.8 cm. La distribución se muestra en la Figura 5.

Como se puede observar existe gran variabilidad en la producción de lipasa, en este microorganismo, ya que los valores máximos tienen una magnitud del doble al de los mínimos detectados con esta metodología. Este problema ya ha sido señalado para la manipulación de este organismo (Espinosa, comunicación personal). Entre los hongos suele presentarse una alta variabilidad por la coexistencia en una población de elementos con diferentes características genéticas, producto de segregación y recombinación mitótica, por lo que los niveles de producción de un metabolito no son discretos, sino que siguen un patrón de distribución generalmente normal. Esta variación no está restringida a aislamientos naturales sino también alcanza los obtenidos en tratamientos mutagénicos y en procesos de recombinación. Existen pocos casos de hongos en los que existan estudios de niveles de variación genética y entre ellos destaca *Neurospora crassa*, *Aspergillus nidulans* y *Schizophyllum commune*, en los que se han analizado

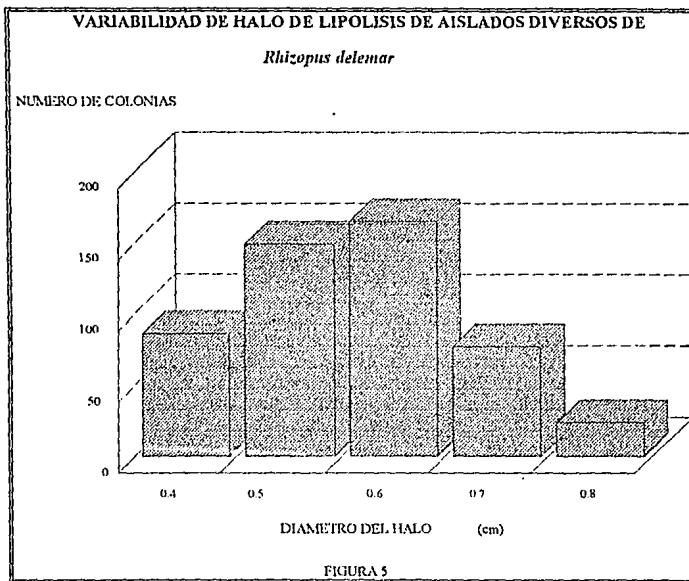
fenómenos como crecimiento y tiempo de fructificación (Catten, 1979). Un ejemplo adicional es reportado por Cotty et al. (1990), quienes usaron el mismo método empleado en este trabajo, es decir medida de halos de claridad alrededor de la colonia, para determinar la producción de poligalacturonasa en diferentes cepas de *Aspergillus flavus* aisladas como contaminantes agrícolas. Ellos encontraron una alta variación en la producción de enzimas entre aislamientos, pues de 87 aislamientos probados 15 no produjeron poligalacturonasa o, si se ésta se produjo, no fue detectada en los límites de sensibilidad del ensayo. La producción de la misma, como en el caso de este trabajo, presenta una distribución normal y hay una variación ligeramente superior al 100% entre el valor mínimo y el máximo. Estos autores señalan que la presencia o ausencia de la enzima y la consiguiente variación en la producción de la misma son resultado de una adaptación ecológica, al provenir de diferentes sitios y poseer otras características igualmente variables.

La diversidad de una población puede desarrollarse a través de largos períodos de una coevolución con fuentes específicas de nutrientes. Esta diversidad puede también estar vinculada con la variación en el número de genes que determinan la actividad. Este hecho es ejemplificado por Wagner et al., (1988) quienes investigaron la variabilidad genética de la actividad de la glutamato deshidrogenasa en micelio monocariótico y dicariótico del hongo *Hebeloma cylindrosporum* con el intento de establecer si esta actividad podría ser usada como base de selección en un programa que pretende detectar cepas o micelio que muestren mejoramiento en la asimilación de nitrógeno. Ellos encontraron que alta variabilidad en la población estudiada, en donde los niveles más altos superan en diez veces a los más bajos, y los niveles de actividad dependían del hecho de que el micelio fuese mono o dicariótico, pues los dicarióticos mostraron un promedio de 3 veces más actividad que los monocarióticos.

La coincidencia entre estos resultados y los obtenidos por este grupo de trabajo permite concluir que a pesar de la variabilidad presente se puede establecer un límite para selección de hiperproductoras de lipasa sobre el mayor halo encontrado 0.8 cm en una población normal.

La diversidad de una población puede desarrollarse a través de largos períodos de una coevolución con fuentes específicas de nutrientes. Esta diversidad puede también estar vinculada con la variación en el número de genes que determinan la actividad. Este hecho es ejemplificado por Wagner et al., (1988) quienes investigaron la variabilidad genética de la actividad de la glutamato deshidrogenasa en micelio monocariótico y dicariótico del hongo *Hebeloma cylindrosporum* con el intento de establecer si esta actividad podría ser usada como base de selección en un programa que pretende detectar cepas o micelio que muestren mejoramiento en la asimilación de nitrógeno. Ellos encontraron que alta variabilidad en la población estudiada, en donde los niveles más altos superan en diez veces a los más bajos, y los niveles de actividad dependían del hecho de que el micelio fuese mono o dicariótico, pues los dicarióticos mostraron un promedio de 3 veces más actividad que los monocarióticos.

La coincidencia entre estos resultados y los obtenidos por este grupo de trabajo permite concluir que a pesar de la variabilidad presente se puede establecer un límite para selección de hiperproductoras de lipasa sobre el mayor halo encontrado 0.8 cm en una población normal.



ESTABILIDAD DE LA CEPA

El valor determinado en la etapa anterior puede ser irrelevante si la cepa presenta pérdida de la capacidad de producción de enzima tras una serie de transferencias. Por tanto, resultaba fundamental evaluar la estabilidad de la cepa. Para ello se realizaron resiembras y fermentaciones de *Rhizopus delemar* por 7 veces consecutivas cada 10 días a fin de establecer el grado de variación en la producción de enzima. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 6

Un análisis estadístico de los datos demuestran que existe diferencia altamente significativa entre la actividad lipolítica de las diferentes resiembras. La prueba de Duncan indica que en las resiembras 2 y 4 es donde se obtiene la mayor actividad lipolítica, en las resiembras 3, 5 es menor, en la resiembra 1 es más baja que en éstas y las resiembras 6 y 7 son las que presentan la menor actividad lipolítica entre todas ellas. Los valores promedio de actividad con sus respectiva desviación estándar para cada

resiembra y la separación de medias de acuerdo a la prueba de Duncan se muestran en la Tabla 10.

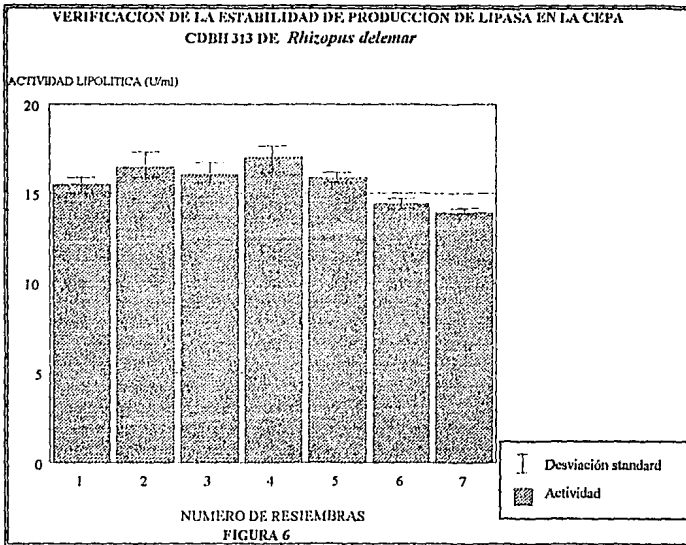


TABLA 10. Análisis de estabilidad de la producción de lipasa en la cepa CDBH313 de *R. delemar* tras siete resiembras

RESIEMBRA	ACTIVIDAD LIPOLITICA (U/ml)		CLASIFICACION DUNCAN
	Media	σ	
1	15.42 ±	0.43	b
2	16.46 ±	0.76	d
3	16.07 ±	0.60	c
4	17.05 ±	0.78	d
5	15.78 ±	0.33	c
6	14.43 ±	0.28	a
7	13.95 ±	0.16	a

Letras diferentes indican diferencia significativa al 5% de significancia

Los resultados indican que hay una tendencia hacia la disminución de la actividad enzimática, particularmente después de la quinta resiembra. Los niveles sólo son menores en 10% del valor inicial. Estos niveles son inferiores al rango de variación mostrado por colonias aisladas en forma independiente para verificar la variabilidad natural de la cepa. El nivel de pérdida de capacidad de producción de enzima es menor comparado con los resultados obtenidos por otros autores, como en el estudio realizado por Künkel et al (1992) sobre la inestabilidad genética de la cepa industrial de *Penicillium chrisogenum* donde se determinó un descenso marcado en la producción de penicilina tras seis resiembras, el cual fue acompañado de un incremento de la capacidad de esporulación, observación que coincide con el comportamiento de *R. delemar*. También reportan una disminución en el contenido de DNA en las segregantes bajas productoras dato que se deberá estudiar para *R. delemar*. Un estudio molecular y cromosómico de la población se podría realizar haciendo uso de técnicas como electroforesis en pulso y determinación de cariotipos moleculares, para determinar estado ploidía y número de copias de gen.

ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES DE SELECCIÓN DE MUTANTES

EFFECTO DE LOS CONSTITUYENTES DEL MEDIO DE SELECCION SOBRE LA PRODUCCION DE LIPASA:

Estudios previos realizados por el grupo de trabajo (Espinosa, 1990) indicaron que a pesar de la relación mostrada entre el diámetro de halo de claridad y actividad enzimática, mutantes seleccionadas con este criterio no se comportaron como tales al cultivarse en fermentación sumergida. La oxigenación y los constituyentes del medio de selección pudieran ser factores limitantes en la selección de mutantes de *Rhizopus delemar* hiperproductoras de lipasa para fermentación sumergida, por ello el efecto de la tributirina, desoxicolato de sodio y aceite de oliva sobre la producción de lipasa fue evaluada, para esto se diseñaron seis medios de cultivo con presencia y ausencia de los diferentes componentes y se probaron tanto en medio sólido como en fermentación sumergida, para tratar de esclarecer el fenómeno.

MEDIO DE SELECCION EN BASE SOLIDA

Se seleccionaron estos tres componentes pues la tributirina y el aceite de oliva son fuentes lipolíticas generalmente usadas para detección de microorganismos lipolíticos que permiten la identificación de colonias productoras por generación de halos de claridad alrededor de las mismas. Por otro lado, *Rhizopus* requiere el uso de inhibidores para limitar su crecimiento y evitar la expansión de las colonias (Espinosa, 1990) ya que es un hongo filamentosos y, como tal, su desarrollo en el medio es exuberante y muy extendido; el desoxicolato de sodio cumple con esta función.

Los resultados obtenidos en medio sólido se presentan en la **Tabla 11**. Como podemos observar en la tabla, el mejor medio para nuestro propósito fue el que contiene

tributirina y desoxicolato de sodio porque permite obtener colonias separadas y apreciar más nitidamente el halo de actividad.

Los medios anteriores no contenían glucosa, componente usual en el medio empleado en fermentación sumergida, por lo que también se probaron las combinaciones anteriores con adición de glucosa al 1% y al 4%. Los resultados fueron similares a los obtenidos en su ausencia, y solamente variaron en la proporción de crecimiento del micelio pues con glucosa al 4% es muy abundante. El halo de actividad siempre se visualiza mejor en el medio que contiene tributirina y desoxicolato de sodio.

Para tratar de obtener mejor resolución se variaron los niveles de desoxicolato de sodio, manteniendo el nivel de aceite de oliva y glucosa al 1%. Se logró visualizar un halo definido, pero opaco, usando el doble de concentración de desoxicolato de sodio, por lo ya no se usaron concentraciones mayores.

TABLA 11. Efecto de los constituyentes del medio de selección sobre el crecimiento y producción relativa de lipasa en medio sólido

MEDIO	COMPONENTES			CRECIMIENTO	HALO
	T	D	A.O		
1	+	+	+	COLONIAS UN TANTO SEPARADAS, BUEN DESARROLLO DEL MICELIO	NO SE OBSERVA
2	+	-	+	COLONIAS MUY JUNTAS A VECES SUPERPUESTAS, EL DESRROLLO DE DEL MICELIO MENOR QUE EN 1	NO SE OBSERVA
3	+	-	-	COLONIAS JUNTAS, POCO DESARROLO DEL MICELIO	CLARO . PERO IRREGULAR.
4	+	+	-	COLONIAS SEPARADAS, POCO DESARROLLO DEL MICELIO	BIEN DEFINIDO.
5	-	-	+	COLONIAS JUNTAS DESARROLLO MICELIAL ABUNDANTE	NO SE OBSERVA
6	-	+	+	COLONIAS MUY JUNTAS DSARROLLO DEL MICELIO ABUNDANTE MENOS QUE EN 5	NO SE OBSERVA

(T = TRIBUTIRINA, D = DESOXICOLATO DE Na, A.O = ACEITE DE OLIVA).

PRODUCCION EN MEDIO LIQUIDO.

Los mismos medios probados en agar fueron evaluados en cuanto a su producción en fermentación sumergida, los promedios de actividad lipolítica y biomasa con sus respectivas desviaciones estándares, así como la actividad lipolítica específica en cada medio se presenta en la *Tabla 12*.

Al realizar el análisis estadístico de los datos se encontró que existe diferencia altamente significativa en la actividad lipolítica producida en los diferentes medios así como en la cantidad de biomasa presentada en cada caso. La prueba de Duncan (Tabla 13) separa a los medios en cuatro grupos, según la actividad producida en ellos, en los medios 3 y 4 se obtiene la menor actividad lipolítica, en los medios 1 y 2 es mejor a los anteriores, le siguen en cantidad el medio 5, y la mayor actividad es producida en el medio 6. Cuando se analizó los medios con respecto a la biomasa producida en ellos Duncan los clasificó en tres grupos, igual que para actividad los medios 3 y 4 es donde se obtuvo menos biomasa, le siguen a estos los medios 1 y 2 y donde se produce la mayor cantidad de biomasa son los medios 5 y 6.

TABLA 12. Efecto de los constituyentes del medio de selección en crecimiento y actividad enzimática en fermentación sumergida.

MEDIO	COMPONENTES T D A.o	ACTIVIDAD LPOLITICA (U/ml)	BIOMASA (mg/ ml.)	ACTIVIDAD LPOLITICA ESPECIFICA (U/mg)
1	+ + +	10.80 ± 0.97	0.83 ± 0.08	13.01
2	+ - +	9.81 ± 1.0	1.33 ± 0.15	7.38
3	+ - -	7.30 ± 0.44	0.41 ± 0.07	17.80
4	+ + -	7.78 ± 0.58	0.46 ± 0.08	16.91
5	- - +	14.63 ± 0.43	15.36 ± 0.06	0.95
6	- + +	16.51 ± 0.42	14.87 ± 0.60	1.11

(T = TRIBUTIRINA, D= DESOXICOLATO DE NA, A.O. = ACEITE DE OLIVA).

TABLA 13. Clasificación de medios de acuerdo a la prueba de Duncan

MEDIOS	CLASIFICACION DE ACUERDO A DUNCAN	
	ACTIVIDAD	BIOMASA
1	b	b
2	b	b
3	a	a
4	a	a
5	c	c
6	d	c

Letras diferentes indican diferencia significativa al 5% de significancia.

De acuerdo con ésto los mejores medios respecto a la actividad lipolítica y biomasa obtenida en ellos son los medios que no contienen tributirina, pero si aceite de oliva (medios 5 y 6). Estos resultados muestran que la tributirina no es efector positivo de la producción volumétrica de lipasa, como lo es el aceite de oliva. Por el contrario, parece afectar de manera notable y negativa el crecimiento, lo que repercute en una alta producción específica. Este efecto negativo de la tributirina podría representar problemas en la selección de mutantes, pues pudieran seleccionarse aquellas resistentes al posible efecto tóxico de la misma pero no hiperproductoras de enzima. El incremento sustancial en la formación de lipasa por adición de triglicéridos o aceites ya ha sido señalado para microorganismos: como *Candida parapolitytica* y *Rhizopus japonicus* (Macrae 1983) y también ha sido reportado para la lipasa de *Rhizopus delemar* (Espinosa et al (1990).

Como podemos apreciar al comparar las condiciones en que aparece el desoxicolato de sodio independientemente de la fuente de lípidos, en los valores mostrados en la tabla; se observa que el desoxicolato de sodio ejerce un ligero efecto positivo sobre la producción de enzima. Esto posiblemente se deba a que favorece la secreción. Macrae (1983) indica que para muchos microorganismos una proporción sustancial de lipasa extracelular aparentemente permanece adherida a las paredes celulares. La presencia de la enzima unida a las paredes celulares puede inhibir la excreción de lipasa adicional al medio de cultivo, reduciendo de este modo el rendimiento de lipasa extracelular. Es de esperarse que sustancias que estimulan la liberación de lipasa de las paredes celulares incrementen la formación de lipasa extracelular, así por ejemplo, en *G. candidum* la adición de altos niveles de iones de magnesio al medio de crecimiento causa liberación de la lipasa de las paredes celulares incrementando la producción de la lipasa extracelular. Esto mismo podría ocurrir con el desoxicolato de sodio, al modificar la permeabilidad de la membrana celular. Hugo (1992) sugiere que los detergentes aniónicos pueden interaccionar con la pared celular y otras estructuras externas de la membrana citoplasmática de celulas microbianas causando disgregación debido a su acción sobre los componentes lipídicos de la pared, modificando la permeabilidad, causando lisis o provocando la muerte; el grado de daño depende del microorganismo y de la concentración usada. En *E. coli* y *Proteus vulgaris* el desoxicolato de sodio interfiere con la flagelación y motilidad (DMello & Yotis, 1987). Por otro lado, las sales biliares han sido reportadas por Haas y Bailey (1993) entre los agentes que favorecen la producción de lipasas.

Los halos de claridad pueden ser observados más nítidamente en medio con tributirina que en medio con aceite de oliva. Por lo tanto, a pesar del efecto negativo que ejerce la tributirina sobre la producción de enzima en fermentación sumergida, el medio de selección en sólido incluye tributirina para detectar los halos y desoxicolato de sodio porque permite obtener colonias aisladas. El mejor medio para fermentación sumergida contiene glucosa y aceite de oliva y ninguno de los otros ingredientes Pero ésto indica que es posible se presenten diferencias entre las mutantes aparentes en sólido y los valores obtenidos en líquido.

DETERMINACION DE LA SENSIBILIDAD A 2- DESOXIGLUCOSA.

Con la finalidad de establecer la concentración de 2- desoxiglucosa en el medio de cultivo a usarse para la selección de mutantes, se determinó la sensibilidad de la cepa a este análogo. Una suspensión de 1×10^7 esporas/ml. se plaqueó en medio "D" con el análogo a 3 diferentes concentraciones, 0.01, 0.5 y 0.1 g/l. No se obtuvo crecimiento en 0.5 y 0.1 g/l y sólo en la concentración 0.01g/l se desarrollaron un promedio de 3 colonias por caja, por lo que en adelante se trabajaría con esta concentración. Estos niveles de resistencia están dentro del rango reportado para otros microorganismos (Barredo et al., 1988, Boze et al., 1989, Mot y Verachtert, 1987).

