



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

12
ZEU

**OBTENCION DE ENZIMAS LIPOLITICAS DE
Penicillium caseicolum EN FERMENTACION
SUMERGIDA**

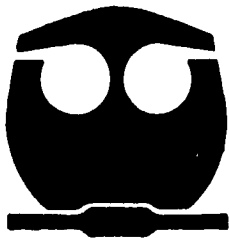
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO DE ALIMENTOS

P R E S E N T A :

RODOLFO CUERVO COSS



MEXICO, D. F.

1995

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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

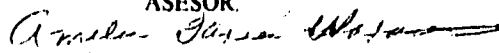
Presidente: Prof. Eduardo Bárzana García.
Vocal: Prof. Raúl Genaro Aguilar Caballero.
Secretario: Profa. Amelia Farrés González-Saravia.
1er. suplente: Profa. María del Carmen Wachter Rodarte.
2do. suplente: Profa. Aurora Irma Ortigón Avila.

TRABAJO QUE SE DESARROLLO EN EL:

LABORATORIO 312 DEL CONJUNTO "E" DE LA FACULTAD DE
QUIMICA DE LA UNAM.

Para la realización de este trabajo se contó con beca de tesis de DGAPA..

ASESOR.


Amelia Farrés González-Saravia.

SUSTENTANTE


Rodolfo Cuervo Coss.

DEDICATORIAS.

A MI TIA RAQUEL. POR LA GRANDEZA QUE EXHIBE EN TODO MOMENTO.

A MI FAMILIA, EN ESPECIAL A MIS HERMANOS.

A CLAUDIA, QUIEN NO NECESITA PALABRAS ESPECIALES, POR TODO LO ESPECIAL QUE ES.

A FERNANDO ESTRADA... AUNQUE NO NECESARIAMENTE.

A LOS LOBOS ...EN ESPECIAL LOS ESTEPARIOS.

AGRADECIMIENTOS.

A Amelia, por su amistad y la confianza depositada en mí.

A Ismael, Fabián, Iliana, René, Armando, Noé y Miguel Ángel.

A MIS AMIGOS Y COMPAÑEROS DEL LABORATORIO: Adelfo, Jesús, Laura, Alicia, Ma. Luisa, Enrique, Maricarmen, Lety (García, L.), Elsa, Mónica, Idalia, La doctora Amanda Galvez, Maru, Norma Camacho y Norma Oviedo.

A mis Maestros y Sinodales por brindarme sus conocimientos.

A mis amigos.

A la UNAM y de manera muy especial a la Facultad de Química.

INDICE:	Página.
ÍNDICE	i
RESUMEN	ii
CAPITULO I. INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO II. ASPECTOS GENERALES DE LAS LIPASAS	17
CAPITULO III. OBJETIVOS	35
CAPITULO IV. MATERIAL Y MÉTODOS	39
CAPITULO V. RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS	51
CAPITULO VI. CONCLUSIONES	68
CAPITULO VII. RECOMENDACIONES	70
CAPITULO VIII. BIBLIOGRAFÍA	71
APENDICE	80

RESUMEN.

El objetivo del presente trabajo es incrementar la producción de enzimas lipolíticas del hongo *Penicillium caseicola* mediante la manipulación de elementos del medio de cultivo empleando diseños estadísticos 2^k factoriales.

Se tomó como base el medio D para hongos filamentosos descrito por Celerin y Fergus (1971). Se probaron como fuentes de carbono glucosa, dextrina y almidón y se encontró que la mejor para la producción de lipasas es la dextrina, ya que incrementa la producción en un 33%, mientras que la mejor fuente de nitrógeno para el mismo fin resultó ser la peptona al compararse con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y casaminoácidos. Se probó el efecto de diversas combinaciones de elementos traza y la formulación consistente en NaCl, ZnSO_4 , CaCO_3 y MnSO_4 resultó tener un efecto positivo en la producción de enzimas lipolíticas con un incremento de 147.40%. Se obtuvo igual resultado al evaluar el magnesio a nivel de macroelemento. Al eliminar el aceite de olivo de la formulación del medio de fermentación, no se detectó actividad lipolítica, lo cual indica que la enzima es inducible. El nitrato como fuente complementaria de nitrógeno diluye el efecto inductor del aceite de olivo. El calcio aparentemente no tiene ningún efecto sobre la actividad lipolítica pero sí sobre la actividad proteolítica. El estudio de las variables en conjunto indicó que tanto el porcentaje de la fuente de carbono como la de nitrógeno debían incrementarse, mientras que los de magnesio y aceite de olivo debían disminuirse. Con este trabajo se logró un incremento del 158.0% en la producción de lipasas.

INTRODUCCION.

Generalidades.

Las enzimas son proteínas producidas por una célula viva, que catalizan o accionan una reacción. Estas unidades funcionales del metabolismo celular actúan en secuencias organizadas y catalizan los centenares de reacciones escalonadas mediante las que las moléculas de los principios nutritivos se degradan, aquellas en que se conserva la energía química y se transforma y aquellas en que se sintetizan las macromoléculas de la célula a partir de precursores sencillos. La velocidad de reacción de la enzima es proporcional al proceso bioquímico para mantener viva a la célula.

La enzimología, así como las tecnologías que emplean enzimas, pertenecen a la era moderna; sin embargo, el uso de enzimas para la producción de alimentos se remonta a varios milenios atrás. El vino, por ejemplo, lo conocían los egipcios y los asirios 3000 años antes de Cristo, pero fue sólo hasta nuestro siglo cuando se descubrieron las reacciones que daban lugar a la fermentación. No es sino hasta 1752 que el papel de las enzimas como tales se establece al realizarse los primeros estudios por parte de Reaumur y más tarde, en 1783 por Spallanzani, sobre el proceso de la digestión en el estómago. En 1860 Luis Pasteur estableció las primeras bases de la enzimología para ser considerada ya como una ciencia, al afirmar que los procesos fermentativos son catalizados por enzimas y postular que éstas se encontraban ligadas de manera íntima con la estructura y función de los microorganismos. La ingeniería enzimática se inicia como tal en el siglo pasado,

cuando Takamine patentó las amilasas (diastasa) producidas por hongos en fermentación sólida y Hansen inició, en 1875, una empresa para la extracción de renina de ternera.

En 1879 E. Buchner demostró que la función catalítica de las enzimas no se encontraba ligada a la estructura celular, al realizar una fermentación alcohólica con un extracto celular. En 1926 J.B. Sumner, al aislar la enzima ureasa, descubrió la naturaleza proteica de las enzimas, pero este hecho no fue aceptado sino hasta el periodo comprendido de 1930-1936 cuando Northrop logra cristalizar la pepsina y la quimotripsina (López-Munguía, 1987).

Hoy en día más de 2500 enzimas han sido oficialmente reconocidas por la International Union of Biochemistry y se ha especulado que por lo menos existen otras 25 000 enzimas más, de las cuales aún no se sabe nada (Niedleman, 1991).

El desarrollo de la enzimología industrial se ha centrado principalmente en la explotación de las enzimas hidrolíticas que se han utilizado para degradar materiales como el almidón, proteínas y otros muchos polímeros. Las áreas en las cuales se ha vuelto cotidiano su uso aumentan constantemente y es por tal demanda que los científicos de todas partes de mundo se han abocado a la tarea de mejorar tanto su producción como su eficiencia, ya sea mejorando las condiciones de producción, de reacción o modificando su estructura.

El hecho de que se efectúen estudios sobre las aplicaciones de las enzimas y sus fuentes de obtención, se basa en las cualidades que presentan y que de manera muy general son las siguientes:

- ◆ Son muy específicas.
- ◆ La velocidad de reacción es de dos a tres órdenes de magnitud mayor que la de los catalizadores inorgánicos.
- ◆ Las condiciones de reacción, temperatura y presión relativamente bajas, hacen que su uso sea poco costoso.
- ◆ Pueden catalizar reacciones que no ocurren de manera natural, con sustratos sintéticos (Klibanov, 1988)

Además, los adelantos en diversas áreas han permitido que las enzimas tengan más aplicaciones porque:

- ◆ Se pueden producir fácilmente en gran cantidad y adecuadas a las necesidades que se requieran mediante técnicas genéticas.
- ◆ Se pueden reutilizar mediante técnicas de inmovilización.
- ◆ Se pueden realizar reacciones de síntesis en varios pasos, con lo cual se puede obtener varios productos de interés (López-Munguía, 1987).
- ◆ Su actividad catalítica es fácilmente controlada (Klibanov, 1988).

Por otro lado, para que las enzimas sean útiles y por lo tanto utilizables comercialmente deben hacer que un producto elaborado mediante su empleo tenga algunas de las siguientes ventajas:

- ◆ Que su calidad sea superior a la del producto tradicional.
- ◆ Que sea más útil en sus aplicaciones.

- ♦ Que sea más barato, lo que puede conseguirse indirectamente por ejemplo, disminuyendo los costos de operación y/o equipo requerido.
- ♦ Que mediante las enzimas se puedan obtener productos que antes no existían o sólo en cantidades limitadas debido a su reducida disponibilidad a partir de fuentes naturales. (Wiseman, A. 1985)

Las enzimas, como biocatalizadores orgánicos que son, se obtienen de una gran variedad de sistemas biológicos, ya sean éstos microscópicos o macroscópicos. Es necesario aclarar que sólo los microorganismos reconocidos como "seguros" se pueden utilizar en la producción de enzimas aplicables en la Industria de los Alimentos (Tabla No. 1) ya que se asume que no son capaces de generar subproductos tóxicos o que deriven en ellos. Es por ello que el interés por la explotación de dichos microorganismos y sus enzimas es cada vez mayor en el campo alimenticio. Además, su uso conviene porque no es necesario tener cuidados adicionales por su uso

Tabla 1. Algunas Aplicaciones de Enzimas en Alimentos.

ALIMENTO	ENZIMAS	FUENTE	USO
Pan	Amilasas y proteasas	Microbiana y vegetal	Horneado
Cerveza	Amilasas y proteasas	Animal, microbiana y vegetal	Pruebas de frío y remoción de oxígeno
Bebidas carbonatadas	Glucosa-oxidasa	Microbiana	Remoción de oxígeno
Chocolate	Amilasa	Microbiana	Elaboración de jarabe
Jugos de fruta	Pectinasas	Microbiana	Clarificación
Carne	Proteasas	Microbiana y vegetal	Ablandado de carne
Vino	Pectinasa	Microbiana	Clarificación

Fuente: Niedleman (1991).

En la actualidad existe una tendencia muy marcada hacia el uso de enzimas de origen microbiano en lugar de las de origen animal o vegetal, debido no sólo a que aquéllas son de más fácil obtención, sino que además es más probable que posean propiedades que las hagan más adecuadas para los procesos, como la termoestabilidad, resistencia a las fluctuaciones de pH, presión, fuerza iónica, etcétera. Por otra parte, los microorganismos exhiben ciertas ventajas sobre los organismos macroscópicos como:

- ♦ Son fácilmente manipulables.
- ♦ Se requiere relativamente poco espacio para su cultivo.
- ♦ Pueden optimizarse los medios de cultivo y aumentar la producción de metabolitos.
- ♦ Se puede mejorar la producción por ingeniería genética o mutagénesis.
- ♦ Obtención de producto en menor tiempo, ya que tienen ciclos de vida mucho más cortos.
- ♦ Su extracción es más sencilla y requiere menos tiempo.
- ♦ Pueden sobreproducir enzimas mediante el incremento del número de genes que codifican para su síntesis.
- ♦ Los costos de producción y mantenimiento son casi siempre menores

Otras razones para utilizar microorganismos como fuentes de enzimas son las siguientes:

- ♦ Las fermentaciones enzimáticas a gran escala son económicas debido a su corta duración y medios de cultivo económicos.
- ♦ Los procedimientos de aislamiento son simples y se pueden probar muchos medios en poco tiempo.

- ♦ Diferentes especies producen enzimas diferentes que catalizan la misma reacción, permitiendo flexibilidad con respecto a las condiciones de operación en un reactor (Wang, 1979).

Para la obtención de dichas enzimas existen técnicas de selección y aislamiento de organismos interesantes y una vez que se ha logrado obtener una cepa pura, pueden aplicarse métodos de mejoramiento en cuanto a la producción y purificación del producto

La mayoría de estas enzimas actúan dentro de las células, es decir, dentro de un ambiente aislado en donde gozan de cierta protección y se les denominan enzimas intracelulares; sin embargo, algunas de ellas son excretadas hacia el medio. La función de dichas enzimas, denominadas extracelulares, es hacer más accesibles los nutrientes para el microorganismo mediante la hidrólisis de compuestos de alto peso molecular que de otra manera no podrían introducirse a la célula. Debido a que estas enzimas se encuentran en el medio que rodea a la célula, fuera de la protección de la membrana celular, son estables a variaciones físicas y químicas del ambiente en el que se encuentran; sin embargo, por las mismas razones pueden perderse con facilidad y es por ello que los microorganismos deben producirlas en grandes cantidades y de manera constante. Por otro lado, en los procesos de recuperación, además de la etapa adicional de ruptura celular, un extracto crudo de una enzima intracelular contiene al menos 1500 enzimas además de otras proteínas, mientras que el de una enzima extracelular sólo contiene unas cuantas. A este respecto cabe señalar que la aplicación de células enteras evita la costosa recuperación y purificación de las enzimas de interés y es por ello que se ha desarrollado toda una tecnología de inmovilización de células. Por todo lo anteriormente citado, es razonable

pensar que las enzimas extracelulares son más atractivas para el uso industrial y se prefieren a las intracelulares.

Aspectos Generales de las Fermentaciones.

Definición.

Se puede definir como fermentación aquellos procesos en los cuales los microorganismos, bajo condiciones adecuadas y en presencia de nutrimentos, producen diversos metabolitos como consecuencia de su desarrollo.