MUTAGENESIS:

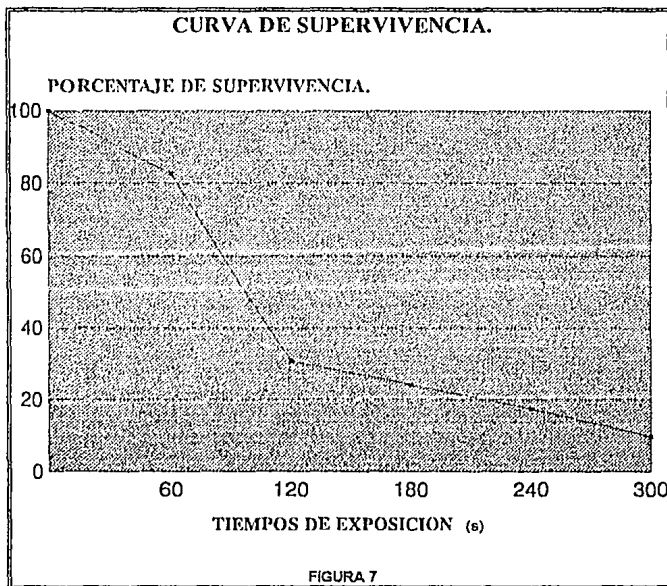
El método más común usado para la obtención de cepas hiperproductoras es el tratamiento de la población con un agente mutagénico hasta que la mortalidad deseada es obtenida. Las sobrevivientes se plaquean y se prueban todas las colonias resultantes o grupos al azar en el medio de selección indicado (Demain 1973). Es importante buscar aquellas colonias con un sólo cambio genético ya que, como señala Baltz (1986), la productividad de un metabolito puede ser influenciada por varios genes y se debe maximizar la frecuencia de mutaciones deseadas, así como minimizar las mutaciones no letales en un sitio secundario que pueden desplazar el efecto positivo de las mutaciones deseadas. La solución en este caso es maximizar la frecuencia de sobrevivientes que contengan en promedio una sola mutación y evitar el contacto excesivo con el mutagénico, que en realidad puede reducir dramáticamente la frecuencia de mutantes.

En este caso se probaron cinco tiempos de mutagénesis, ubicados en el rango de 0 a 300 segundos. Se empleó una distancia fija y luz de onda corta. La curva de supervivencia se observa en la **Figura 7**. Según reporta la literatura, la relación entre rendimiento de la mutación y dosis de radiación es más compleja para UV que para otro tipo de radiaciones. Finchman et al. (1979), señalan que las sobrevivientes a periodos largos de exposición tienden a no ser mutantes y sólo puede explicarse si la fracción de las células o la población nuclear es relativamente resistente tanto a la mutación como a la muerte. Por otro lado, se ha visto que a bajas dosis el número de mutantes obtenidas y el tiempo de exposición guardan una relación lineal (Market, 1953) Teniendo en cuenta estas afirmaciones y los porcentajes de supervivencia obtenidos en el tratamiento mutagénico, el tiempo seleccionado para evaluar posibles mutantes fue 120 s, que es el momento en que se presenta una caída drástica de la población, si bien la mortalidad alcanzada es sólo del 70%, ligeramente inferior al manejado en la mayor parte de la literatura, que es el 90% o superior.

SELECCION DE MUTANTES

La selección y acumulación de cepas con propiedades deseables puede llevarse a cabo en sólido o en líquido. Si el rendimiento en placa tiene alguna relación con el

cultivo sumergido, el método tiene una aplicación directa en la selección de mutantes superiores o sobreproductoras (Demain, 1973). Esta técnica ha sido muy empleada en programas de mejoramiento de cepas y fue tomado en cuenta para en el proceso de selección. La búsqueda de hiperproductoras de lipasa se realizó por plaqueo en medio "D" emulsificado con tributirina. como única fuente de carbono o, según el caso, en presencia de análogo. Se plaquearon aproximadamente 10 000 colonias. Se les midió el halo después de 72 horas de incubación a 29°C en los medios señalados. Ninguna colonia produjo halos mayores de 0.8 cm. de diámetro, que fue colocado como límite para selección de hiperproductoras, de acuerdo a los resultados obtenidos al determinar la variabilidad de la cepa. Posiblemente el lapso de incubación fue corto, pues el microorganismo necesitaba recuperarse del efecto del agente mutagénico y el tiempo empleado fue el mismo usado para la población en condiciones normales. No se apreciaron diferencias morfológicas entre colonias. En algunos casos la morfología ha sido asociada. con niveles de represión para algunas enzimas y sobreproducción, pero mayormente en relación a metabolitos primarios.



La cuenta de colonias se realizó de la dilución 10^{-3}

Ante la no detección de colonias hiperproductoras en condiciones en el que el único criterio de selección era el diámetro del halo, se recurrió a la búsqueda de mutantes resistentes al análogo DOG. Entre las mutantes resistentes a análogos a menudo se encuentran mutantes regulatorias altamente productoras (Demain, 1973). Las

500 colonias con mejores halos fueron replicadas en medio "D" con 2-desoxiglucosa en los 3 niveles de concentración considerados previamente (0.01, 0.05, 0.1 g/l.). El número de colonias desarrolladas en cada nivel se muestra en la **Tabla 14**.

TABLA 14. Colonias desarrolladas en medio "D" con 2-desoxiglucosa

2-DESOXIGLUCOSA (g/l.)	0.01	0.05	0.1
COLONIAS DESARROLLADAS	312	146	42
POBLACION REPLICADA	500		

Las 42 colonias obtenidas en medio "D" con 0.1 g/l. de 2-desoxiglucosa, fueron replicadas nuevamente en medio con 2-desoxiglucosa. Después de 84 horas de incubación a 29°C se midió el halo de actividad. Las colonias con su respectivo halo se muestran en la **Tabla 15**. Como se puede observar en la tabla, 23 de ellas (54% de total) presentaron halos por encima de 0.8 cm.

TABLA 15. Diámetro de halo de lipólisis de colonias desarrolladas en 0.1 g/l. de 2-desoxiglucosa

TAMAÑO DE HALO (cm)	No. DE COLONIAS
1.3	1
1.2	4
1.0	8
0.9	10
0.8	9
0.7	6
0.6	4

Por otra parte se tomaron esporas provenientes del tratamiento mutagénico y se plaquearon directamente sobre medio "D" con 2-desoxiglucosa 0.1g/l, ya que era el único medio en el que se habían detectado colonias hiperproductoras. Con este procedimiento cuatro colonias crecieron de un total de 2×10^4 esporas plaqueadas y posteriormente se les determinó el diámetro de halo que se muestran en la **Tabla 16**.

CARACTERIZACION DE MUTANTES EN FERMENTACION SUMERGIDA

La producción en fermentación sumergida es el criterio final de evaluación de eficiencia del método de selección en sólido. Si el rendimiento en placa tiene alguna relación con el cultivo sumergido el método tiene una aplicación directa en la selección de mutantes con niveles de producción superior. Como se ha dicho antes, factores como

características de crecimiento de la cepa en sólido, difusión de la enzima y permeabilidad pueden generar diferencias de comportamiento entre las condiciones de selección y producción.

Las 10 colonias que presentaron halos más grandes, independientemente del método de selección con el que fueron encontradas, se probaron para la producción de enzima en fermentación sumergida. Estas se muestran en la **Tabla 16**. Se debe hacer notar que algunas de las cepas consideradas presentaban diferencias en cuanto crecimiento. Así, la cepa 4 tuvo un desarrollo más lento que las otras mutantes y las cepas 13, 34, 45 presentaron halos grandes pero las colonias fueron mucho más pequeñas que las demás mutantes.

TABLA 16. Colonias probadas en fermentación sumergida

COLONIA	DIAMETRO DE HALO (de Lipólisis)	MODO DE OBTENCION EN MEDIO CON 2-DESOXIGLUCOSA
1	0.9	PLAQUEO DIRECTO.
2	1.0	
3	0.9	
4	1.2	
25	1.2	REPLICACION
32	1.3	
75	1.0	
13	1.2	
34	1.0	
45	1.2	

ACTIVIDAD LIPOLITICA EN FERMENTACION SUMERGIDA

Los resultados presentados en las **Figuras 8 y 9**, así como en la **Tabla 17**, indican que la actividad obtenida en medio con agar no guarda relación directa con los valores obtenidos en fermentación sumergida. Esto indica que los halos no son necesariamente indicadores de alta actividad volumétrica producida en medio líquido, ya que el 50% de las cepas seleccionadas no se comportaron como sobreproductoras. Sin embargo cinco cepas mostraron incrementos de cerca de 60% como promedio. Por lo tanto el método de selección en sólido puede ser útil para una selección primaria porque permite reducir el número de colonias a probar, pero es imprescindible evaluar los resultados en medio líquido. Esto representa un problema para el manejo de un gran número de cepas.