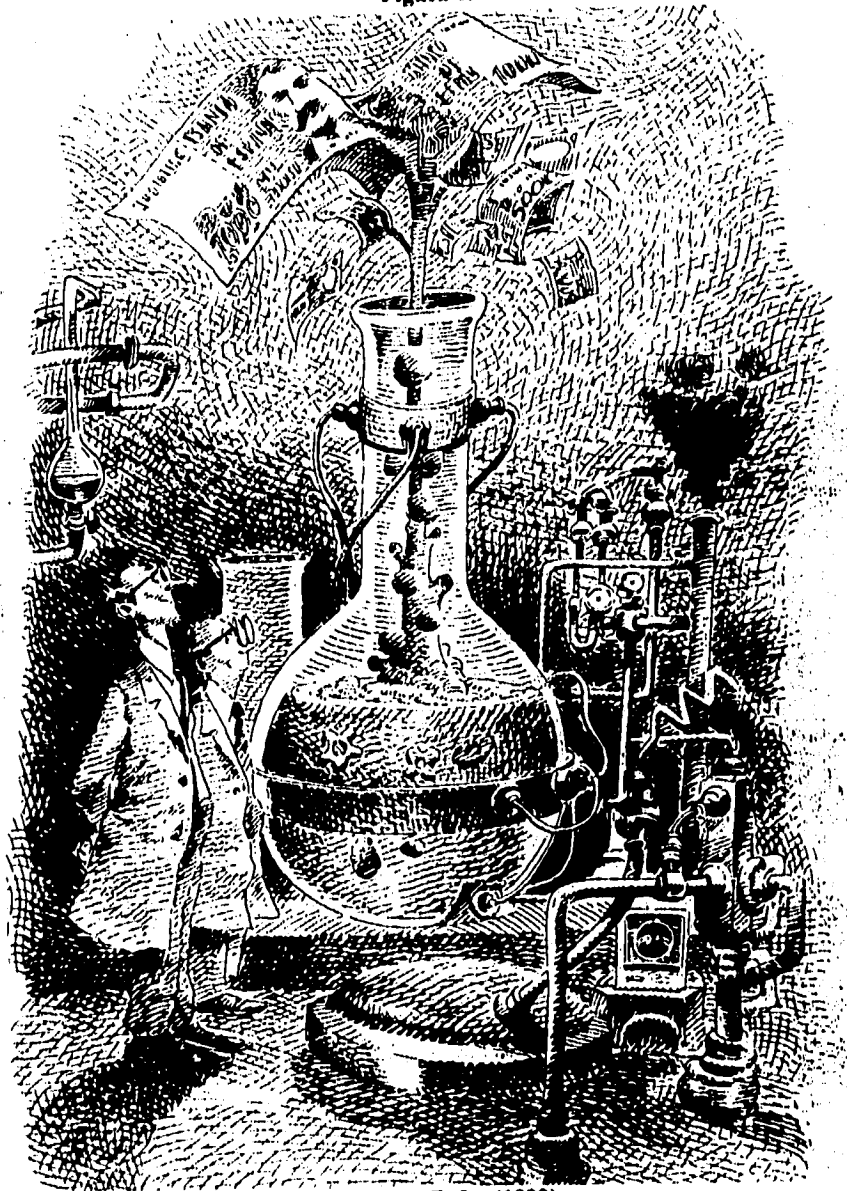
Para que se lleve a cabo una fermentación, las condiciones ambientales y fisiológicas deben ser optimizadas para alcanzar la máxima producción. Tanto el tipo de producto como la fisiología del microorganismo determinarán las condiciones ambientales, incluyendo el medio de cultivo, pH, temperatura, agitación y aereación, también como el modo de fermentación y las condiciones del inóculo (Bodie, 1989).

El medio de fermentación debe contener fuentes de carbono asimilables, fuentes de nitrógeno, azufre, fósforo, elementos traza y otros factores específicos de crecimiento que el microorganismo es incapaz de producir. A menudo estos factores no son conocidos y son suplementados con fuentes complejas de nutrientes como la peptona, extracto de levadura y otras posibilidades.

Diseño de un Medio de Fermentación.

Cuando se desarrolla un proceso de fermentación industrial, el diseño del medio de fermentación es de importancia crítica, ya que de este medio depende el rendimiento del producto, la producción volumétrica y la formación de otros metabolitos que en la mayoría de los casos no se desean. Es también importante reducir los costos del medio tanto como sea posible, ya que esto afecta al proceso en el aspecto económico que siempre es determinante para la realización del proyecto. Por lo anterior, las compañías dedicadas a la fermentación continuamente tratan de mejorar sus medios. Dichas compañías deben hacer esto muy frecuentemente debido a que nuevas cepas y mutantes son constantemente introducidas y cada una requiere sus propias condiciones para desarrollarse (figura No. 1).

Figura 1.



Fuente: Zafrá (1992).

El diseño de un medio de cultivo puede dividirse en cuatro etapas, siendo la primera el "screening" de experimentos. En esta etapa es donde se evalúan un gran número de componentes del medio para ver cuáles son los que dan mejores resultados. El cambio de un componente a la vez en el medio es la técnica más comúnmente empleada y que a pesar del inconveniente de no contemplar interacciones es la que mejores resultados da. El "screening" usualmente se lleva a cabo al comienzo del diseño del proceso, pero aún después de haber obtenido un medio comercialmente "exitoso" el "screening" debe continuarse asumiendo que un nuevo componente puede encontrarse y que gracias a éste se incrementa de manera drástica la producción. Adicionalmente, se puede probar el mover las concentraciones del medio ya mejorado con el fin de obtener un nuevo máximo en la producción.

La segunda etapa del proceso consiste en mapear el espacio de optimización con el objeto de obtener una imagen tan completa como sea posible del efecto de cada componente en el medio. En esta etapa es común el empleo de diseños factoriales que contemplan interacciones entre componentes del medio pues se evalúa cada combinación posible.

Después de que el espacio de optimización ha sido investigado, la tercera etapa involucra la identificación de la región óptima de perfeccionamiento. Usualmente esto se realiza con el empleo de métodos matemáticos como la regresión lineal y el análisis de varianza.

Por último, y cuando la composición óptima del medio ha sido predicha, la cuarta etapa del proceso involucra examinar esta región óptima en detalle (Kennedy, 1994)

Tipos de Fermentaciones.

En términos generales, de acuerdo a la concentración de agua en el medio, existen dos tipos de condiciones por las cuales pueden llevarse a cabo las fermentaciones: el cultivo sumergido y el cultivo en estado sólido.

Cultivo en Estado Sólido.

El cultivo en estado sólido, comúnmente llamado "Fermentación sólida" es la forma original de producción de enzimas en los países orientales. Este tipo de fermentación presenta la cualidad de obtener gran cantidad de producto por unidad de volumen de fermentación, ya que no ocurre el fenómeno de dilución por efecto del agua, por encontrarse absorbida dentro de la matriz sólida. Cuando ha terminado el proceso de fermentación, se lleva a cabo una extracción de las enzimas extracelulares, las soluciones que se obtienen presentan altas concentraciones de producto. Otras ventajas adicionales que presenta esta técnica son los menores consumos energéticos y la baja contaminación de aguas residuales.

Las fermentaciones sólidas se llevan a cabo en capas delgadas sobre charolas, en lechos profundos, en sistemas con agitación o en tambores rotatorios, empleando soportes tan variados como el salvado de trigo, resinas de intercambio iónico, bagazo de café, corteza de maple, etcétera.

Tipos de Fermentaciones.

En términos generales, de acuerdo a la concentración de agua en el medio, existen dos tipos de condiciones por las cuales pueden llevarse a cabo las fermentaciones: el cultivo sumergido y el cultivo en estado sólido.

Cultivo en Estado Sólido.

El cultivo en estado sólido, comúnmente llamado "Fermentación sólida" es la forma original de producción de enzimas en los países orientales. Este tipo de fermentación presenta la cualidad de obtener gran cantidad de producto por unidad de volumen de fermentación, ya que no ocurre el fenómeno de dilución por efecto del agua, por encontrarse absorbida dentro de la matriz sólida. Cuando ha terminado el proceso de fermentación, se lleva a cabo una extracción de las enzimas extracelulares, las soluciones que se obtienen presentan altas concentraciones de producto. Otras ventajas adicionales que presenta esta técnica son los menores consumos energéticos y la baja contaminación de aguas residuales.

Las fermentaciones sólidas se llevan a cabo en capas delgadas sobre charolas, en lechos profundos, en sistemas con agitación o en tambores rotatorios, empleando soportes tan variados como el salvado de trigo, resinas de intercambio iónico, bagazo de café, corteza de maple, etcétera.

El cultivo semisólido posee ciertas desventajas que podrían, en determinado momento, ser limitantes para su consideración en la obtención de ciertas enzimas, en especial las intracelulares. En dicho cultivo es muy difícil el control de las condiciones ambientales que influyen en la producción como gradientes y variaciones de pH, temperatura, humedad, etc., además, existen dificultades para la esterilización y la fermentación es frecuentemente limitada por fenómenos de transferencia de masa. También ocurre a menudo que un microorganismo que produce un determinado producto por fermentación sumergida, no es capaz de hacerlo en fermentación semisólida (Iwai, 1984). Por otra parte, aunque muchos microorganismos pueden crecer en sustratos sólidos, sólo los hongos filamentosos poseen la capacidad para degradarlos eficientemente en ausencia del agua libre que resulta necesaria para la propagación de organismos unicelulares.

Cultivo Sumergido.

Se entiende por este tipo de cultivo al sistema en el cual tanto los nutrientes como el microorganismo se encuentran en fase acuosa. La casi totalidad de las enzimas producidas en el mundo occidental provienen de procesos de fermentación en cultivo sumergido.

Este tipo de cultivo presenta una gran ventaja sobre el cultivo semisólido y es la homogeneidad de temperatura, de pH o de concentración de nutrientes en el sistema. Por otra parte no existe limitación en el uso de microorganismos en este tipo de cultivo. Por

último, las posibles desviaciones al proceso son corregidas más rápida y fácilmente, lo cual asegura una menor desviación en el mismo

Generalmente, el pH y la temperatura óptima de crecimiento del microorganismo coinciden con los de producción de las enzimas de interés. Sin embargo éste no es siempre el caso y es entonces necesaria la búsqueda de las condiciones a las cuales se obtenga un mayor rendimiento de los productos deseados. La regulación del pH puede evitarse en ciertos casos con el empleo de un sistema amortiguador en el medio de cultivo en la zona de máxima productividad.

Características de los Hongos Utilizados Industrialmente.

Los hongos comprenden un grupo de organismos eucariotes que se encuentran unidos por un número de características comunes tanto de nutrición y de reproducción como de morfología. Poseen un sistema no fotosintético de absorción de nutrientes y un estado trófico micelial que distingue adecuadamente a los hongos de otros grupos, debido a ello, es universalmente aceptado el considerar a Fungi como un reino aparte de todos los demás.

Se estima que el número de especies de hongos varía de 100,000 a 250,000, pero actualmente sólo 65,000 especies han sido reconocidas y entre ellas únicamente algunas han sido explotadas para fines industriales (Berry, 1988). No obstante lo anterior, la tendencia actual es a incrementar su uso, ya que se sabe que la mayoría de las enzimas producidas por los hongos son extracelulares y por ello fácilmente separables del micelio

por filtración o centrifugación (Iwai, 1984). La conveniencia del empleo de dichas enzimas ya ha sido explicada anteriormente. Algunos ejemplos de hongos empleados en cultivos sumergidos se muestran en la tabla No. 2.

Tabla 2. Algunos Hongos Empleados en Cultivos Sumergidos.

MICROORGANISMO.	NOMBRES COMUNES.	REFERENCIA.
<i>Agaricus</i>	Hongo común edible	Labaneiah et al. (1977).
<i>Psalliota</i>	Champiñón, hongo blanco.	Dijkstra, Scheffers y Wiken (1972).
<i>Lentinus edodes</i>	Hongo chino, forestal.	Song y Cho (1987).
<i>Volvariella volvacea</i>	Hongo chino u Straw	Atacador-ramos et al. (1967).
<i>Flammulina velutipes</i>	Hongo de invierno.	Dudka, Bukhalo y Solomko (1980).
<i>Pleurotus</i>	Hongo ostión	Tawian y Martin (1987).
<i>Boletus edulis</i>	Hongo porcino.	Eydergen y Scheffers (1972).
<i>Morchella</i>	Hongo Morel.	Litchfield y Overbeck (1963).
<i>Cantharellus</i>	Hongo Chantrelle.	Worgan (1968).
<i>Tuber</i>	Truffa.	
<i>Collybia</i>	Rooting collybia.	
<i>Pholiota</i>	Nameko, hongo de invierno.	Hashida et al. (1967).
<i>Lepiota naucina</i>	Smooth lepiota	Sugigara y Humfeld (1954).
<i>Armillaria mellea</i>	Hongo de miel, "oak mushroom".	Bourengh, Fraser y Lindberg (1967).
<i>Coprinus</i>	Glistening, shaggy mane.	Dijkstra (1976).
<i>Calviata</i>	Puffballs.	Zarudnaya (1971)Dijkstra (1976).
<i>Pholiota mutabilis</i>	Pholiota mutable.	
<i>Tremella fuciformis</i>	Oreja plateada, Jelly mushroom.	
<i>Auricularia</i>	Hongo oreja, oreja de árbol.	Espenshade y Griffith (1966).
<i>Amanita caesarea</i>	Hongo de César.	Torev (1968).
<i>Repiota procera</i>	Hongo Parasol.	
<i>Tricholoma</i>	Hongo caballero amarillo.	Reusser, Spencer y Sallans (1958).

Fuente: Goldberg y Williams (1991).

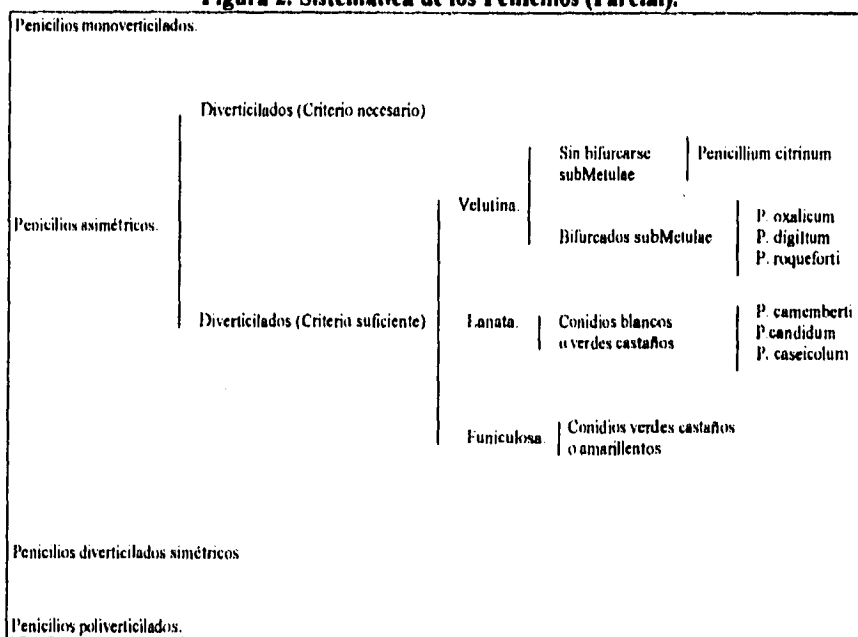
La propagación de hongos comestibles en cultivos sumergidos se desarrolló inicialmente en los 50's; pero el primer reporte que se tiene de cultivos de hongos filamentosos en fermentaciones sumergidas data del año de 1948 por Humfeld. Desde entonces, algunos intentos han sido realizados por investigadores para el cultivo comercial de estos hongos en fermentaciones sumergidas y de ello varias aplicaciones industriales han sido investigadas, como:

- ❖ Uso de hongos filamentosos para el consumo humano y animal como alimento y como agentes saborizantes de hongos.
- ❖ Uso de esporas para el cultivo de cuerpos frutales de los hongos.
- ❖ Producción de sustancias químicas específicas.
- ❖ Producción de compuestos terapéuticos. (Goldberg, 1991).