Los resultados obtenidos en fermentación sumergida fueron analizados estadísticamente para determinar si existía diferencia significativa de la actividad

lipolítica al usar glucosa al 1% y 4% para cada una de las cepas. Se encontró que existe diferencia altamente significativa para las cepas respecto a la actividad lipolítica en glucosa al 1% y del mismo modo para las cepas crecidas en glucosa al 4%. Para las cepas 1 y 2 la actividad lipolítica es mayor al 4%, para las cepas 4, 13 y S la actividad es mayor al 1% para la cepa 3, 25 y 34 no hay diferencia significativa y la actividad es igual para el 1% y 4%, para las cepas 32, 45 y 75 la actividad es mayor al 1% que al 4%. Cuando se examinó biomasa, se determinó diferencia significativa entre la biomasa producida con glucosa al 1% y la producida al 4%, es mayor al 1%. Además Existe diferencia altamente significativa de la biomasa producida entre cepas al 1% y la biomasa producida entre cepas al 4%. Para la cepa 2 y 4 la biomasa es mayor al 1%, para la cepa S la biomasa es mayor al 4%, para las cepas 1, 3, 13, 25, 32, 34, 45, 75 no hay diferencia significativa y la biomasa es igual al 1% y 4%. La clasificación de las cepas respecto a la actividad lipolítica y biomasa producida con glucosa al 1% y glucosa al 4% de acuerdo a la prueba de Duncan se presentan en la **Tabla 18**.

TABLA 17. Actividad lipolítica y Biomasa de las cepas con glucosa al 1% y glucosa al 4% en medio con aceite.

CEPA	ACTIVIDAD LIPOLITICA (U/ml)				BIOMASA (mg/ml)			
	GLUCOSA 1%		GLUCOSA 4%		GLUCOSA 1%		GLUCOSA 4%	
	MEDIA	σ	MEDIA	σ	MEDIA	σ	MEDIA	σ
1	22.40	± 1.09	27.22	± 0.08	15.80	± 0.89	14.68	± 0.92
2	21.53	± 0.14	27.23	± 0.30	16.97	± 0.62	12.99	± 0.73
3	23.24	± 1.11	24.96	± 0.30	14.47	± 0.25	13.70	± 1.47
4	22.35	± 0.96	17.28	± 0.16	15.86	± 0.74	13.29	± 0.79
13	12.63	± 0.30	7.97	± 0.33	18.94	± 1.30	16.27	$\pm 0.1.2$
25	21.68	± 0.38	22.85	± 0.83	16.30	± 0.53	16.16	± 0.27
32	13.86	± 0.14	7.68	± 0.55	16.37	± 0.96	14.98	± 0.99
34	7.54	± 0.24	7.00	± 0.16	16.00	± 0.74	15.45	± 0.67
45	8.80	± 0.13	8.22	± 0.24	15.76	± 0.91	15.82	± 0.94
75	10.63	± 0.08	8.31	± 1.33	16.49	± 1.20	17.58	± 1.20
S	13.92	± 0.10	11.09	± 0.67	15.05	± 0.62	17.29	± 0.65

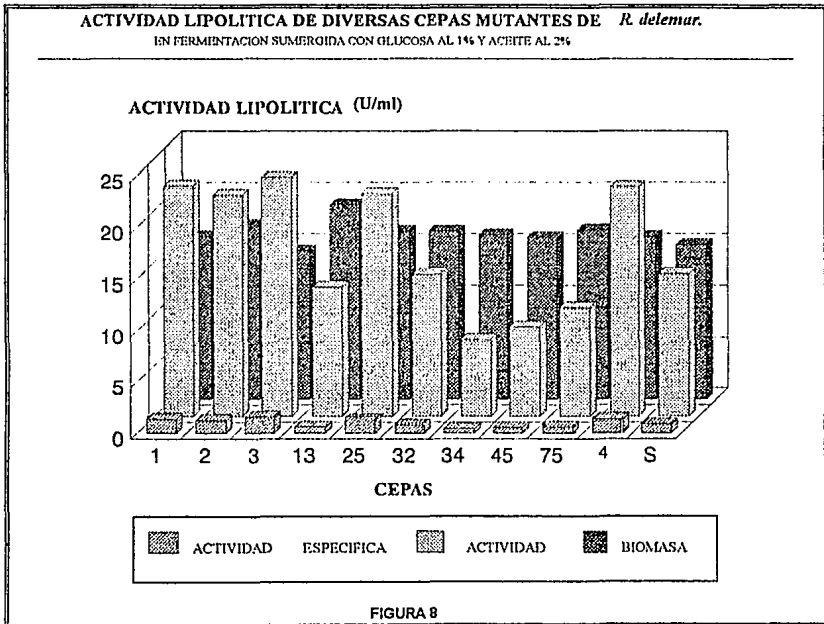
S = cepa silvestre

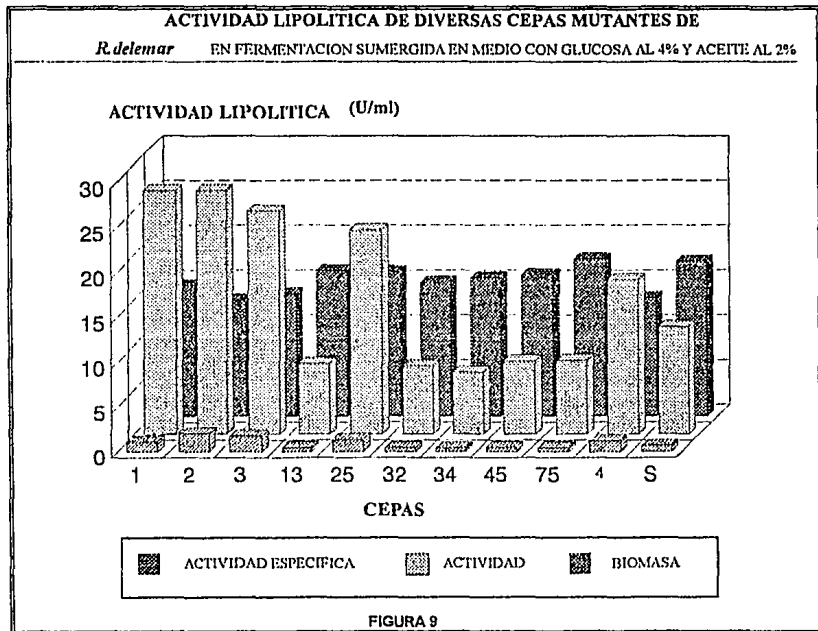
En relación a los niveles de producción y sensibilidad al efecto de glucosa las cepas probadas presentaron diversos comportamientos. Las cepas 13, 32, 34, 45, 75 no se comportaron como hiperproductoras, pero entre estas las cepas 13, 32 y 75 presentan niveles de actividad en el rango de la cepa silvestre y no pierden la sensibilidad al efecto represivo con glucosa al 4% pues la actividad se reduce casi a la mitad en este medio, comparado con el valor obtenido al 1%. En las cepas 34 y 45 la actividad es menor que la cepa silvestre y no presentan diferencia de actividad con glucosa al 1% y al 4%. Esto sería indicativo de que se trata de cepas insensibles a represión catabólica pero no están afectadas en el nivel de producción.

TABLA 18 Clasificación de las cepas respecto a la actividad lipolítica y biomasa producida en medio con glucosa al 1% y glucosa al 4% de acuerdo a Duncan

CEPAS	ACTIVIDAD LIPOLITICA		CEPAS	BIOMASA	
	GLUCOSA 1%	GLUCOSA 4%		GLUCOSA 1%	GLUCOSA 4%
1 **	g	g	1	c	d
2 **	f	g	2 **	c	a
3 N.S.	g	f	3 N.S.	a	c
4 **	g	d	4 *	c	b
13 **	d	b	13 N.S.	d	f
25 N.S.	f	e	25 N.S.	c	f
32 *	e	b	32 N.S.	c	d
34 N.S.	a	a	34 N.S.	c	d
45 *	b	b	45 N.S.	c	e
75 *	c	b	75 N.S.	c	f
S **	e	c	S **	b	f

Letras diferentes indican diferencia al 5% de significancia
 (Comparación con glucosa al 1% y 4%: ** = diferencia altamente significativa,
 * = diferencia significativa, N.S = No significativa).





Las cepas 1, 2, 3, 25 y 4 pueden ser consideradas sobreproductoras. Las cepas 1, 2, 3 y 25 mantienen su patrón de comportamiento productor en ambos casos, independientemente de la concentración de la glucosa 1% y 4%, incluso los valores de actividad de las cepas 1, 2, 3 se ven ligeramente incrementados con glucosa al 4%, en un rango que va de 2 a 6 unidades (7.5 a 25%) por lo que se considera corresponden a cepas resistentes a represión catabólica. Las cepas 1 y 2 fueron las mejores productoras y presentaron valores de actividad similares entre sí, ligeramente superiores a 27 unidades. La cepa 4 es un caso particular, pues se comporta como sobreproductora con glucosa al 1% y al 4%, pero su actividad en glucosa al 4% disminuye en algo más de 5 unidades (22%). Estos valores están todavía por encima de los producidos por la cepa silvestre en glucosa al 1%.

Los medios de producción probados corresponden a condiciones que garantizan el máximo de producción volumétrica de lipasa, pero en ellos no se manifiesta claramente el efecto regulatorio ejercido por glucosa. Por ello, es fundamental evaluar el efecto de la misma a altas concentraciones en ausencia de aceite. Esto se hizo con aquellas cepas sospechosas de ser resistentes al fenómeno. Los resultados mostrados en las Tablas 19 y 20 indican que las cepas siguen mostrando el comportamiento de

sobreproducción (60% más que la cepa silvestre, inclusive como se puede observar la actividad específica es mucho mayor que en la cepa silvestre) y resistencia a efecto carbono, que indica desregulación. Los valores obtenidos son menores a los reportados para fermentaciones previas al no haber aceite en el medio de cultivo, que estimula tanto crecimiento como actividad volumétrica. Por lo tanto, se puede asegurar que se trata de mutantes hiperproductoras y derreguladas.