El Género *Penicillium*.

El género *Penicillium* incluye aproximadamente 150 especies diferentes y está dividido en cuatro secciones de acuerdo a la estructura que presenten en sus conidios conocidos como cepillos o penicilios (figura No.1). Los penicilia no bifurcados y asimétricos son los más numerosos y se subdividen de acuerdo a la apariencia del tallo en *velutina*, *fasciculata*, *funiculosa* y *lanata*. En esta última subdivisión está comprendido *Penicillium caseicolum* y anteriormente se le denominaba también *Penicillium candidum* sin embargo, se ha demostrado que se trata de hongos diferentes (Allur, 1990).

Figura 2. Sistemática de los Penicilios (Parcial).



Fuente: Kunz (1986).

ASPECTOS GENERALES DE LAS LIPASAS.

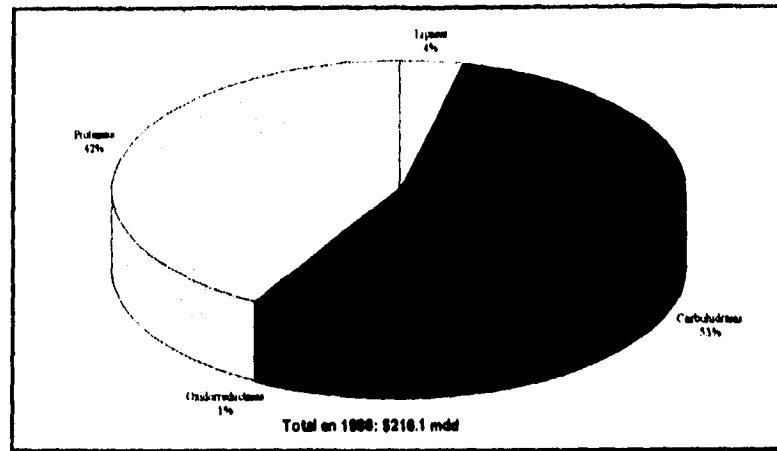
Definición.

Las enzimas responsables de la hidrólisis de grasas y aceites previa a su digestión por los organismos son las lipasas extracelulares, las cuales se clasifican como glicerol-éster-hidrolasas o triacilglicerol acilhidrolasas (EC 3.1.1.3.)

Las lipasas son enzimas que hidrolizan el enlace éster de los acil-lípidos que se encuentran emulsionados; son activas en la interfase agua-lípido, y sólo atacan la superficie de los glóbulos de grasa que están en contacto con la fase acuosa y no el interior de los mismos. Se diferencian de las esterasas en que estas últimas solamente escinden ésteres solubles en el agua (Rapp, 1992) dando como posibles productos ácidos grasos libres, glicéridos parciales y glicerol; en cualquiera de los casos, la reacción es reversible.

Situación de las Lipasas en el Mercado.

El 80% del total de enzimas producidas en los Estados Unidos pertenecen al grupo de las hidrolasas y de éstas se estima que las enzimas lipolíticas representan un 10% del total (Cottle, 1987), por otra parte, se sabe que en 1988 representaron el 3.7% del mercado total de enzimas (figura No.2) que a su vez representó 216.1 millones de dólares (Anónimo, 1990).

Figura 3. Mercado de las Enzimas en la Industria de Alimentos.

Fuente: Anónimo en Food Engineering (1990)

Enzimas en Solventes Orgánicos.

Una posibilidad de crecimiento del mercado de las lipasas, es la característica de poder trabajar en solventes orgánicos además de poder hacerlo en soluciones acuosas, conservando en algunos casos hasta el 100% de su actividad. Esto representa ciertas ventajas sobre otras enzimas por que:

- ◆ Debido a que las enzimas son insolubles en solventes orgánicos, su recuperación para su posterior utilización es fácil.
- ◆ Con lo anterior se elimina la necesidad de inmovilización.
- ◆ El agua a menudo participa en reacciones indeseables como la hidrólisis de anhídridos ácidos y halogenados.
- ◆ El equilibrio termodinámico de muchos procesos deseados es desfavorable en medio acuoso como la síntesis de ésteres de ácidos carboxílicos y alcoholes.

- ◆ La recuperación de producto en soluciones orgánicas es menos difícil y por ello más económica.
- ◆ Las enzimas pueden ser mucho más estables en solventes orgánicos que en agua a temperaturas extremas.
- ◆ Los problemas de contaminación microbiana se ven notablemente reducidos (Klibanov, 1986).

Localización de las Lipasas.

Las lipasas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, ya que se presentan en la leche, semillas oleaginosas, cereales, frutas y hortalizas, fluidos biológicos, diversos órganos y en el tracto intestinal de los animales, en donde se han identificado lipasas pancreáticas, esterasas pregástricas y lipasas linguales. Las fuentes más importantes de estas enzimas son preparaciones provenientes del estómago de carneros, corderos y terneros; dichas preparaciones se encuentran disponibles comercialmente provenientes de diversas casas comerciales. En el mercado también se encuentran disponibles de manera comercial algunas lipasas de microorganismos, como se puede ver en la Tabla No.3.

Tabla 3. Algunas Enzimas Lipolíticas Comercialmente Disponibles.

MICROORGANISMO	REFERENCIA
<i>Pseudomonas fragi</i>	Lu, J. (1961)
<i>Alcaligenes sp.</i>	Kokusho, Y. (1982)
<i>Chromobacterium viscosum</i>	Isobe, M. (1985)
<i>Rhizopus delemar</i>	Iwai, M. (1974)
<i>Aspergillus niger</i>	Fukumoto, J. (1963)
<i>Candida cylindracea</i>	Tomizuka, N. (1966)

Fuente: Sztajer (1988).

Aunque se ha encontrado que el género *Pseudomonas* es el mejor productor de lipasa en lo que respecta a rendimiento volumétrico (Rapp, 1992; Sztajer, 1988) se tiene el

inconveniente de que es patógeno para el ser humano. Debido a esto, se prefiere utilizar otros microorganismos que, si bien no son tan buenos productores de lipasas, por lo menos no son patógenos. A este respecto, cabe resaltar la importancia de los hongos, pues la mayoría de los conocidos y empleados no son patógenos del hombre y exhiben una actividad lipolítica bastante aceptable (Rapp, 1992).

Especificidad de las Lipasas.

Como la lipólisis ocurre en la interfase agua-lípido, la velocidad de hidrólisis de los enlaces éster es función del área superficial del sustrato en la mezcla de reacción. Sin embargo, la superficie "disponible" varía de sustrato a sustrato debido a las diferentes propiedades fisicoquímicas que manifiestan. Por consiguiente, la comparación de la velocidad de hidrólisis para diferentes sustratos y la determinación real de la especificidad de las lipasas hacia el sustrato es difícil y varía de método a método. (Tabla No. 4).

La capacidad de catalizar la hidrólisis de ácidos grasos insolubles y de cadena larga distingue a las lipasas de otras esterasas que catalizan la hidrólisis de ésteres solubles en preferencia a los insolubles (Godfredsen, 1990).

Entre las lipasas que son producidas por microorganismos hay gran especificidad, pues se conoce por ejemplo, la existencia de una que sólo hidroliza los ácidos grasos con un doble enlace cis en posición 9, mientras que la lipasa de *Candida parapolytica* presenta una actividad elevada para triacilgliceroles con ácidos grasos C8 y *Mucor lipolyticus* con ácidos grasos C4-C12 (Höfelmann, 1985).

Las lipasas se pueden dividir en dos grupos de acuerdo a su especificidad acilglicerol. El primer grupo corresponde a las enzimas que liberan ácidos grasos sustituyentes en las tres

posiciones de la molécula del triacilglicerol sin distinción. En este caso la hidrólisis es completa y se liberan al medio tres moléculas de ácidos grasos y una de glicerol (Godtfredsen, 1990).

Tabla 4. Actividad Relativa de la Lipasa de *Penicillium caseicolum* con Lípidos Naturales y Artificiales.

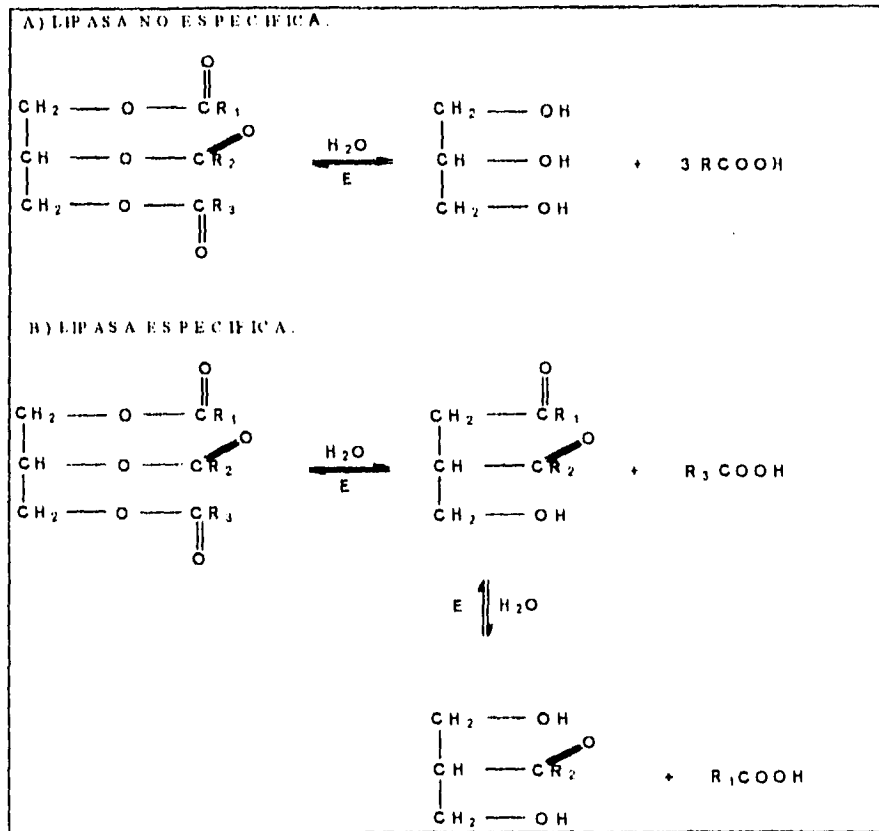
LIPIDO	VELOCIDAD RELATIVA DE HIDROLISIS
Tributirina	100
Tricaproina	47
Tricaprilina	40
Triestearina	23
Trioleina	26
Trilaurina	34
Trimiristina	16
Tripalmitina	9
Aceite de Maíz	34
Aceite de Girasol	33
Aceite de Almendras	29
Grasa Butírica	24
Aceite de Oliva	18

Fuente: Alhir (1990).

El segundo grupo lo constituyen las lipasas que liberan preferentemente a los ácidos grasos de las posiciones 1 y 3. Los di y monoacilgliceroles son acumulados normalmente ya que la velocidad con que son hidrolizados es menor que la de los triacilgliceroles. Figura No.3

Sin embargo, los 2-monoacilgliceroles son inestables y el grupo acilo tiende a migrar a las posiciones 1 y 3 para dar el 1 o 3-monoacilglicerol y ser posteriormente hidrolizado hasta glicerol y ácidos grasos libres (Godtfredsen, 1990).

Figura 4. Reacciones Catalizadas por Lipasas.



Regulación de la Síntesis de Enzimas Lipolíticas.

La regulación efectiva de los sistemas enzimáticos asegura que la célula sólo sintetizará aquella o aquel grupo de enzimas necesarias y en las concentraciones adecuadas, y que una vez sintetizadas puede controlarse la actividad de las mismas. Todo ello se realiza con el fin de mantener viva a la célula evitando un gasto innecesario de energía y sustratos útiles. En los sistemas microbianos se han identificado y caracterizado diversos mecanismos

(Tabla No. 5) que desempeñan un papel fundamental en la regulación del metabolismo general y que pueden catalogarse dentro de dos grupos: el primero lo forman aquéllos que afectan la concentración de enzimas y el segundo aquéllos que afectan la actividad de las mismas (Sánchez y Farrés, 1987)

Tabla 5. Mecanismos Regulatorios del Metabolismo General.

Activación
Inactivación catabólica
Inducción
Inhibición por producto
Modulación catabólica
Permeabilidad
Regulación por carga energética
Regulación por enzimas
Regulación de vías cruzadas
Regulación de la síntesis de RNA por aminoácidos
Represión catabólica
Represión nitrogenada
Represión por producto
Represión transitoria

Fuente: Sánchez y Farrés (1987).

La regulación de la producción de enzimas fungales parece deberse en gran parte a las proteasas que produce el microorganismo. La actividad de estas enzimas parece incrementarse en varios órdenes de magnitud cuando las células entran en la fase estacionaria, lo cual se ha postulado ocurre con ayuda de la represión por glucosa (Berry, 1988). El efecto de las proteasas sobre las lipasas se estudió mediante la incubación de preparaciones puras de ambas enzimas provenientes de *R. delemar*. Esto resultó en una rápida inactivación de la lipasa, lo cual sugiere que la lipasa es degradada por la proteasa. Evaluaciones posteriores con lipasas provenientes de diferentes microorganismos como *Pseudomonas* mostraron resultados semejantes (Iwai, 1984; Gilbert, 1991).