La frecuencia mutagénica calculada en cuanto a número de hiperproductoras es de 5/10000 y en cuanto a resistenes a represión son 2/10000 que además son hiperproductoras, mientras que 2/10000 son resistentes a carbono pero no hiperproductoras, al menos en medio en presencia de aceite. Estos valores son aceptables y corresponden a los reportados por la literatura (Eriksson y Johnsrud, 1983; Fiedurek et al, 1986).

TABLA 19. Resultados obtenidos en fermentación sumergida en medio con glucosa 1%, sin aceite

CEPA	ACTIVIDAD LIPOLITICA (U/ml)	BIOMASA (mg/ml)	ACTIVIDAD ESPECIFICA (U/mg)
	MEDIA σ	MEDIA σ	
S	10.68 \pm 0.23	6.88 \pm 0.22	1.55
1	16.97 \pm 0.43	6.79 \pm 0.17	2.49
2	16.39 \pm 0.49	6.73 \pm 0.16	2.43

TABLA 20. Resultados obtenidos en fermentación sumergida . en medio con glucosa al 4%, sin aceite

CEPA	ACTIVIDAD LIPOLITICA (U/ml)	BIOMASA (mg/ml)	ACTIVIDAD ESPECIFICA (U/mg)
	MEDIA σ	MEDIA σ	
S	6.77 \pm 0.55	6.90 \pm 0.18	0.97
1	16.10 \pm 0.36	7.00 \pm 0.19	2.28
2	15.67 \pm 0.49	7.00 \pm 0.26	2.23

Los genotipos asociados con las cepas seleccionadas pueden estar ubicados en varios puntos. Pueden estar relacionados con la alteración de una función regulatoria, en algún gen vinculado con la biosíntesis de lipasa, o en algún gen que controla el mecanismo de regulación por glucosa en *Rhizopus delemar*, de acuerdo a lo mencionado por Jhonston, (1985), así como en el transporte de glucosa o en el mecanismo de secreción de la enzima. Debe también considerarse que se puede tratar de mutantes pleiotrópicos, cuya alteración resulte en cambios en varios caracteres. Es frecuente que con la luz ultravioleta se generen pequeños cambios mutacionales en genes estructurales o regulatorios. Gerhartz (1990) señala que cuando los cambios en componentes estructurales a través de la mutación corresponden a la pérdida de una función regulatoria, éstos resultan en el mejoramiento de producción de una enzima.

SECRECION.

Uno de los fenómenos generales que pueden explicar la resistencia a 2 desoxiglucosa es una alteración en la permeabilidad y una modificación en los niveles de secreción. Para evaluar esta hipótesis se determinó la proteína extracelular en las cepas consideradas hiperproductoras, tanto en glucosa al 1% como al 4% y los resultados se presentan en las Tablas 21 y 22. Los valores de proteína extracelular obtenidos en todas las cepas fueron menores al de la cepa silvestre. Los más bajos fueron presentados por las cepas 1, 2 y 3, estos representan el 51, 42, y 37% respectivamente de los presentados por la cepa silvestre, mientras que en las cepas 4 y 25 fueron 18 y 12% respectivamente. menores ésta. Esto indicaría que no está afectado el nivel de secreción, pero si resulta que en las cepas hiperproductoras la mayor cantidad de proteína excretada corresponde a lipasa. Esto hace suponer que el proceso de mutagénesis mejoró específicamente el nivel de secreción para la enzima lipolítica, probablemente por modificación del péptido señal.

TABLA 21. Determinación de proteína extracelular en las cepas mutantes con mayor actividad lipolítica en mediocon aceite de oliva al 2% y glucosa al 1%

CEPA	PROTEINA EXTRACELULAR (mg/ml)	ACTIVIDAD LIPOLITICA (U/ml)	ACTIVIDAD/ PROTEINA (U/mg)
1	42.68	22.4	0.52
2	35.20	21.53	0.66
3	31.20	23.24	0.74
4	67.13	22.35	0.33
25	72.11	21.68	0.30
S	82.59	13.92	0.16

TABLA 22. Determinación de proteína extracelular en cepas mutantes con mayor actividad lipolítica en medio con aceite de oliva al 2% y glucosa al 4%

CEPA	PROTEINA EXTRACELULAR (mg/ml)	ACTIVIDAD LIPOLITICA (U/ml)	ACTIVIDAD/ PROTEINA (U/mg)
1	70.11	27.22	0.38
2	36.69	27.23	0.74
3	74.11	24.96	0.33
4	94.06	17.28	0.18
25	68.62	22.85	0.33
S	104.54	11.09	0.10

ESTABILIDAD

Una cualidad importante en cepas productoras y en las mejoradas a través de procesos mutagénicos es la estabilidad del cambio generado. Esta fue analizada para las mutantes obtenidas en medio "D" con 2-desoxiglucosa tras seis resiembras consecutivas realizando mediciones de diámetro de halo. La medida de los diámetros de halo después de cada resiembra se presentan en la (Tabla 23)

TABLA 23. Estabilidad en la producción de lipasa en cepas mutantes medida por diámetro de halo de Lipólisis tras seis resiembras.

CEPA	R E S I E M B R A S						media	σ
	1	2	3	4	5	6		
1	0.8	0.9	0.7	0.7	0.8	0.8	0.78	0.07
2	0.9	0.8	1.0	1.0	0.9	0.9	0.92	0.07
3	0.9	0.8	1.0	0.8	0.9	0.8	0.86	0.08
4	1.1	0.9	1.2	1.1	1.0	1.0	1.05	0.10
25	1.1	1.0	0.9	1.1	1.0	1.0	1.01	0.07
S	0.6	0.7	0.6	0.7	0.6	0.6	0.64	0.05

El análisis estadístico de los datos revela que hay diferencia altamente significativa entre las cepas analizadas. La prueba de Duncan separa a las cepas en 4 grupos (Tabla 24) La cepa silvestre es la que presenta menor diámetro de halo en las cepas 1 y 3 el diámetro de halo es mayor al de la cepa silvestre, en la cepa 2 es superior al de las cepas anteriores, y las cepas que presentan el mayor halo entre todas son las cepas 4 y 25.

Tabla 24 Clasificación de cepas mutantes de acuerdo a su estabilidad según Duncan

CEPAS	CLASIFICACION DUNCAN
1	b
2	c
3	b
4	d
25	d
S	a

Letras diferentes indican diferencia significativa al 5% de significancia

El análisis también indica que el diámetro del halo no cambia para las resiembras lo que significaría que la actividad lipolítica no varía o disminuye en las resiembras sucesivas. Sin embargo, se determinó que existe una tendencia de variación de actividad respecto al diámetro inicial presentado por las cepas, en un rango no mayor del 15%, caso específico la cepa 25, pero existen casos en que los niveles detectados son mucho más estables, alcanzando niveles de 96 % en relación al valor inicial. Estos resultados permiten decir que las mutantes obtenidas mantienen sus niveles de producción de enzima y son estables al menos por el número de resiembras examinadas en este trabajo. Inclusive se debe notar que los niveles de estabilidad de las cepas no difieren sustancialmente, a los de la cepa silvestre en este análisis, ni del valor obtenido previamente al determinar la estabilidad de la producción. Sin embargo habría que considerar que en una cepa mutante siempre es posible hacer evidente la población de mutantes inversas, los cuales pueden influir en determinado momento en la estabilidad de una cepa. No se debe olvidar que las cepas hiperproductoras han ganado esta capacidad sobreproductora por alteración de su estado fisiológico, y no se encuentran en condiciones naturales de las cuales ellas intentan escapar para retornar a su estado natural, como lo señala Vanek et al (1990).

CAPITULO 6

CONCLUSIONES

1) - La producción de lipasa en *Rhizopus delemar* es variable, la población tuvo una distribución en 100% en cuanto al tamaño de halo producido por las colonias con mínimo y máximo diámetro. El mayor porcentaje de la población produjo halos entre 0.5 - 0.6 cm. y el mayor tamaño de halo observado en la población fue de 0.8 cm.

2).- Los niveles de producción de enzima en *Rhizopus delemar* puede ser considerado estable al menos en las 7 transferencias probadas en este trabajo.

3) La selección de hiperproductoras de lipasa por halos de claridad en *Rhizopus delemar* no es un método totalmente confiable. Los factores involucrados en la diferencia de expresión en medios sólido y líquido todavía no han sido identificados. El método puede usarse para una selección primaria, pues permite reducir el tamaño de la población a examinar en fermentación sumergida.

4).- La cepa resultó sensible a 2-desoxiglucosa (0.1 g/l) y esta característica permitió seleccionar cepas hiperproductoras de lipasa y derreguladas al efecto negativo de glucosa en *Rhizopus delemar*.

5).- Cinco cepas seleccionadas pueden ser consideradas como sobreproductoras de lipasa pues su rendimiento es 60% más que la cepa silvestre

6).- Al menos 2 de las cepas obtenidas no son afectadas por altos niveles de glucosa en el medio de cultivo, por lo que pueden ser consideradas resistentes al efecto negativo de glucosa.

7) -La frecuencia mutagénica para hiperproductoras es de 5/10000 y para resistentes a efecto de glucosa es de 2/10000. No se lograron valores de hiperproducción muy altos, los incrementos son menores a los obtenidos con estrategias de manipulación de factores nutricionales. Sin embargo, sólo se ha realizado un proceso de mutagénesis y, como señalan muchos autores, la generación de cepas con acumulación de propiedades deseables se logra a través de programas de mejoramiento con varias etapas incluyendo el uso alternado de mutágenos y la clonación . Asimismo estas mutantes pueden ser probadas en medios mejorados.

8) -Las mutantes obtenidas son estables al menos en el número de resiembras probadas en este trabajo.