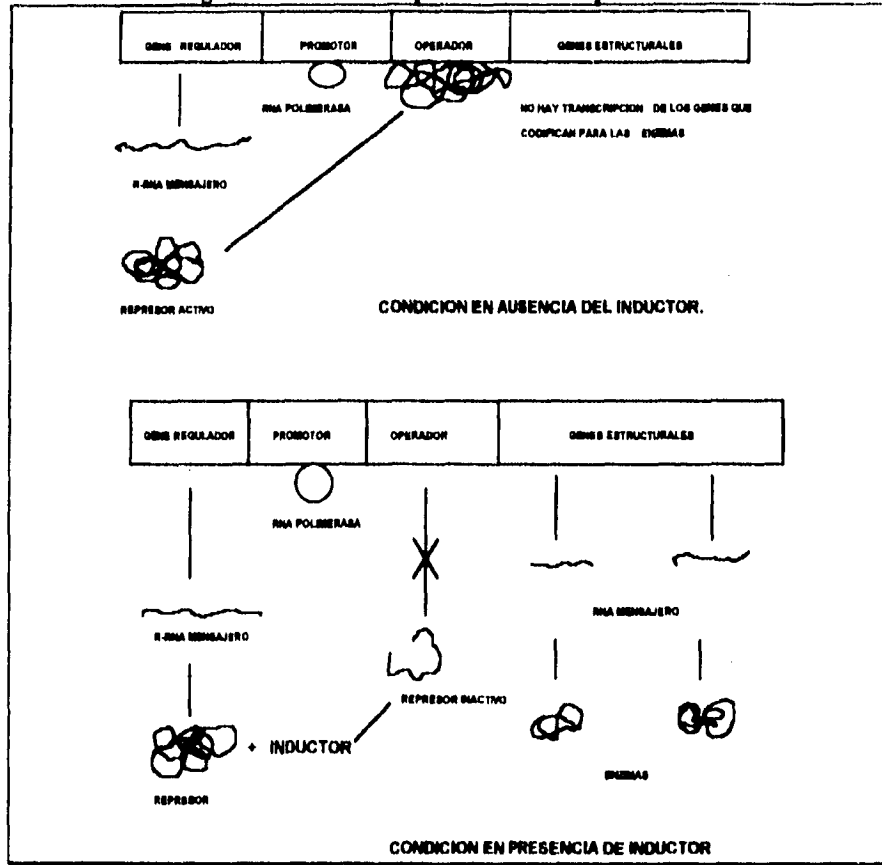
La actividad de las lipasas también es regulada por el sustrato. Dicha inhibición es el resultado de las interacciones entre el sustrato insoluble y la lipasa, y como ésta actúa en la interfase, se piensa que la inhibición ocurre también a ese nivel (O'Connor, 1988). Por otro lado, la actividad de algunas lipasas como la pancreática porcina, se encuentra regulada por álcalis, metales alcalinotérreos, cofactores proteicos llamados colipasas y sales biliares, que inducen cambios conformacionales en las mismas (O'Connor, 1988).

La producción de un buen número de enzimas puede propiciarse mediante el uso de inductores. La inducción enzimática puede definirse como el aumento relativo en la tasa de síntesis de una enzima, ocasionada por la presencia o ausencia de una sustancia conocida como inductor. Este mecanismo permite una rápida respuesta para la síntesis de la enzima, cuando ésta se necesita. La mayoría de los inductores son sustratos o productos de enzimas catabólicas, aunque también pueden ser sus análogos estructurales.

El ejemplo mejor conocido de inducción es el del operón de lactosa para *E. coli* descrito por vez primera en 1961 por Jacob y Monod (Figura No.4). Es importante mencionar que los hongos no poseen operones y que el fenómeno de inducción aún no está bien comprendido.

Algunas lipasas microbianas extracelulares son inducibles por la adición de lípidos al medio de crecimiento, como el aceite de olivo y la grasa butírica (Petrovic, 1990 y Jacobsen, 1989). Alhir y col. (1990) suplementan el medio de cultivo con 1% de aceite de maíz para cultivar a *P. caseicolum*, mientras que Sztajer y col. (1988) lo hacen con 1% de tributirina para *Penicillium sp.*

Figura 5. Modelo del Operón de Lactosa para *E. coli*.



Fuente: Sánchez y Farrés (1987).

Las condiciones de aereación también influyen en la inducción de estas enzimas pues la deficiencia de oxígeno restringe la producción (Valero, 1991). En la tabla No. 6 se muestran algunos elementos que estimulan o reprimen la producción de lipasas de algunos hongos filamentosos.

Tabla 6. Elementos Estimulantes o Depresores en la Producción de Lipasas en Hongos Filamentosos.

MICROORGANISMO	ESTIMULANTES	REPRESORES	REFERENCIA
<i>P. roqueforti</i>	Peptona, ext. de levadura	Aceite de maiz y olivo, lactosa y glucosa	Eitenahller (1970)
<i>P. candidum</i>	Glucosa, peptona y oxígeno		Kornacki (1980)
<i>P. chrysogenum</i>	Glucosa, peptona y oxígeno		Chander (1981)
<i>Aspergillus wentii</i>	Glucosa, manitol y peptona	Fructosa, aceites, tributirina y grasa but.	Chander (1980)
<i>A. niger</i>	Sacarosa y nitrato de amonio	Aceites y magnesio	Pal (1978)
<i>Geotrichum candidum</i>	Peptona, sales de Mg y K		Arends (1986)
<i>Rhizopus nigricans</i>	Glucosa, galactosa y peptona		Chander (1981)
<i>R. oligosporus</i>	Tweens y harina de soya	Oxígeno	Nahas (1988)
<i>R. chinensis</i>	Acido oleico y aceite de oliva	Glucosa	Nakashima (1988)

Fuente: Diaz Altamirano (1992).

Los resultados de un experimento llevado a cabo por Dwayne y colaboradores con el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* mostraron que la adición de un 5% de aceite de oliva incrementa al máximo la producción de lipasa y que por el contrario, los ácidos grasos inhiben la producción. Las sales de fierro y cobre inhiben la producción de lipasa, mientras que las sales de magnesio incrementan la producción. El Tween inhibe la actividad de la lipasa mediante un mecanismo de inhibición competitiva, ya que posee un grupo éster hidrolizable. También se encontró que la temperatura óptima para la producción de lipasa era de 27-30 °C (Dwayne, 1988).

La actividad de algunas lipasas se incrementa por las sales de calcio que precipitan a los ácidos grasos liberados en forma de sales insolubles de calcio; de igual manera, las sales de sodio, potasio, magnesio y manganeso, además de algunas de sus combinaciones, tienen un efecto favorable para la producción de lipasas, las sales de Fe también inhiben severamente la actividad de lipasas como la de *A. niger* (Iwai, 1984)

Características de las Lipasas.

Las lipasas microbianas son generalmente glicoproteínas ácidas con un peso molecular de 20,000 a 60,000 daltones. Las actividades específicas de las proteínas puras varían de 500 a 10,000 unidades de lipasa por mg de proteína. El contenido de carbohidratos varía de 2-15%, siendo los residuos más frecuentes los de manosa con cantidades pequeñas de galactosa, glucosa, fucosa, xilosa, arabinosa y hexosamina (Höfelmann, 1985). Aparentemente estos carbohidratos no se requieren para la expresión de actividad catalítica (Godtfredsen, 1990).

El intervalo de pH donde pueden actuar las lipasas es bastante amplio y depende del organismo del cual provienen. Por lo general es el rango comprendido entre 5 y 9, y el óptimo se encuentra entre 6 y 8 aunque se sabe de enzimas con pHs óptimos más altos. El rango de temperatura en el cual operan comprende desde los 30 °C a los 37 °C aunque se ha llegado a observar actividad a 45 °C en algunas (Khan, 1967). No es frecuente la necesidad de cofactores y son estables en solución acuosa a temperatura ambiente, aunque presentan mayor estabilidad en soluciones orgánicas (Klibanov, 1986).

Las lipasas sufren un cambio conformacional en la interfase del medio de reacción que expone el sitio de unión de la enzima con el sustrato o el inhibidor a dicha interfase. Este cambio conformacional que expone el residuo 152 de serina a la interfase parece estar

localizado en una pequeña región de la enzima, ya que marcas unidas covalentemente a grupos -NH₂ y -SH en la superficie de las lipasas no detectan ningún cambio en su estructura cuando la enzima es expuesta a un sustrato emulsificado (O'Connor, 1988). La frecuente observación de la inhibición de las lipasas por inhibidores de serin-proteasas, particularmente de di-isopropilfosfluoridato, indica que el residuo de serina puede estar involucrado en el mecanismo catalítico. Prácticamente todas las secuencias de aminoácidos conocidas para lipasas neutras contienen el pentapéptido concenso GX₁SX₂G (donde X representa cualquier aminoácido), que contiene el residuo esencial de serina (Derwenda, 1993).

Importancia de las Lipasas en la Industria y su Investigación.

Las enzimas de interés industrial se han obtenido tradicionalmente en medios sumergidos debido a las ventajas que presentan en cuanto a su manejo y control de las condiciones de fermentación. Varias enzimas han sido producidas mediante este sistema y las lipasas son una muestra de ello.

Las lipasas son enzimas de interés para la investigación por diferentes razones, entre las cuales podemos citar:

1. Las lipasas de bacterias patógenas están implicadas en la etiología de algunas enfermedades.
2. Intervienen en la degradación de grasas de desechos domésticos e industriales.
3. Intervienen en la descomposición de productos lácteos, cárnicos y otros alimentos.
4. Son responsables de la rancidez hidrolítica de algunos alimentos.
5. Su empleo podría acelerar algunas etapas en procesos de in manufactura de alimentos (Khan, 1967).

La importancia comercial de las lipasas (como de toda enzima) radica en sus aplicaciones prácticas. Estas enzimas tienen aplicaciones potenciales en industrias tan variadas como la Química, la Farmacéutica y la Alimentaria, entre otras. En la industria de detergentes son altamente valoradas por la función que tienen al eliminar manchas de grasas y aceites de las superficies. (Tabla No.7)

Tabla 7. Algunos usos de Las Lipasas.

INDUSTRIA ALIMENTICIA.	INDUSTRIA QUÍMICA.	OTROS USOS.
Maduración de quesos	Resolución de mezclas racémicas de ésteres de alcoholes.	Fórmulas de detergentes.
Imitación de sabores a queso, mantequilla y crema	Síntesis de ésteres.	Encurtido de pieles.
Rellenos cremosos.	Ciencia básica: Determinación de lípidos para propósitos clínicos.	Tratamiento de contaminantes de origen graso.
Aderezos de queso.	Transesterificación.	Aminólisis.
Botanas.	Elaboración de fragancias.	Oximólisis
Aderezos de ensaladas.	Síntesis de péptidos.	Intercambio de grupos acilo.

Fuente: Kawasaki (1991); Welsh (1989); Harwood (1989); Klibanov (1986).

En el campo de la tecnología de los alimentos desempeñan un papel importante en la generación de sabores y aromas, en especial en la industria láctea y de repostería (Espinosa, 1990) en donde su principal aplicación es en la maduración de quesos. A este respecto, se piensa que son responsables del sabor picante característico de tales productos, al liberar ácidos grasos al medio, en especial aquéllos de 4-8 átomos de carbono (Bigelis, 1992).

Otros campos en los que se utilizan la lipasas es en la industria de los perfumes por ejemplo para la producción de brasilato de etileno por esterificación intramolecular en benceno microacuoso (Tsuneo, 1989).

El número elevado de microorganismos productores de lipasas (Tabla No.8) permite tener una amplia gama de posibilidades de catálisis, lo que a su vez resulta en un amplio campo de aplicaciones.

Tabla 8. Algunos Microorganismos Productores de Lipasas.

BACTERIAS.	HONGOS.	LEVADURAS.
<i>Chromobacter lipolyticum</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Candida cylindracea</i>
<i>Alcaligenes faecalis</i>	<i>Aspergillus lipolyticum</i>	<i>Candida paralipolytica</i>
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Pichia sp.</i>
<i>Serratia sp.</i>	<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Candida rugosa</i>
<i>B. subtilis</i>	<i>Geotrichum candidum</i>	<i>Torulopsis sp</i>
<i>Corynebacterium acnes</i>	<i>Hunicola lanuginosa</i>	<i>Trichosporon sp.</i>
<i>Leptospira pomona</i>	<i>Mucor japonicus</i>	<i>Sporobolomyces sp.</i>
<i>Mycobacterium lipolyticus</i>	<i>Penicillium candidum</i>	
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Penicillium caseicola</i>	
<i>B. mucoides</i>	<i>Penicillium cyclopium</i>	
<i>Achromobacter lipolyticum</i>	<i>Penicillium roqueforti</i>	
<i>P. fluorescens</i>	<i>Rhizopus arrhizus</i>	
<i>Mycobacterium freudenreichii</i>	<i>Rhizopus delemar</i>	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Rhizopus japonicum</i>	
<i>P. gladioli</i>	<i>Rhizopus oligosporus</i>	
<i>P. fragili</i>	<i>Sclerotinia laxa</i>	

Fuentes: Espinosa (1990); Valero (1991).

En el estudio previamente mencionado que se realizó con el moho entomopatógeno llamado *Beauveria bassiana* que produce lipasas extracelulares, se observó la posibilidad de aumentar la producción de lipasa mediante el uso de medios con extracto de levadura, peptona y dextrosa además de la adición de aceite de oliva. Otro medio que se empleó fue el de glucosa con pocas sales, pero los resultados no fueron muy favorables (Dwayne, 1988).

Los ésteres de ácidos grasos son componentes importantes de los aromas naturales en la industria de alimentos, así por ejemplo tenemos que el butirato de etilo y el acetato de

isoamilo se encuentran en el aroma a fresa y plátano respectivamente. Estos sabores anteriormente sintetizados por métodos químicos ahora pueden producirse por métodos enzimáticos con las siguientes ventajas: 1) No se producen ni se consumen moléculas de agua en la reacción y 2) La enzima es estable bajo las condiciones de reacción (Langrand, 1988).

En un estudio realizado con 13 diferentes tipos de lipasas comerciales provenientes de diferentes microorganismos, se observó la producción de acetato de geranilo o isoamilo, propionato y butirato por transesterificación y síntesis directa cuantificándose éstos por cromatografía gas-líquido (Langrand, G. 1988).

Los resultados obtenidos muestran una mayor eficiencia en la producción de ésteres aromáticos catalizados por lipasas.

Algunas Características de la Lipasa de *P. caseicolum*.

Los datos que hasta la fecha se han reportado se obtuvieron con un extracto enzimático parcialmente purificado. El pH óptimo de reacción resultó ser de 9.0 y la temperatura óptima de 35-37°C. Tanto las sales biliares como una mezcla de CaCl₂ y taurocolato de sodio incrementan la actividad de la enzima frente a la grasa butírica, mientras que el CaCl₂ por sí solo actúa como un inhibidor débil de la actividad. La inactivación de la enzima por calor se relaciona de manera exponencial con la temperatura. Por último, los triglicéridos de ácidos grasos de bajo peso molecular resultaron mejores sustratos para la enzima que aquéllos con ácidos grasos de alto peso molecular (tabla No. 4). El artículo no hace mención de las mejores condiciones para el cultivo del microorganismo y la obtención de la enzima (Alhir, 1990).

Efecto de Nutrientes en la Producción de lipasas.