RECOMENDACIONES

Continuar la investigación de los factores nutricionales y mecanismos regulatorios que afectan la producción de lipasa en *Rhizopus delemar* y, mediante la manipulación de estos parámetros, implementar estrategias acertadas en la selección de mutantes con características deseadas para incrementar la producción de enzima. En particular, deben explorarse mejor los factores que permiten detectar en sólido colonias con halos grandes y que pierden la capacidad de hiperproducción en medio líquido.

Un estudio fino de las mutantes nos permitiría conocer si la derrepresión está asociada al mecanismo de transporte de glucosa o respecto a la actividad de enzimas catabólicas como fosfatasa, fosforilasa etc. Asimismo, puede estar relacionada con mecanismos regulatorios específicos como el gen CreA o su equivalente. Resulta de interés en este caso el hecho de que el fenómeno de regulación por glucosa no se manifieste en presencia de aceite o de lípidos.

Un aspecto que debe ser estudiado con mayor detalle es el de secreción de la enzima, pues los resultados parecen indicar que la mutación se encuentra a nivel de incremento en secreción.

Un estudio genético puede llevar a la identificación de los puntos mutacionales, lo que contribuiría a su caracterización y facilitaría el diseño de estrategias para la selección de mutantes hiperproductoras

Los avances en biología molecular y la tecnología de DNA recombinante han expandido las posibilidades de realizar la sobreproducción de enzimas. Esto permitirá profundizar en el conocimiento de la genética de *Rhizopus delemar* y de los genes que codifican la producción de lipasa, así como conocer los mecanismos involucrados en la regulación por carbono, área en la que quedan muchos problemas por resolver entre los hongos filamentosos.

BIBLIOGRAFIA.

- Adler- Nissen, J. (1987). New uses of microbial enzymes in food processing. TIBTECH (1), 6.
- Arst, H. N; and Cove, D. J. (1969). Methylamonum resistance in *Aspergillus nidulans*. J. Bacteriol. 98, 1284 - 1293.
- Arnold, R.G; Shahani, K.M. and Dwived, B.K. (1974). Application of lipolitic enzymes to flavor development in dairy products. J. Dairy Sci. 58 (8), 1127 - 1141.
- Arguelles, J. C.; Mbonyi, K; Van Aelst, I Vanhalewyn, M Jans, A.W.H. (1990) Absence of glucose-induced cAMP signaling in the *Saccharomyces cerevisiae* mutants *cat 1* and *cat 3* which are deficient in derepression of glucose-repressible proteins. Arch. Microbiol 154, 199 - 205.
- Atkinson, D. E. (1969). Regulation of enzyme function. Ann. Rev. Microbiol 23, 47 - 48.
- Aunstrup, K; Andresen, O; Falch, E. A and K Nielsen, T.K. (1979). Production of microbial enzymes. Chapter 9. Microbial Technology. Microbial Process. Vol I. 2. Pepler, H.J. & Perlman, D. (eds) Academic Press. 282 - 310.
- Barredo, L. J; Alvarez, E; Cantoral, M. J; Diez, B. and Martín, F. J. (1988). Glucokinase - deficient mutant of *Penicillium chrysogenum* is derepressed in glucose catabolite regulation of both β -galactosidase and penicillin biosynthesis. Antimicrobial Agents and Chemotherapy . 32 (70), 1061- 1067.
- Baltz, R.H. (1986) Mutagenesis in *Sterptomyces* sp. Industrial Microbiology and Biotechnology Demain A.L. and Solomon, N. A. (Eds) American Society for Microbiology Washington, D. C. 184 - 190.
- Bati, N; Hammond, E.G and Glatz, B.A. (1984) Biomodification of fats and oils: trials with *Candida lipolytica*. JAOCS, 61 (2), 1743 - 1746.
- Behal, V; Hostalek, Z; Vanek, Z. (1979) Anhydrotetracycline oxygenase activity and biosynthesis of tetracyclines in *Streptomyces aureofaciens*. Biotechnol Lett. 1, 177 -182
- Benzonona, G. (1968) Sur le role ions calcium durant l'hydrolyse des triglycerides insolubles par la lipase pancreatique en presence de sels biliaries. Biochim. Biophys. Acta, 151, 137 -146.

- Bernard, L. O; Weil, C.S; Woods, L.A. and Brenard, B.K.(1985) GRAS substances. Special report. Institute of Food Technologists. Chicago.
- Berry, D.R.(1985) The enviromental control of physiology of filamentous fungi. The Filamentous fungi. Chapter 2. Vol I. Industrial Micology. Smith, J.E. and Berry, (Eds.) D.R.Eduard Arnold Publishers. London. 16 - 32..
- Boze, H; Guyot, B. J; Moulin, G. and Calzy, P. (1989). Isolation and characterization of a derepressed Mutant of *Schwanniomyces castelli* for amylase production. Appl Microbiol Biotechnol. 31, 366 - 370.
- Bridges (1976). Mutation induction. Genetic of Industrial Microorganisms. Second International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms. MacDonald, K. D. (Ed) Academic Press.New York. 7 - 14.
- Bushell, (1989) The process physiology of secondary metebolite production. Microbial Products. New Approaches. Bumberg,S. Hunter, I and Rhodes, M. (Eds.) Forty Fourth Symposium of the University of Cambridge Published for the Society for General Microbiology .Cambridge University Press. Cambridge New York.. 95 - 120.
- Cape, R. E; Gelfand, D.H.;Innis,M.A; and Neidleman, S.L.(1982). An introduction to the present State and Future Role of genetic manipulation. the Development of Over-producing Micro-organisms. In Overproduction of Microbial Products Krumphanzl, V; Sikyta, B. and Vaněk. (Eds) Academic Press. London. 327- 343
- Caten, C.E. (1979) Quantitative genetic variation in fungi. Quantitative Genetic Variation. Thomson, J. N. and Thoday, J. M.(Eds) Academic Press. London. 35 - 60.
- Clerin, E. M. and Fergus,C. L. (1971). Effects of nutrients. temperature and relative humidity on germination and longevity of the ascospores of *Chaetomiium thermophile* var. coprophile. Mycologia. 63, 1030 - 1045.
- Cotty, J. P; Cleveland, E.T; Brown, L. R. and Mellon, E. J. (1990). Variation in polygalacturonase production among *Aspergillus flavus*. isolates. Applied and Environ Microbiol. 56 (12), 3885 - 3887.
- Conney, L. Ch, Growth of microorganisms, (1981). Microbial Fundamentals. Chapter 2. Vol I. Rhem,H-J. and Reed G. (Eds) Verlag chemie. 74 -111.

Cuskey, S. M; Frein, E.M; Montenecourt, B. S. (1982). Over-production of Celulase - Screening and Slection In Overproduction of Microbial Products Krumphanzl, V; Sikyta, B. and Vaněk.(Eds). Academic Press London. 405 - 406.

Cuervo, R. (1994) Obtención de lipasas de *Penicillium caseicolaum*. Tesis para Obtener el Título de Químico en Alimentos UNAM. México, D.F.

Chander, H; Sannabhadti, S.Elias, J. (1977). Factors affecting lipase production by *Penicillium chrysogenum* J. Food Sci, 42(6), 1677 - 1682.

Chander, H; Batish, K.V; Gehodekar, R. D. (1981). Factors affecting lipase production in *Rhizopus nigricans*. J. Dairy Sci. 64 (2), 193 - 196.

Chaplin, M.F. and Bucke, C. (1990). Enzyme technology. Cambridge University Press, Great Britain. 1 - 78.

Chen, J. and Chang, K. (1993). Lipase-catalyzed hydrolysis of Milk Fat in Lecithin reverse micelles. J. Ferment. Bioeng. 76 (2), 98 - 104.

Chen, J. and McGill, S.D. (1992). Enzymatic hidrolisis of triglycerides by *Rhizopus delemar* immobilized on Biomas Support Particles. Food Biotechnol. 6 (1), 1-18.

Davis, N.D. and Blevins, W. T. (1979). Methods for laboratory fermentations. Chapter 13 in Microbial Technology. Vol. II. Pepler, H. J& Perlman, D. (Eds) Academic Press, London. 301 - 328.

Davis, M. G. and Calvo, J.M. (1977). Relationship between messenger ribonucleic acid and enzyme levels specified by the leucine operon of Escherichia col K-12. J. Bacteriol. 131, 997 - 1006.

Derw, W. S. and Wallis, D.A. (1985) Regulation of secondary metabolism and Keys to its manipulation. The Filamentous Fungi .Vol I. Industrial Micology. Smith, J.E. and Berry, D.R. (Eds) Eduard Arnold Publishers, London 35 - 55

Demain, L. A. (1990). Microbial enzymes and biotechnology. Chap. 10. Regulation and Explotation of Enzyme Biosynthesis. Fogarty M. W. & Kelly, T. C, Elsevier Applied Science, US A. 331 - 368.

Demain, A. L. (1982). Catabolite regulation. in industrial microbiology. Overproduction. of Microbial Products Krumphanzl, V; Sikyta, B. and Vaněk. (Eds). Academic Press. London. 4- 19.