Efecto de la Fuente de Carbono.

La producción de las lipasas se ve afectada de manera considerable por la composición de nutrientes del medio de cultivo. De ellos, tal vez la que tenga una mayor influencia sea la fuente de carbono, ya que es la fuente principal de energía y donadora de esqueletos carbonados para la formación de otros productos. Además, muchas vías metabólicas se encuentran reguladas por la naturaleza y concentración de dicha fuente. Es por ello que el estudio de las mejores condiciones para la producción de metabolitos debe contemplar forzosamente la evaluación de la fuente de carbono.

Por antecedentes previos, se sabe que la glucosa es, en muchos casos, la mejor fuente de carbono para la producción de enzimas lipolíticas, ya sea que se encuentre esta como monómero (Kornacki, 1980; Chander, 1981 y Petrovic, 1990), o bien, polimerizada (Sztajer, 1988; Espinosa, 1990; Martínez, 1993).

Efecto de la Fuente de Nitrógeno.

Hay numerosos reportes con respecto a la fuente de nitrógeno para la producción de lipasas, de ellos, la mayoría menciona que se obtienen grandes rendimientos cuando se usa la peptona (Chander, 1980; Chopra, 1981; Banerjee, 1984; Iwai, 1984; Bloquel, 1984; Petrovic, 1990; Christen, 1991; Kornacki, 1980; Meyers, 1958; Jacobsen, 1989; Nahas, 1988). Si bien algunas peptonas son menos satisfactorias que otras como constituyentes del medio, esto depende estrictamente del sistema estudiado y su crecimiento se ve poco o nulamente afectado.

A pesar de lo anteriormente citado, no todos los sistemas tienen la misma respuesta para la peptona, pues existen reportes en los que se menciona que fuentes inorgánicas de nitrógeno (como nitrato de potasio y sulfato o nitrato de amonio) tienen un mayor efecto positivo sobre la producción de lipasas (Bloquel, 1984; Ishihara, 1989; Gilbert, 1991; Pokorny, 1994). Es por ello, la importancia de evaluar tanto fuentes orgánicas como inorgánicas de nitrógeno.

Efecto del Magnesio y los Elementos Traza.

Tanto el magnesio como los elementos traza juegan un papel sumamente importante en el desarrollo de los microorganismos, pues muchos de ellos son cofactores de enzimas. De todos los elementos usados, tal vez sea el magnesio (y el manganeso) el que se utiliza en mayor abundancia debido a que casi todas las enzimas lo utilizan como cofactor. Por otra parte, Piazza en 1989 reporta que no hay actividad lipolítica cuando en el medio de reacción no hay presencia de iones. Petrovic en 1990, Teunissen en 1991 y Alhir en 1990 reportan que el Zn^{2+} , Na^{1+} , Ca^{2+} y el Mn^{2+} tienen efectos favorables en la actividad y en la producción de las enzimas lipolíticas. Dwayne en 1988 reporta que el Mg tiene efecto positivo sobre la producción de lipasas.

Debido a que todos los reportes consultados mencionan que el Fe^{2+} y el Fe^{3+} tiene un efecto negativo tanto en la producción como en la actividad de las lipasas debido a que se unen con ellas y las inactivan, se realiza un estudio con una formulación de elementos que no lo contempla (Dwayne, 1988; Ishihara, 1989; Piazza, 1989).

Efecto del Aceite de Olivo y el Nitrato.

Son varios los reportes que se tienen sobre el efecto positivo que posee el aceite de olivo en la producción de lipasas (Nahas, 1988; Okeke, 1990; Espinosa, 1990; Valero, 1991 y Rapp, 1992, por mencionar algunos). Ya sea que se ponga como fuente de carbono o que se adicione como inductor, el resultado que se obtiene por lo general es el aumento de la actividad lipolítica. Sin embargo, existen excepciones importantes y una de ellas es *Penicillium roqueforti*, ya que Petrovic reporta en 1990 que con el uso de dicho aceite no se detecta actividad lipolítica. Por ello, es importante observar el efecto que manifieste el aceite de olivo en la actividad lipolítica de *P. caseicolum*.

Por otro lado, es bien sabido que no todos los microorganismos son capaces de utilizar fuentes inorgánicas de nitrógeno y que además ésta puede tener efectos regulatorios sobre la producción de algunas enzimas. Dado que el nitrato a los niveles empleados en el medio "D" actúa como una fuente complementaria de nitrógeno, el propósito de su estudio es observar si existe alguna diferencia en cuanto a niveles de actividad lipolítica con o sin su presencia.

Determinación del Efecto del Calcio.

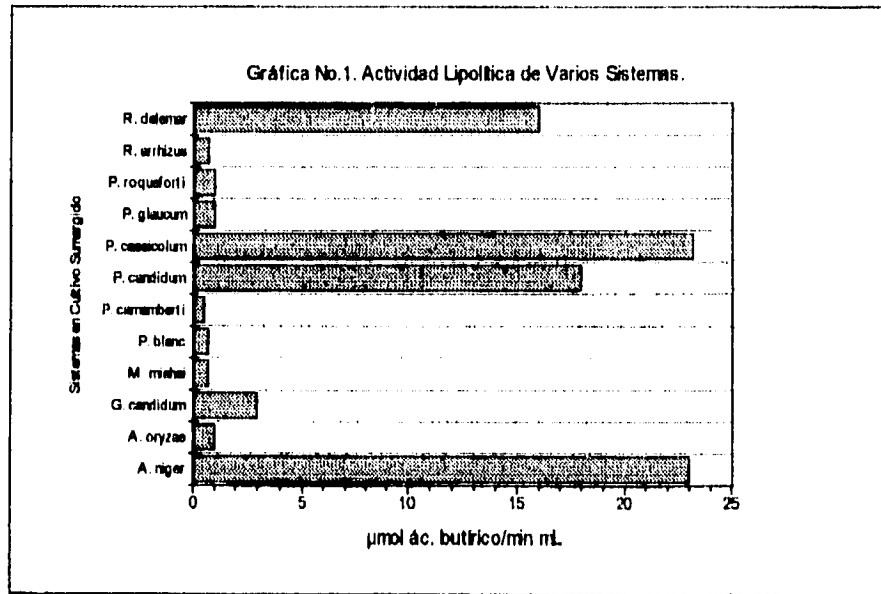
Estudios previos (Tsujiyaka, 1972; Piazza, 1989; Petrovic, 1990) muestran que el calcio a nivel de microelemento tiene un efecto positivo tanto en la actividad como en la producción de lipasas. Por otro lado, Chander en 1981, Gilbert en 1991 y Stzajer en 1988 reportan que el calcio a nivel de macroelemento tiene resultados semejantes. Aunque Alhir en 1990 reporta que el calcio tiene un débil efecto negativo en la actividad de la lipasa de *P. caseicolum*, no reporta si este efecto también se manifiesta en la producción.

JUSTIFICACION.

El uso de lipasas es un tópico que genera muchos reportes en la literatura científica. Por otro lado, la demanda de preparaciones altamente activas de enzimas lipolíticas ha producido un incremento en la búsqueda de microorganismos productores de dichas enzimas. Existen dos alternativas para resolver las necesidades planteadas anteriormente. Una es la búsqueda de nuevas fuentes de enzimas y la otra es el desarrollo de estudios sobre estrategias de cultivo para incrementar la producción de lipasas (Valero, 1991).

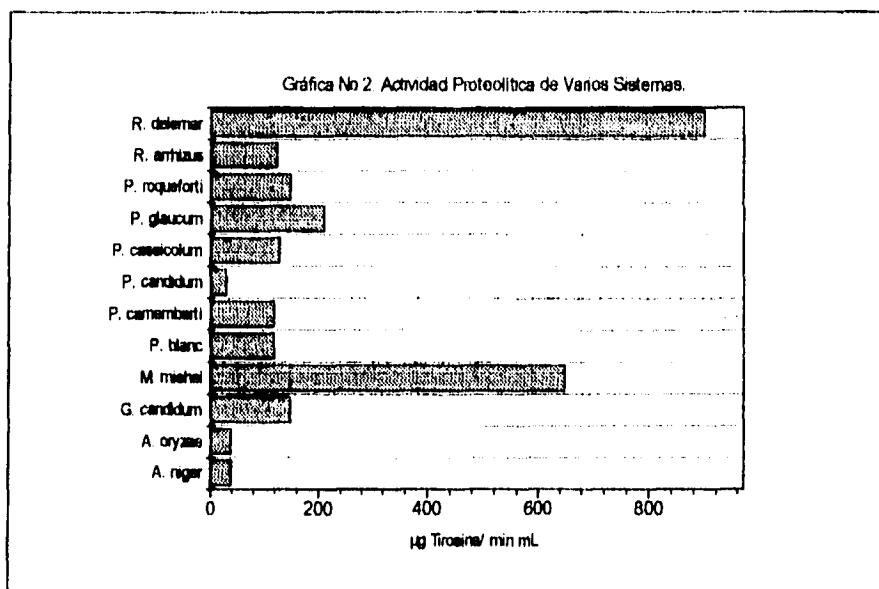
Penicillium caseicolum y *Penicillium camemberti* son los dos hongos comúnmente empleados para la manufactura de queso Camembert, Brie y otros quesos madurados. Además, sus enzimas lipolíticas, que se sabe poseen una elevada especificidad por los ácidos grasos de los lípidos que hidrolizan (Stepaniak, 1980), son consideradas actualmente como importantes catalizadores en la generación de sabores suaves y cremados (Matute, 1992), resolución de mezclas racémicas de alcoholes y en la interesterificación de grasas, por mencionar algunos ejemplos (Alhir, 1990).

Las ventajas que presentan las enzimas de origen microbiano sobre las de organismos superiores y la síntesis Química de los productos ya se ha mencionado anteriormente. La posibilidad de usar niveles elevados de inóculo para acelerar la maduración ha sido investigada extensamente, sin embargo, el exceso en la producción de ácidos sigue siendo un problema que hasta el momento sólo se ha podido resolver con la neutralización de los mismos con NaOH (Varnam, 1993). No obstante, existe otra posibilidad que es el inocular una menor cantidad de microorganismo pero con una mayor producción de enzimas. Tal es el interés de este trabajo hacia *Penicillium caseicolum*, pues este hongo filamentoso es un excelente productor de enzimas lipolíticas (Como se puede ver en la gráfica No. 1).



Fuente: Tobalina (1990).

Además, presenta baja actividad proteolítica en cultivos sumergidos (gráfica No. 2), lo cual es ventajoso ya que dicha actividad es responsable de sabores amargos. Por otra parte, tanto el microorganismo como las enzimas que produce están consideradas como un producto GRAS (Rivera-Muñoz, 1991). Por otro lado, el sistema de producción sumergida es el más conocido técnicamente, pero para *P. caseicola* no se conocen las mejores condiciones de producción.



Fuente: Tobalina (1990).

Es por todo lo anteriormente dicho, que se requiere de investigaciones sobre la optimización de los sistemas de obtención de lipasas para este microorganismo, ya que esto permitirá una mejor explotación del mismo incluyendo nuevas aplicaciones.

OBJETIVOS.

-Mejorar el rendimiento de enzimas lipolíticas de *Penicillium caseicolum* hasta ahora obtenido con el medio D para hongos filamentosos.

-Identificar los nutrientes relevantes para la producción de las enzimas lipolíticas de *Penicillium caseicolum* en cultivos sumergidos.

-Determinar la concentración óptima de los nutrientes relevantes en el medio de cultivo.

-Diseñar un medio que permita mejorar el rendimiento en la obtención de lipasas en cultivos sumergidos de *Penicillium caseicolum*.

-Mediante el mejoramiento del medio, disminuir la actividad proteolítica de *Penicillium caseicolum*.

METODOLOGIA.

Material Biológico.

Se contó con una cepa de *Penicillium caseicola* proveniente del cepario de la Facultad de Química de la UNAM. Dicha cepa se transfirió periódicamente a tubos inclinados que contenían agar papa dextrosa (PDA) que fueron inundados posteriormente con glicerol al 50% y almacenados en refrigeración a 5 °C.

Propagación del Microorganismo.

Se elaboró medio PDA (Oxoid) adicionado de acetato de sodio al 0.05%, peptona y extracto de levadura al 0.1% y se esterilizó a 121°C por 15 min. Efectuado lo anterior, se vertió el medio en cajas petri y se dejó solidificar completamente. Se realizó una prueba de esterilidad para lo cual se dejaron incubando las cajas en una estufa (BG mod. E:71) a 37°C durante 1 día. Una vez realizado lo anterior y tras comprobar la esterilidad el medio, el microorganismo se sembró de tal forma que inundó completamente la caja y posteriormente se incubaron estas cajas a 29 °C durante 6 días para permitir el desarrollo microbiano.

Cosecha de Esporas.

Transcurridos los 6 días en que se permite la propagación del microorganismo, se retiraron las cajas de la incubadora y se recubrieron de papel aluminio para posteriormente introducir las a refrigeración durante 8 días a 5 °C con el objeto de que esporule el microorganismo. Pasado el tiempo establecido se realizó la cosecha de esporas. Para ello, se

inundaron las cajas con 7mL de glicerol (J.T. Baker) al 50% (glicerol:agua destilada) previamente esterilizado y se frotó la superficie con un asa bacteriana de manera tal que se liberaran las esporas y se incorporaran al glicerol; a continuación, se trasvasaron a un matraz Erlenmeyer que se esterilizó con anterioridad y se realizaron pruebas de pureza como la siembra en cajas con PDA y observaciones al microscopio.

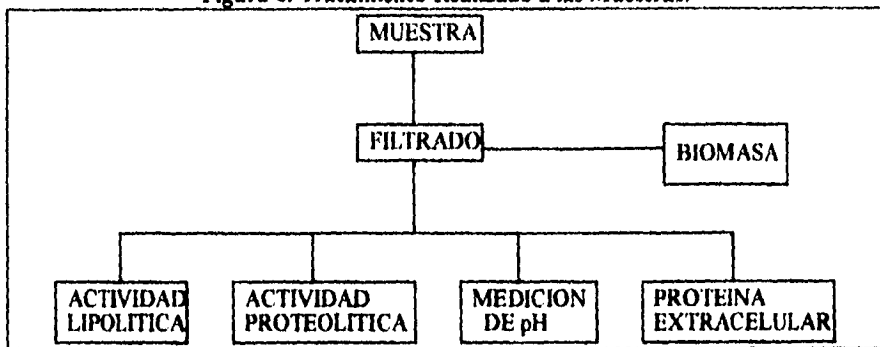
Estandarización del Inóculo.

Se diluyó 1mL de la solución de esporas con 3mL de glicerol al 50% y se leyó su densidad óptica a 540nm contra un blanco de glicerol al 50% en un espectrofotómetro (Spectronic 21D Milton Roy). En estas condiciones, 1ml de solución de esporas debe dar una absorbancia de 0.12 para inocular 25mL de medio.

Fermentaciones.

Las fermentaciones que se realizaron para el mejoramiento de la producción de lipasas tuvieron una duración de 6 días a $29 \pm 1^\circ\text{C}$ con un pH inicial de 7 y con agitación constante a 100 rpm. Después de este tiempo, se procedió a practicarles las determinaciones que se resumen en la figura No.5.

Figura 6. Tratamiento Realizado a las Muestras.



Determinación de Biomasa.

Esta determinación se realizó por el método de peso seco. Para ello, se puso a peso constante papel filtro Whatman No. 1 (4.25cm) durante 2h en una estufa a 60 °C (Riossa, mod.EC), tiempo después del cual se procedió a filtrar la biomasa en un equipo Milipore. Efectuado esto, se puso a peso constante el papel con la biomasa (bajo las mismas condiciones al inicio). La determinación de la cantidad de biomasa se realizó por diferencia de peso en una balanza analítica (Sartorius 1207 MP2).

Determinación de Proteína Extracelular.

Esta se realizó por el Método de Löwry (1951).

Determinación de Actividad Proteolítica.

Se realizó por el método de Fukumoto (1967).

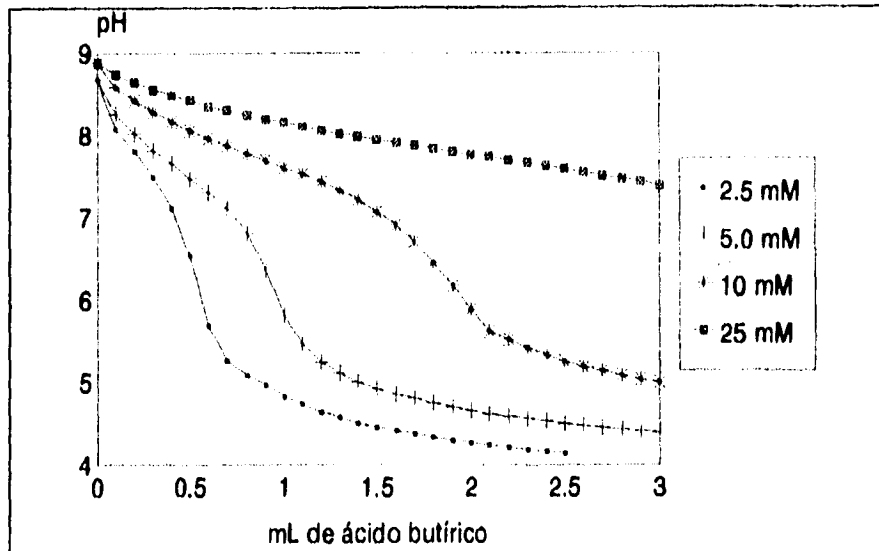
Una unidad de actividad proteolítica se definió como la cantidad de enzima que libera 1 µg de Tirosina por minuto a 37 °C.

Determinación de pH.

Se realizó directamente al extracto crudo con el empleo de un potenciómetro Orion mod. 520A.

Determinación de la Concentración Óptima de Amortiguador.

Debido a que el pH óptimo de la enzima de *P. caseicolum* es de 9, se buscó una sustancia con propiedades ácido-base cuyo pK se encontrase por el rango de 9 para poder actuar como amortiguador de pH en la determinación de la actividad lipolítica. Tal sustancia resultó ser el tris (hidroximetil aminometano) que posee un pK de 8.3. La concentración óptima de este amortiguador se determinó por la valoración de varias soluciones de tris a diferentes concentraciones con ácido butírico al 0.5%, estableciéndose como la mejor condición para los fines antes mencionados el amortiguador de tris 5mM, ya que, como puede apreciarse en la gráfica No. 3, no hay un descenso muy drástico del pH (en comparación con la concentración de 2.5mM) con lo cual la enzima se mantiene por más tiempo en condiciones óptimas (en el caso contrario, es decir, con las concentraciones 10 y 25 mM no es posible observar la caída de pH por la liberación de ácidos grasos, debido a la gran capacidad de amortiguamiento).

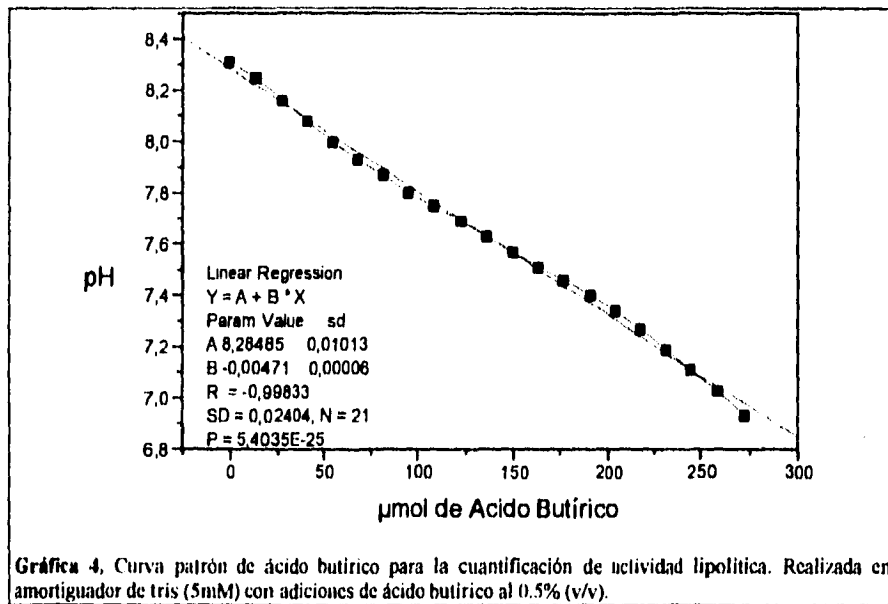


Gráfica 3. Determinación de la concentración óptima de amortiguador de tris para la cuantificación de la actividad lipolítica de *Penicillium caseicolum*. Valoración realizada con ácido butírico al 0.5% (v/v) a 37°C y con agitación constante.

Determinación de Actividad Lipolítica.

Se realizó por el método de Menassa modificado (Espinosa, 1990). Dicha modificación consiste en el seguimiento de la caída de pH de una solución de tributirina al 5% (SIGMA) en un buffer de tris (Merck) 5mM a la que se le ha agregado el extracto enzimático crudo. Todo ello se encuentra en un baño de agua (Nesslab termomix) a 37°C y con agitación constante. La reacción se sigue por espacio de 5min. La pendiente obtenida de esta curva es posteriormente referida a una curva patrón realizada con ácido butírico en condiciones semejantes, en lugar de titular con NaOH 0.1N como usualmente se usa en el método de pH-stat (Gráfica No. 4).

Una unidad de actividad lipolítica se definió como la cantidad de enzima que libera 1 μmol de ácido butírico por minuto a 37 °C.



Determinación de los Nutrientes Relevantes para la Producción de Lipasas.

Para la optimización de la producción de lipasas de *P. caseicolum* se utilizó como medio de referencia el medio D para hongos filamentosos descrito por Celerin y Fergus (1971) modificado por el grupo de trabajo, cuya composición se detalla en la tabla No. 9

Tabla 9. Composición del Medio "D" para Hongos Filamentosos.

REACTIVO	CANTIDAD (p/p)
Glucosa	1%
Casaminoácidos	1%
KNO ₃	0.2%
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0.05%
K ₂ HPO ₄	0.1%
Solución de elementos traza	0.1%
Aceite de olivo	2%

Fuente: Celerin, E. (1971)

Los elementos traza constan de ZnSO₄ (0.044 g/mL) (J.T. Baker), Fe(NO₃)₂ (0.0723 g/mL) (Cosmopolita) y MnSO₄ (0.0203 g/mL) (J.T. Baker).

El aceite de olivo se agregó hasta el final en cada matraz.

Evaluación de la Fuente de Carbono.

Se evaluaron glucosa, dextrina y almidón como fuentes de carbono, cada una por triplicado, según se muestra en la tabla No. 10. Los resultados obtenidos se trataron estadísticamente mediante un análisis de varianza de una vía.

Tabla 10. Composición del Medio Empleado para Evaluar la Fuente de Carbono.

REACTIVO	CANTIDAD
Glucosa o Dextrina o almidón	1%
Casaminoácidos	1%
KNO ₃	0.2%
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0.05%
K ₂ HPO ₄	0.1%
Solución de elementos traza	0.1%
Aceite de olivo	2%

Evaluación de la Fuente de Nitrógeno.

Con base en los antecedentes experimentales, se emplearon peptona (Oxoid), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Mallinckrodt) y Casaminoácidos (Difco) para ser evaluados como fuentes de nitrógeno según se muestra en la tabla No. 11. Los resultados obtenidos se trataron estadísticamente mediante un análisis de varianza de una vía.

Tabla 11. Composición del Medio Empleado para Evaluar la Fuente de Nitrógeno.

REACTIVO	CANTIDAD
Dextrina	1%
Casaminoácidos o Peptona o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1%
KNO_3	0.2%
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.05%
K_2HPO_4	0.1%
Solución de elementos traza	0.1%
Aceite de olivo	2%

Determinación del Efecto del Mg y la Composición de Elementos Trazas Optimos.

Se verificó el efecto del Mg a nivel de macroelemento mediante el empleo de un diseño factorial en el que también se evaluaron los elementos traza (ET), cada variable a dos niveles. Lo anterior se realizó con el objeto de minimizar el tiempo de experimentación, respetando el principio de mover lentamente los componentes del medio y al mismo tiempo se contemplan posibles interacciones entre estas variables (tabla No. 12).

Tabla 12. Diseño Factorial para la Evaluación de Mg y Elementos Traza.

CORRIDA	Mg	ET
1	1	1
2	1	2
3	2	1
4	2	2

Nivel 1 para el Mg significa presencia, nivel 2 significa ausencia.

Nivel 1 para ET significa empleo de elementos originales del medio D, nivel 2 significa nueva formulación.

Con base en los antecedentes experimentales (Petrovic, S. 1990, Teunissen, M. 1991; Alhir, 1990) se elaboró una formulación de elementos traza (ET2) que se comparará con la formulación de elementos traza del medio D para hongos filamentosos (ET1), según se muestra en la tabla No. 13.

Tabla 13. Composición de los Elementos Traza Evaluados.

Elementos Traza 1	Concentración (mg/ml.)	Elementos Traza 2	Concentración (mg/ml.)
ZnSO ₄	44.0	ZnSO ₄	44.00
Fe(NO ₃) ₂	72.30	MnSO ₄	222.30
MnSO ₄	20.30	CaCO ₃	100.00
		NaCl	2.92

Se eliminó la presencia del Fe(NO₃)₂ ya que todos los reportes consultados mencionan que el Fe tiene un efecto negativo tanto en la actividad como en la producción. Petrovic en 1990 reporta que el Na tiene una estimulación del 50% sobre la actividad relativa, mientras que el calcio la estimula en 26%.

Los resultados se trataron estadísticamente mediante el análisis de varianza de una vía.

Determinación del Efecto del Aceite de Olivo y el Nitrato.

Para la determinación del efecto del nitrato (NO_3) y el aceite de olivo (AO), también se empleó un diseño factorial, a dos niveles cada una de las variables (tabla No. 14).

Tabla 14. Diseño Factorial para la Evaluación de Nitrato y Aceite de Olivo.

CORRIDA	NO_3	AO
1	1	1
2	1	2
3	2	1
4	2	2

Nivel 1 para el NO_3 significa presencia, nivel 2 significa ausencia.

Nivel 1 para el AO significa presencia, nivel 2 significa ausencia.

Determinación del Efecto del Calcio.

Dado que es la última variable de estudio, el análisis de su efecto en la producción de lipasas se realizó mediante un experimento simple en el que había las condiciones de presencia o ausencia.

Determinación de la Concentración Óptima de los Nutrientes del Medio.

Esta determinación se realizó mediante el empleo de un diseño factorial fraccional $L_9 3^4$ en el que se involucran todas las variables a tres niveles cada una. Con este diseño se compensa el hecho de no haber contemplado las posibles interacciones de los nutrientes desde un principio. Los detalles del diseño empleado pueden verse en la tabla No. 15

Tabla 15. Diseño Factorial Fraccional Empleado.

	FUENTE DE CARBONO	FUENTE DE NITROGENO	MAGNESIO	ACEITE DE OLIVO
CORRIDA				
1	1	1	1	1
2	1	2	2	2
3	1	3	3	3
4	2	1	2	3
5	2	2	3	1
6	2	3	1	2
7	3	1	3	2
8	3	2	1	3
9	3	3	2	1

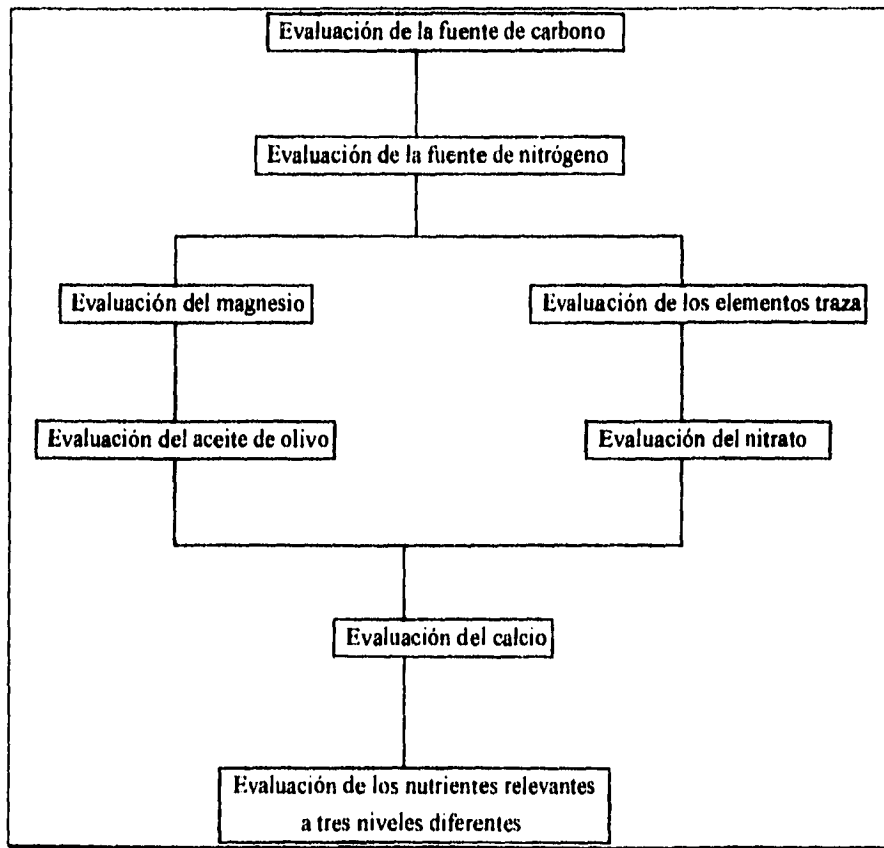
1 nivel alto, 2 nivel medio y 3 nivel bajo (de acuerdo a las concentraciones detalladas en la tabla No 16).