- Demain, A.L. (1973). Mutation and the production of secondary metabolites, *Adv. Appl. Microbiol*; 16, 177 - 202.
- Díaz, L. & Ruiz, A. (1994). Cinética de producción de lipasas con diversas fuentes de carbono en *Rhizopus delemar*. Tesis para obtener el Título de Químico Farmacéutico Biólogo. Facultad de Química. UNAM. México.
- D'Mello, A. and Yotis, W. W. (1987) The action of sodium deoxycholate on *E.coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 1944 - 1946.
- Dombek, M. K. and Ingram O. L. (1988). Intracellular accumulation of AMP as a cause for decline in rate of ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* during batch fermentation. *Appl Environ Microbiol.* 54 (1), 98 - 104.
- Dziczak, J. D. (1991). Enzyme catalysts for food processes. Special Report. *Food Technol* 45 (1), 78 - 85.
- Edwards, C. (1993). The significance of *In situ* activity on the efficiency of monitoring methods. *Monitoring Genetically Manipulated Microorganism in the Environmental.* Edwards C. Wiley. J. & Sons. (Eds) Great Britain, 1 - 23.
- Elander, R. P. (1982). Traditional *versus* current approaches to the genetic improvement of microbial strains. *Overproduction of Microbial Products.* Krumphanzl, V; Sikyta, B. and Vaněk.(Eds). Academic Press. London. 353
- Elander, R.P; Corum, C. J; Valeria de H. and Wilgus, R. M. (1976). Ultraviolet mutagenesis and cephalosporin synthesis in strains of *Cephalosporium acremonium*. *Genetic of Industrial Microorganisms. Second International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms* MacDonald K. D. (Ed) Academic Press. New York. 253 - 272.
- Ergan, F; Trani, M. and André, G. (1988). Solvent free triglyceride synthesis using Lipozyme™ IM - 20. *Biotechnol. Lett.* 10 (9), 629 - 634.
- Erikson, K. and Johnsrud, C. S. (1983). Mutants of the white- rot fungus *Sporotrichum pulverulatum* with increased cellulase and B - D - glucosidase Production. *Enzyme Microbol. Technol.* 5 (11), 425 - 429.
- Espinosa, E.(1990)^a. Mejoramiento de las Condiciones de Producción de Lipasa de *Rhizopus delemar* Destinada a la Modificación de un Sustrato Lácteo. Tesis para obtener el grado de Maestría en Biotecnología UACP y P, CCH, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. México, D.F.

Espinosa, E; Sánchez, S; Farrés, A. (1990)^b. Nutritional Factors Affecting Lipase Production by *Rhizopus delemar*. CDB3 H313. Biotechnol. Lett. 12 (3), 209 -214.

Fellows, P.(1988) Food Processing Technology. Principle and Practice Chapter 7 VCH. Publishers. Horwood. 172 - 183.

Fiedurek, J; Rogalski, J; Ilczuk, Z. and Leonowicz, A. (1986). Screening and mutagenesis of moulds for the improvement of glucose oxidase production. Enzyme Microbiol. Technol. 8 (12), 734 - 736.

Finchman, J.R.S; Day, P. R. and Radford, A. (1979) Botanical Monographs IV. Fungal Genetics. 4a. ed. University of California Press, 245 - 281

Fox, P.F; Stepaniak, L. (1983) Isolation and some properties of extracellular heat- estable lipases from *Pseudomonas fluorescens* strain AFT 36. J. Dairy Res. 50, 77 - 79.

Fox, P.F. (1993) Exogenous enzymes in dairy technology - Review. J. Food Biochem. 17, 173 - 199.

Gaudy, A; Gaudy, E.(1981). Microbiology for environmental scientists and engineers. McGraw-Hill , Tokyo, Japón, 175 - 206.

Gerhartz, W. (1990) Enzymes in Industry. Production and Applications. VCH Publishers Federal Republic of Germany, 33-90.

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

Godtfredesen, S.E. (1990). Microbial enzymes and biotechnology. Chap 7. Microbial Lipases. Fogarty M. W. & Kelly T. C. (Eds). Elsevier Applied Science, U.S.A. 255 - 273.

Gräfe, U. (1982). Relevance of microbial nitrogen metabolism to production of secondary metabolites. Overproduction of Microbial Products Krumphanzl, V; Sikyta, B. and Vaněk. (Eds). Academic Press. London. 64- 75.

Gross, A (1991). Enzymatic Catalysis in the production food ingredients. Food Technol 45 (1) 96 - 108.

- Gutierrez, N; McKay, A.I; French, E. Ch; Brooks, D. J. and Maddox, S. I. (1993). Repression of galactose utilization by glucose in the citrate - producing yeast *Candida guilliermondii*. J. Ind. Microbiol. 11, 143 - 146.
- Haas, M. J and Bailey, (1993). Glycerol as Carbon Source for Lipase Production by the Fungus *Rhizopus delemar*. Food Biotechnol. 7 (1), 49 - 73.
- Hegedus, D: D: and khachatourians, G.G. (1988). Production of an extracelular lipase By *Beauveria Bassiana*. Biotechnol. Lett. 10 (9), 637 - 642
- Holsiger, V.H. and Kligerman (1991). Applications of lactase in diry foods and other Foods Containing Lactose. Food Technology. 45 (1), 92 - 96
- Hugo, W.B. (1992). Desinfection mechanisms. chapter 9. in Principle and Practice of Desinfection, Preservation and esterilizacion. Rusesell, A. D. Hugo, W.B. and Ayliffe, G.A. (Eds) Blackwell Scientific Publications. 187- 201
- Iwai, M. and Tsujisaka, Y. (1974). The purification and properties of three kinds of lipases from *Rhizopus delemar*. Agr. Biol. Chem. 38 (6), 1241 - 1247.
- Iwai, M; Shimada, Y; Tsujisaka, Y. (1980). Modification of *Rhizopus delemar* lipase by its binding with phospholipids. J. Biochem. 88 (2). 533 - 538.
- Jacob, F. and Monod, J. (1961) Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. J.Mol. Biol. 3, 318 - 356.
- Jacobson, g. K. (1981) Mutations. Chapter 5b. in Microbial Fundamentals. Vol I. Rhem,H-J. and Reed G. (Eds) Verlag chemie 290 - 295.
- Jeffries, W. T. (1984). Mutants of *Pachysolen tannophilus* showing enhanced rates of growth and ethanol formation from D- Xylose. Enzyme Microb. Technol. 6, 254 - 258.
- Joglekar, V. A. and Karanth, G. N. (1984). Studies on celulase production by a Mutant - *Penicillium funiculosum* UV- 49. Biotechnol. Bioeng. 21, 1079 - 1084.
- Jhonston, J.R. (1985). Strain Improvement and strain stability in filamentous fungi. in The filamentous fungi. Chapter 4. Vol I. Industrial Mycology. Smith, J.E. and Berry, D.R. (Eds) Eduard Arnold Publishers. London. 59 -77.
- Kawasaki, L. (1991). Efecto de glucosa sobre la producción de lipasa por *Rhizopus delemar* en fermentación Sumergida. Tesis para Obtener el Título de Biólogo, Facultad de Ciencias, UNAM, México. D.F.

Khowala, S. and Sengupta, S. (1992). Secretion of β -glucosidase by *Termitomyces clypeatus*: regulation by carbon catabolite products. *Enzyme Microb. Technol.* 14, 144 - 149.

Kilara, A. (1985). Enzyme-modified lipid food ingredients. *Process Biochem.* 4, 35 -45.

Koritala, S; Hesseltine, C. W; Pryde, E.H. and Mounts, T.L. (1987). Biochemical modification of fats by microorganisms. A preliminar Survey. *JAOCS* 64 (4), 509 - 513.

Kritiansen, B; Charley, R.C; Seviour, B; Harvey, L; Habeeb and Smith, J.E. (1982). Over-Production of metabolites by filamentous Fungi. *Overproduction of Microbial Product.* Krumphanzl, V; Sikyta, B. and Vaněk. (Eds). Academic Press London. 194 - 210.

Künkel, W; Berger, D; Risch, S. and Wittmann - Bresinsky, B. (1992) Genetic instability of Industrial strains of *Penicillium chrysogenum*. *Appl Microbiol Biotechnol* 36, 499 - 502. .

Langrand, G; Triantaphylides, C. and Baratti .J. (1988) Lipase catalyzed formation of Flavour Esters. *Biotechnol. Lett.* 10 (8), 549 - 554.

Lebrihi, A; Lefebvre, G. and Germain, P. (1988). Carbon catabolite regulation of cephamycin C and expandase biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 28, 44 - 51.

Leclerc, M; Blondin, B; Ratamahenina, R; Arnaud, A. and Galzy, P. (1985). Selection and study of mutants of *Dekkera intermedia* and *Candida wickerhamani* derepressed for β -glucosidase; yeasts; derepressed mutants. *FEMS Microbiol. Lett.* 30, 389 - 391.

Linfield, W. M; O'Brien, D. J; Serota, S. and Barauskas, R.A. (1984)^a. Lipid- lipase interactions. I I fat splitting with lipase from *Candida rugosa*. *JAOCS*, 61 (6), 1061 - 1071.

Linfield, W. M; Barauskas, R; Sivieri, Lorraine; Serota, S; Stevenson, R. W. (1984)^b. L enzymatic fat hydrolysis and syntethesis. *JAOCS*, 61 (2), 191 - 195.

Lockwood, L. B. (1985). Organic acid production. Chapter 8. Vol I. *Industrial Mycology.* Smith, J.E. and Berry, D.R. (Eds) Eduard Arnold Publishers. London. 140 - 147.

Lopez- Mungía, C. A, (1986) Las enzimas y los alimentos. *Tec. Aliment. (Mex)* 21 (2), 24 - 30.