Tabla 16. Concentraciones de los Nutrimientos para los Diferentes Niveles.

	NIVEL ALTO (%)	NIVEL MEDIO (%)	NIVEL BAJO (%)
CONDICION			
Dextrina	1.5	1	0.5
Peptona	1.5	1	0.5
Magnesio	0.075	0.05	0.025
Aceite de olivo	3	2	1

La figura No. 6 resume la metodología seguida para mejorar la producción de lipasas de *P. caseicolum*.

Figura 7. Diagrama de Flujo de la Metodología.



RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS.

Resultados de la Evaluación de la Fuente de Carbono.

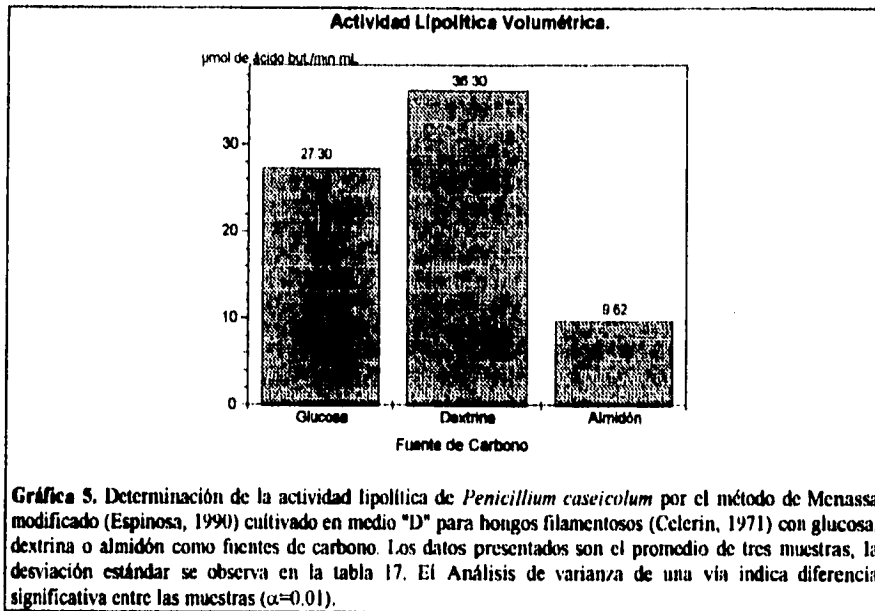
En esta primera parte del experimento, donde se evaluó la glucosa en diferentes grados de polimerización como fuente de carbono en el medio D y se obtuvieron los resultados mostrados en la tabla No. 17.

Tabla 17. Resultados de la Evaluación de la Fuente de Carbono.

	BIOMASA	pH final	PROTEINA EXTRACELULAR	ACTIVIDAD PROTEOLITICA
FUENTE	mg/mL	pH	µg/mL	µmol tir./mL
Glucosa	16.00	6.08 ± 0.11	2831.343 ± 398.1	695.614 ± 81.7
Dextrina	21.00	5.42 ± 0.071	4610.470 ± 2.25	540.284 ± 8.7
Almidón	9.772	6.44 ± 0.14	2893.573 ± 657.34	493.185 ± 41.45

Continuación de la tabla 17.

	ACT. LIPOLITICA VOLUMETRICA	ACT. LIPOLITICA ESPECIFICA
FUENTE	µmol de ac.but./min mL.	µmol de ac.but./mg min
Glucosa	27.274 ± 1.40	1.70
Dextrina	36.300 ± 0.33	1.74
Almidón	9.622 ± 3.60	0.98



De la gráfica No.5 y del tratamiento estadístico de las muestras (ver apéndice) se puede observar que la dextrina promueve una mayor producción tanto de lipasas como de proteína extracelular.

Si se analiza la actividad volumétrica para el caso de la glucosa, aparentemente se observa un fenómeno de regulación si se compara con la dextrina, pues lo que se esperaría es que, al ser dicha glucosa un carbohidrato sencillo y por ende fácilmente asimilable, se obtuvieran valores mayores de biomasa, proteína extracelular y una mayor acidificación del medio como consecuencia de la generación de ácidos orgánicos a través de su metabolismo. Sin embargo, el estudio de la actividad lipolítica específica muestra que no existe tal fenómeno de regulación por glucosa, al menos a la concentración empleada. El estudio posterior del efecto de la glucosa sobre la actividad de la enzima indica que no hay inhibición a concentraciones hasta de un 4% de glucosa presente en el medio de reacción.

Este resultado representa una ventaja adicional de este sistema sobre otros, ya que casi en la totalidad de los sistemas estudiados se presenta un fenómeno de regulación por carbono, incluso a concentraciones menores o iguales a las manejadas en este trabajo.

También se puede observar que los valores de actividad proteolítica en el caso de la glucosa son mayores que para las otras condiciones, a lo cual puede atribuirse la baja actividad lipolítica que presenta con respecto a la dextrina (Berry, 1988).

Como se mencionó al principio, la mejor fuente de carbono para la producción de lipasas es la dextrina. No puede descartarse un efecto sinérgico de la dextrina con los demás componentes del medio. De la determinación de pH para el caso de la dextrina, se puede deducir que la enzima es estable a pH's moderadamente ácidos a pesar de tener su óptimo en 9. Resultados semejantes con respecto al uso de dextrinas se obtuvieron en estudios previos al trabajar con *R. delemar* (Espinosa, 1990; Kawasaki, 1991 y Martínez, 1993)

Por otra parte, el hecho de que con almidón se haya obtenido la menor producción de lipasa se debe a que también hubo un crecimiento pobre, tal vez debido a que la fuente de carbono es menos accesible en comparación con los casos anteriores y a que el microorganismo no es capaz de desarrollar la serie de enzimas necesarias para degradar por completo al almidón. Lo anterior puede observarse en los valores de biomasa y en la pobre acidificación del medio.

Con base en los resultados obtenidos se sustituyó el uso de la glucosa por el de la dextrina como fuente de carbono para experimentos posteriores.

Resultados de la Evaluación de la Fuente de Nitrógeno.

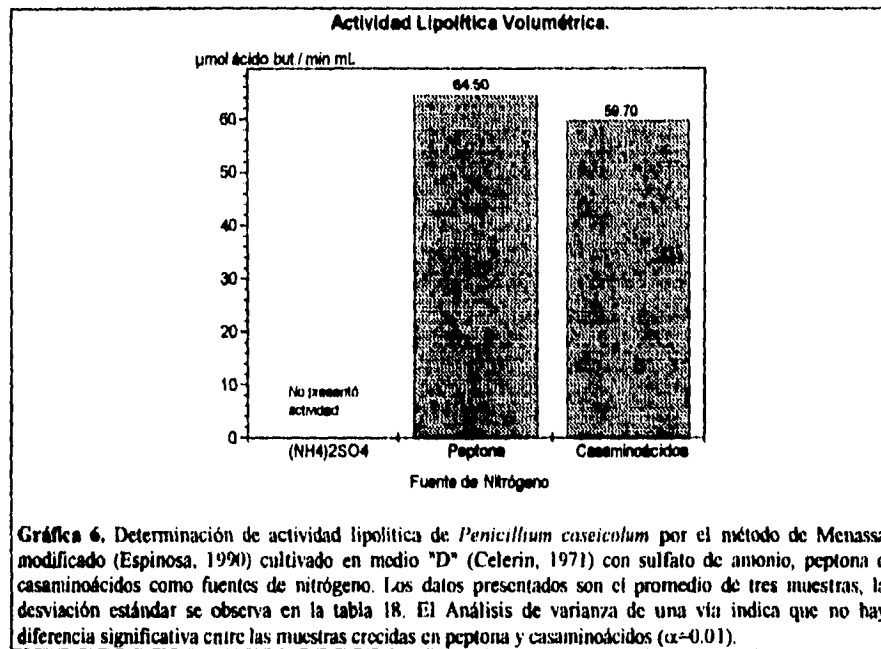
En la evaluación de la fuente de nitrógeno, en la que se probaron el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, peptona y los casaminoácidos propios del medio D, se obtuvieron los resultados mostrados en la tabla No. 18.

Tabla 18. Resultados de la Evaluación de la Fuente de Nitrógeno.

	BIOMASA	pH final	PROTEINA EXTRACELULAR
FUENTE	mg/mL	pH	$\mu\text{g/mL}$
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	8.25	3.19 ± 0.11	461.00 ± 44.06
Peptona	17.73	6.24 ± 0.17	3732.21 ± 194.032
Casaminoácidos	15.40	6.25 ± 0.02	2362.6 ± 345.65

Continuación de la Tabla 18.

	ACTIVIDAD LIPOLITICA	ACTIVIDAD LIPOLITICA ESPECIFICA	ACTIVIDAD PROTEOLITICA
FUENTE	$\mu\text{mol de ac.but./min}$ mL	$\mu\text{mol de ac.but./mg}$ min	$\mu\text{mol tir./mL}$
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	No presentó actividad.	No hay actividad	60.11 ± 3.45
Peptona	64.46 ± 11.06	3.63	490.75 ± 10.41
Casaminoácidos	59.70 ± 5.60	3.88	277.20 ± 22.00



Como puede verse en la gráfica No. 6, la peptona es, aparentemente, la mejor fuente de nitrógeno para la producción de lipasas en este sistema, ya que los rendimientos volumétricos son mayores que para la fuente original, es decir, los casaminoácidos. No obstante, el tratamiento estadístico indica que no hay diferencia significativa entre la fuente original y la peptona ($\alpha=0.01$). Por lo que el hecho de presentar una mayor actividad es al parecer consecuencia directa de un mayor crecimiento del microorganismo, ya que si se obtienen las actividades específicas se observa que éstas son casi iguales, lo que indica una producción por mg de biomasa semejante. La consecuencia de un mayor desarrollo microbiano por parte de la peptona puede deberse a que por gramo de sustrato, dicha peptona posee mayor cantidad de nitrógeno que los casaminoácidos, pues éstos ya han tenido que adicionar una molécula de agua a su estructura para estabilizarla. En este punto es necesario mencionar que los hongos, a diferencia de otros sistemas, requieren una mayor

cantidad de nitrógeno para su crecimiento. Del hecho de utilizar la peptona como fuente de nitrógeno surge el resultado de tener una actividad proteolítica mayor que en cualquiera de las otras condiciones, aunque se sabe que fuentes de nitrógeno de bajo peso molecular como los aminoácidos libres o sulfato de amonio reprimen la producción de proteasas (Homma, 1993). Sin embargo, comparada con la actividad proteolítica del medio original (medio D) se observa que ésta sigue presentando una tendencia a disminuir.

Estos resultados (de una mayor actividad con peptona) concuerdan con los obtenidos anteriormente por Chander en 1981 para *Rhizopus nigricans* y por Pertovic en 1990 para *Penicillium roqueforti*.

También se observa que a diferencia de otros sistemas, *P. caseicolum* presenta un crecimiento pobre y con actividad lipolítica nula, cuando es cultivado con sulfato de amonio como fuente de nitrógeno. Esto puede ser consecuencia de una considerable acidificación del medio que pudiera haber ocasionado la desnaturalización de la enzima. Por otra parte, no es posible saber si la enzima fue sintetizada y desnaturalizada (o inhibida), o si siquiera se produjo, debido a una posible represión por ión amonio (aunque los resultados de proteína extracelular sugieran esto último). Estos resultados concuerdan de manera parcial con los obtenidos por Vásquez y Rivera-Muñoz en 1993 para *P. candidum*, ya que ellos no observaron una ausencia total de actividad lipolítica, pero sí una disminución de la misma.

Con base en los resultados y en la discusión anterior, además de razones de costos (ya que la peptona es mucho más económica que los casaminoácidos), se sustituyó el uso de los casaminoácidos por la peptona como fuente de nitrógeno para experimentos posteriores.

cantidad de nitrógeno para su crecimiento. Del hecho de utilizar la peptona como fuente de nitrógeno surge el resultado de tener una actividad proteolítica mayor que en cualquiera de las otras condiciones, aunque se sabe que fuentes de nitrógeno de bajo peso molecular como los aminoácidos libres o sulfato de amonio reprimen la producción de proteasas (Homma, 1993). Sin embargo, comparada con la actividad proteolítica del medio original (medio D) se observa que ésta sigue presentando una tendencia a disminuir.

Estos resultados (de una mayor actividad con peptona) concuerdan con los obtenidos anteriormente por Chander en 1981 para *Rhizopus nigricans* y por Pertovic en 1990 para *Penicillium roqueforti*.

También se observa que a diferencia de otros sistemas, *P. caseicolum* presenta un crecimiento pobre y con actividad lipolítica nula, cuando es cultivado con sulfato de amonio como fuente de nitrógeno. Esto puede ser consecuencia de una considerable acidificación del medio que pudiera haber ocasionado la desnaturalización de la enzima. Por otra parte, no es posible saber si la enzima fue sintetizada y desnaturalizada (o inhibida), o si siquiera se produjo, debido a una posible represión por ión amonio (aunque los resultados de proteína extracelular sugieran esto último). Estos resultados concuerdan de manera parcial con los obtenidos por Vásquez y Rivera-Muñoz en 1993 para *P. candidum*, ya que ellos no observaron una ausencia total de actividad lipolítica, pero sí una disminución de la misma.

Con base en los resultados y en la discusión anterior, además de razones de costos (ya que la peptona es mucho más económica que los casaminoácidos), se sustituyó el uso de los casaminoácidos por la peptona como fuente de nitrógeno para experimentos posteriores.

Resultados del Efecto del Magnesio y los Elementos Trazas.