- Lowry, O. H; Roseberowgh, N. J; Fair, L. and Randall, R. J. (1951). Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 93, 265 - 275.
- Mach, H; Hecker, M, and Mach, F. (1984). Evidence for the presence of cyclic adenosine monophosphate in *Bacillus subtilis* FEMS. *Microbiol. Lett.* 22, 27 - 30.
- Macrae, A.R. (1983). Microbial enzymes and biotechnology. Cap. 5; Extracelular Microbial Lipases. Forgary, M. W; (Ed) Applied Science Publishers. London and New York, 225 - 249.
- Maloney, P.A; Hackett, J. T; Cnsidine, J. P. and Coughlan P. M. (1983) Isolation of mutantes of *Talaromyces emersonii* CBS 814.70 with enhanced cellulase activity. *Enzyme Microb. Technol* 5, 260 - 264.
- Market, C.L: (1953) Lethal and mutagenic effects of ultraviolet radiation in Glomerella conidia. *Exp. Cell Res.* 5, 429 - 435.
- Markwell, J; Frakes, G. L; Brott, C. E; Osterman, J. and Wagner, F. (1989). *Aspergillus niger* Mutants with increased glucose oxidase roduction. *Appl Microbiol Biotechnol.* 30, 166 - 169.
- Martínez, P y Farres, A. (1993). Producción de lipasas de *R. delemar* en fermentadores instrumentados de 5 l utilizando un medio de cultivo optimizado. *Biotecnología.* 3 (1/2) Fe 106.
- Marmolejo, A. (1994). Formación de protoplastos en la mutante CLK1 de *Aspergillus nidulans*. Tesis para Obtener el Título de Biólogo. Facultad de Ciencias UNAM. México, D.F.
- Matsumoto, K; Uno, I; Toh-e, A; Ishikawa, T. and Oshima, Y. (1983). Cyclic AMP may not be involved in catabolite repression in *Saccharomyces Cerevisiae* evidence from mutants unable to synthesize it. *J. Bacteriol.* 156, 898 - 903.
- Matsumura, M; Yoshida, T. and Taguchi, H. (1982). Synthesis of Cephalosporin C by methionine analogue resistant mutant of *Cephalosprrium acremonium*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 16, 114 - 118.
- Menassa, A. y Lamberet, G; (1982) Contribution a l'etude du systeme lipolyitique de *Penicillium roqueforti*. Caracteres compares de deux activites exocellulaires. *Le Lait*, 62, 32 - 33.

Moskowitz, G. J. & Noelck, S.S. (1987) Enzyme- Modified cheese technology. J. Dairy Sci. 70, 1761 - 1769.

René De Mot and Hubert Verachtert. (1986). Regulation of amylase secretion by the yeast *Filobasidium capsuligenum* and a 2-deoxy-D-glucose resistant mutant.

Miyazawa, T; Mio, Motoe; Watanabe, Y; Yamada, T and Kuwata, S. (1992) Lipase-catalyzed transesterification procedure for the resolution of non-protein amino acids. Biotechnol. lett. 14 (9) 789 - 794.

Muderhwa, J.M; Ratomahenina, R; Graille, M.J. and Galzy,P. (1985). Purification and properties of the lipase from *Candida deformans* (Zach) Langeron and Guerra. JAOCS 62 (6), 1031 - 1036.

Moskowitz, G. J. and Noelck, S. S. (1986). Enzyme- modified cheese technology. J. Dairy Sci. 70, 1761 - 1769.

Mullenders, L. H; Dokkum, M; Kalle; W. J. Vrieling, H; Zdzienicka, M. and Zeeland, A. (1993). UV - Induced photolesions, their repair and mutations. Mutation Research, 299, 271 - 276.

Nahas, E. (1988). Control of lipase production by *Rhizopus oligosporus* under various Growth Conditions. J. Gen. Microbiol. 134, 227 - 233.

Neidehardt, F.C; Ingraham, J.L; Schaechter, M. (1990). Physiology of the bacterial cell Sinauer Associates, Inc. Publishers. 226 - 246.

Neidleman, S. L. (1986). Enzymology and food processing. Biotechnology Food Process. Marlander, S. K; Labuza, T.P. (Eds) Noyes publications New Jersey. USA. 37- 41.

Neidleman, S. L. (1991). Enzymes in the Food industry a backward glance. Food Technology. 45 (1), 88 - 91

Novak, S; D' Amore, T. and Stewart, G. G. (1990). 2 - Deoxy - D - Glucose resistant yeast with altered sugar transport activity. FEBS. 269 (1), 202 - 204.

Odera, M; Takeuchi, K. and Toh-E, A. (1986). Molecular cloning of lipase genes from *Alcaligenes denitrificans* and their expression in *Escherichia coli*. J. Ferment. Technol. 64 (5), 363 - 361.

Park, Y.K; Pastore, G.M. and Almelda, M.M. de. (1988). Hydrolysis of soybean oil by a combined lipase system. JAOCS 65 (2), 252 - 254.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Penet, Christopher. S. (1991). New Applications of industrial food enzymology: economics and processes. *Food Technology* 45 (1), 98 - 100.

Penn, Ch. (1990). Handling laboratory microorganisms. Open University Press. Milton Keynes Philadelphia. 62 - 87.

Petrovic, E. S; Skrinjar, M; Becarevic, A; Vujcic, F. I.; Banka, L. (1990). Effect of various carbon sources on microbial lipases. biosynthesis. *Biotechnol Lett.* 12 (4), 299 - 304.

Phillips, A. T. and Mulfinger, L. M. (1981). Cyclic adenosine 3', 5' - monophosphate levels in *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas aeruginosa* during induction and carbon catabolite repression of histidase synthesis. *J. Bacteriol.* 145, 1286 - 1292.

Posorske, L.H. (1984). Industrial-scale application of enzymes to the fats and oil Industry. *JAOCS* 61 (11), 1758 - 1760.

Poulose, A. J; Van Beilen J; Norton S; Gray G; Shew, B; Power, S. (1988). Alteration of substrate specificity of a lipase by site specific mutagenesis. Third Chemical Congress of North America Ontario, Canada. *Pap. Chem. Congr. North. Am.* 3 (2) BTEC 47.

Queener S.W. & Lively D.H. (1986). Screening and selection for strain improvement. *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology* by Demain A.L. & Solomon, N. A. (Eds) USA, 155 - 169.

Ratray, J. M. (1984). Biotechnology and the fats and Oils industry - An Overview. *JAOCS.* 61 (11), 1701 - 1712.

Rowlands, R. T. (1984). Industrial strain improvement mutagenesis and random screening procedures. *Enzyme. Microb. Technol.* 6 (1), 3 - 10.

Rucka, M. and Turkiewicz, B. (1990). Ultrafiltration membranes as carriers for lipase immobilization. *Enzyme Microb. Technol;* 12, 52 -56.

Sánchez, S; Farrés A. (1987). Regulación de enzimas microbianas. *Tecnología Enzimática.* López, A; Quintero, R. (Eds). Universidad Nacional Autónoma de México. México - D. F. 37 - 46.

Sánchez, S. and Quinto C. (1975). D- Glucose isomerase: constitutive and catabolite repression-resistant mutants of *Streptomyces Phaeochromogenes*. *Appl Microbiol.* 30 (5), 750 - 754

Seino, H. and Uchibori, T. (1984) Enzymatic syntethesis of carbohydrate esters of fatty acid (1) esterification of sucrose, glucose, fructose and sorbitol. JAOCS. 61 (11), 1761 - 1765.

Shiio, I. (1982). Metabolic regulation and over-production of aminoacidos
Overproduction of Microbial Product Edited by Krumphanzl, V; Sikyta, B. and Vaněk.
Academic Press. London.

Stanbury, P.F. and Whitaker, A., (1984) Principles of Fermentation Technology.
Pergamon Press. Great Britain. 26 - 87.

Sugihara, A; Shimada, Y. and Tominaga, Y. (1900). Separation and characterization of
two molecular forms of *Geotrichum candidum* lipase. J. Biochem. 107, 426 - 430.

Tombs, M. P. Biotechnology in the Food Industry. Chapter 5. Prentice - Hall. INC. pp.
127 - 146

Tsuchya, K. and Kimura, T. (1984). Decrease of protease scivity by the addition of
glucose to the culture of *Cephalosporium* sp. Ferment Technol. 62 (1) 35 - 39.

Vaněk, Z; Hošťálek, Z. and Spizek, J. (1990). Overproduction of microbial products facts
and ideas. Biotechnol. Adv. (8),1 - 27.

Vining, L.C. and Chatterjee, S.(1982). Catabolite repression and the control of Ssecondary
Metabolism. Overproduction of Microbial Product. Krumphanzl, V; Sikyta, B. and
Vaněk, (Eds) Academic. Press. London. 35 - 46.

Vorderwülbecke, T; Kieslich, K. and Erdmann, H. (1992). Comparison of lipases by
different assays. Enzyme Microb. Technol. 14 (8), 631 - 639.

Wagner, F; Gay, G; and. Debaud. C. J. (1988). Genetical variability of glutamate
dehydrogenase Activity in Monokaryotic and Dikaryotic Mycelia of the Ectomycorrhzal
Fungus *Hebeloma cylindrosporium*. Appl. Microbiol. 28, 566 - 571.

Weinberg, E. D. (1982.) Biosynthesis of Microbial Metabolites - Regulation by mineral
elements and temperature. Overproduction of Microbial Product Sikyta, K.B. and Vaněk,
(Eds) Academic Press. London. 182- 193.

Xu, D; Madrid, P. C; Rohr, M. and Kubicek, P. C. (1989) The influence of type and
concentration of the carbon source on production of citric Acid by *Aspergillus niger*.
Appl. Microbiol Biotechnol. 30: 553 - 558.

Yamaguchi, S; Mase, T. Takeuchi, K. (1991) Cloning and structure of the mono - and diacylglycerol lipase-Encoding Gene from *Penicillium camembertii* U-150. *Gene*. (103) 61 - 67.

Zähner, H. and Kurth. (1982) Over-production of microbial metabolites - The supply of precursors from the intermediary metabolism. *Overproduction of Microbial Product*. by Krumphanzl, V; Sikyta, B. and Vaněk (Eds). Academic Press. London. 167 - 179.