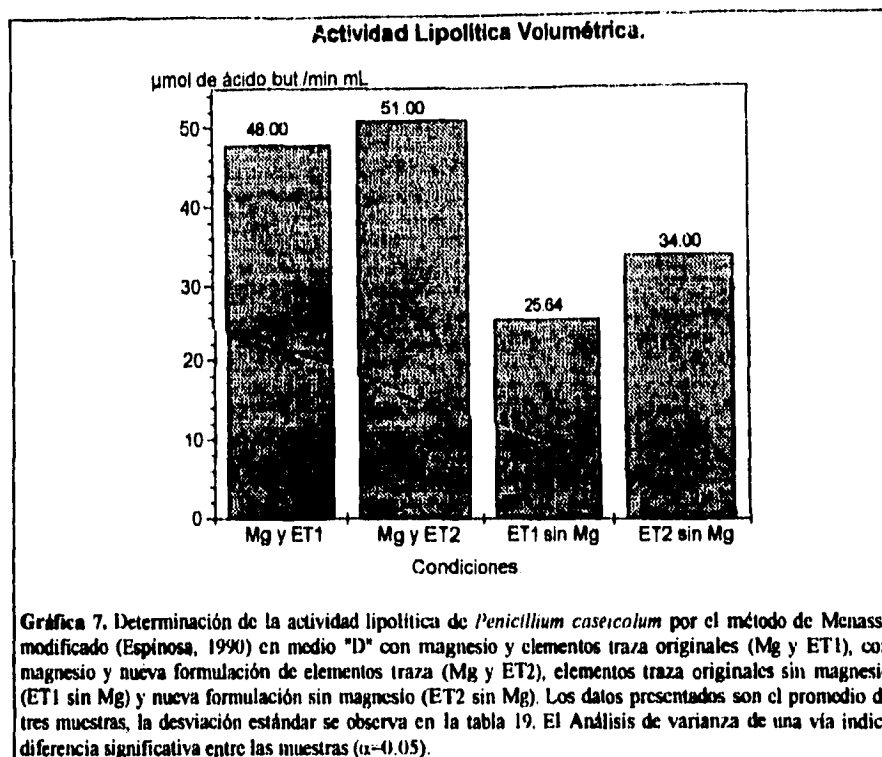
Para el estudio de la nueva formulación de elementos traza y el efecto del magnesio en la producción de lipasas se obtuvieron los resultados que se muestran en la tabla No. 19.

Tabla 19. Resultados de la Evaluación del Mg y los Elementos Trazas.

	BIOMASA	pH final	ACTIVIDAD LIPOLITICA	ACTIVIDAD LIPOLITICA ESPECIFICA
FUENTE	mg/mL	pH	$\mu\text{mol de ac. but./min mL}$	$\mu\text{mol de ac. but./mg min}$
Mg Y ET1 (Patrón)	21.10	6.45 ± 0.53	47.81	2.27
Mg Y ET2	17.70	5.36 ± 0.02	50.82	2.90
ET1 SIN Mg	3.90	4.52 ± 0.25	25.64	6.60
ET2 SIN Mg	6.63	4.60 ± 0.06	33.76	5.10

ET1= Elementos traza del medio D.

ET2= Nueva formulación.



Como puede verse en la gráfica No. 7, y comprobarse con el tratamiento estadístico (ver apéndice), la mejor condición para la producción de lipasas es aquella en la que se encuentra presente el magnesio y se emplea la nueva formulación de elementos traza. Se observa que tanto el magnesio como la nueva formulación de elementos propician el desarrollo microbiano, lo cual ha sido anteriormente verificado para otros sistemas (Pokorny, 1994). Este resultado al menos para el magnesio no es sorprendente ya que, como se mencionó anteriormente, éste sirve de cofactor para muchas enzimas.

Por otra parte, se observa que la eliminación del hierro de la formulación de los elementos y la adición de calcio y sodio, favorecen la producción de la enzima. Se ha postulado que el hierro es desfavorable para las lipasas por que reduce tanto su producción como su liberación, además de inactivarla y prolongar el tiempo de fermentación; lo cual no es deseable ya que a medida que transcurre el tiempo, la actividad proteolítica ocasiona la disminución de la actividad lipolítica (Ishihara, 1989). Por otro lado, el calcio, y el sodio empleados a las concentraciones descritas podrían tener, como se ha verificado para muchos eucariotes (Stryer, 1988), un importante papel en la liberación de la enzima al medio, en caso de que el sistema de transporte necesitase de estos iones.

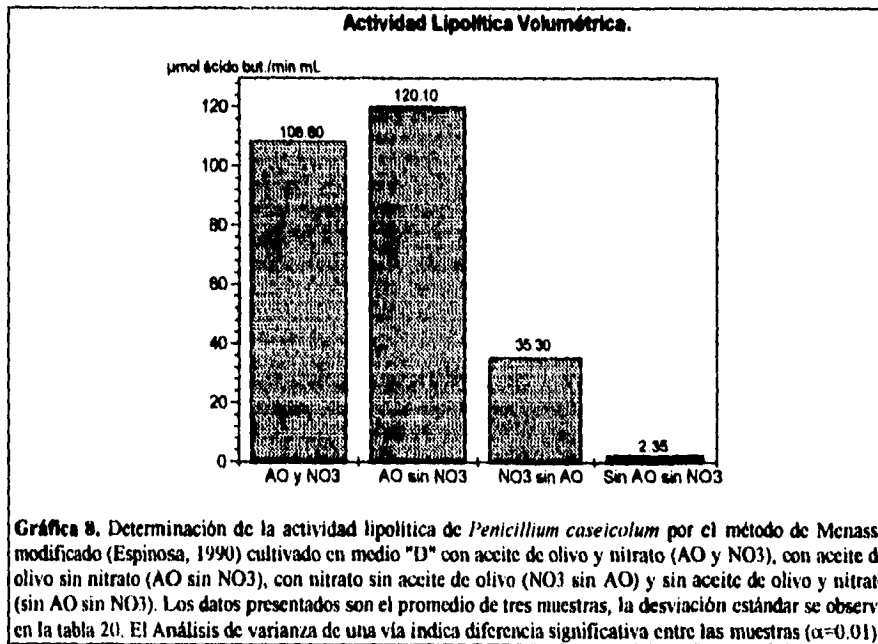
Si se analiza la actividad lipolítica específica, se observa que en ausencia de magnesio, aumenta con los elementos traza originales, pero esto se debe a que el desarrollo microbiano es bajo y por ello se disparan los valores de dicha actividad. Una hipótesis que pudiera explicar el escaso desarrollo microbiano, es que haya una producción de energía limitada debido a la inactivación de la ATPasa dependiente de Mg^{2+} . También puede pensarse al observar estos valores, que puede haber un efecto sinérgico entre la nueva formulación de elementos traza y el magnesio, que propicie la producción de la enzima y el desarrollo microbiano. Estos datos concuerdan con los reportados para otros sistemas por Chander en 1981, Chopra en 1981, Petrovic en 1990 y Pokorny en 1994.

Resultados del Efecto del Nitrato y el Aceite de Olivo.

Para la evaluación del nitrato como fuente complementaria de nitrógeno y el aceite de olivo como inductor se obtuvieron los resultados mostrados en la tabla No. 20.

Tabla 20. Resultados de la Evaluación del NO₃ y El Aceite de Olivo.

	BIOMASA	pH final	PROTEINA EXTRACELULAR	ACTIVIDAD LIPOLITICA
FUENTE	mg/mL	pH	µg/mL	µmol de ac.but./min mL
NO ₃ y AO	24.61	5.92 ± 0.15	4467.60 ± 251.20	108.60 ± 3.23
Sin NO ₃ y sin AO	10.37	6.28 ± 0.31	3970.00 ± 112.21	2.35 ± 1.3
NO ₃ sin AO	10.10	7.51 ± 0.36	3764.00 ± 183.00	35.30 ± 13.06
AO sin NO ₃	23.04	6.03 ± 0.01	4121.00 ± 65.00	120.10 ± 2.3



Como se puede apreciar en la gráfica No. 8, aquellas condiciones en las cuales está presente el aceite de olivo, son las que presentan una actividad lipolítica mayor. Esto evidencia la importancia que tiene como inductor en la producción de enzimas lipolíticas, hecho que ha

sido corroborado por numerosos autores (Ishihara, 1989; Valero, 1991; Rapp, 1992, entre otros).

También es posible observar que hay actividad en las condiciones en las que no está presente el aceite de olivo. Sin embargo, se piensa que esta actividad es basal, por lo que se sugiere que la enzima es inducible y que se favorece su producción con la ayuda de un inductor.

Por otro lado, se puede apreciar que el nitrato tiene un efecto positivo en la producción de lipasas siempre y cuando no se utilice con aceite de olivo, ya que al parecer en combinación con éste disminuye su efecto inductor.

Debido a los resultados anteriormente presentados se decidió eliminar el uso del nitrato y continuar con el uso del aceite de olivo para experimentos posteriores.

Resultados del Efecto del Calcio.

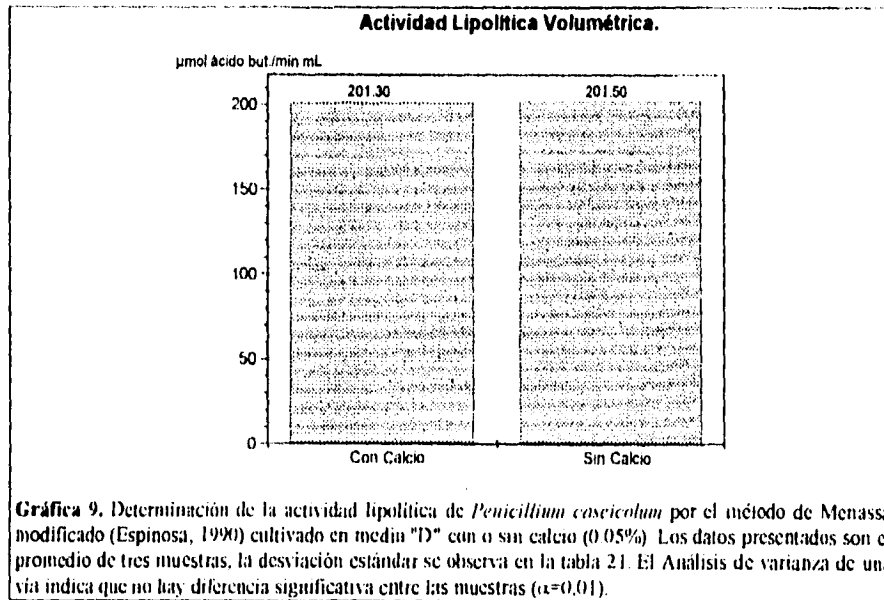
Para la determinación del efecto del calcio, se obtuvieron los resultados que se muestran en la tabla No. 21.

Tabla 21. Resultados de la Evaluación del Calcio.

	BIOMASA	pH final	PROTEINA EXTRACELULAR	ACTIVIDAD PROTEOLITICA
FUENTE	mg/mL	pH	µg/mL	µtir /mL
Medio con Calcio.	23.40	6.11 ± 0.01	4044.55 ± 52.03	554.53 ± 22.00
Medio sin Calcio.	23.10	6.10 ± 0.05	4351.20 ± 209.00	362.00 ± 36.00

Continuación de la Tabla 21.

	ACT. LIPOLITICA
FUENTE	µmol de ac but /min mL
Medio con Calcio.	201.30 ± 0.01
Medio sin Calcio.	201.50 ± 4.53



Gráfica 9. Determinación de la actividad lipolítica de *Penicillium caseicola* por el método de Menassa modificado (Espinosa, 1990) cultivado en medio "D" con o sin calcio (0.05%). Los datos presentados son el promedio de tres muestras, la desviación estándar se observa en la tabla 21. El Análisis de varianza de una vía indica que no hay diferencia significativa entre las muestras ($\alpha=0.01$).

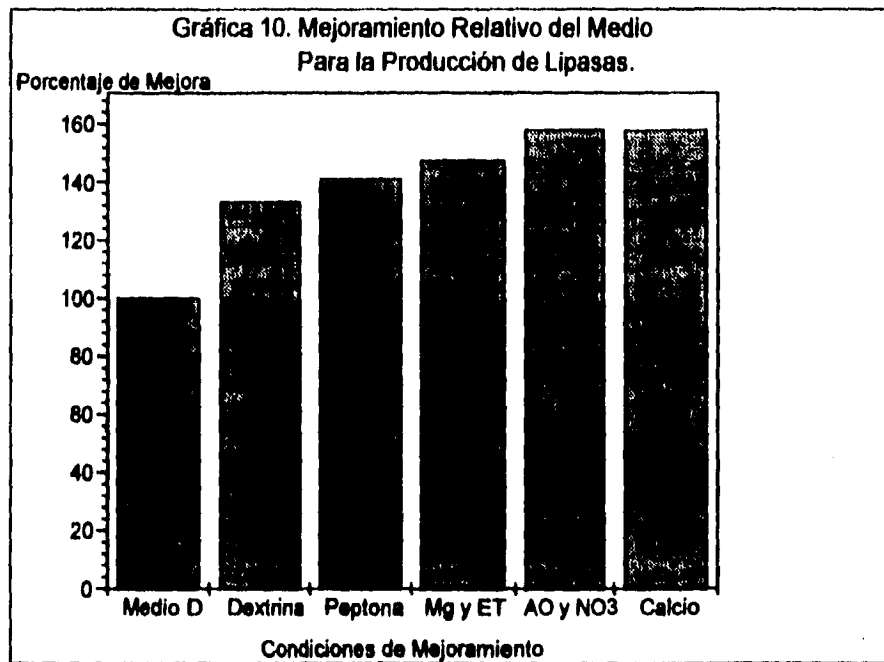
De los resultados del análisis estadístico ($\alpha=0.01$), y como se puede apreciar en la gráfica No. 9, el calcio no posee efecto alguno sobre la actividad lipolítica, por lo menos a la concentración empleada. Debido a que no concuerda en absoluto con lo reportado para otros sistemas, este resultado es muy sorprendente, pues se esperaría que si tuviese efecto, fuera éste positivo o negativo (de acuerdo a lo reportado por Alhir en 1990). Dichos resultados sugieren que con el calcio proporcionado en los elementos traza es suficiente para que el microorganismo se desarrolle y produzca la enzima en las cantidades hasta ahora alcanzadas.

Por otro lado, si bien no tiene efecto sobre la actividad lipolítica, sí lo tiene y de manera considerable en la actividad proteolítica, ya que la incrementa en un 53.16% con respecto a la condición en la que está ausente. Este último resultado y el efecto nulo sobre la actividad lipolítica, hace inadecuado el uso del calcio para la producción de lipasas por este microorganismo.

Es importante señalar que la actividad proteolítica de todas formas aumentó al final en un 52.57% con respecto al medio D original. Esto al parecer es consecuencia de la supresión de nutrientes llevada a cabo en el transcurso del mejoramiento para la producción de lipasas. Sin embargo, debe considerarse que este microorganismo es uno de los que menor actividad proteolítica presenta (Tobalina, 1990), y que al final la actividad lipolítica aumentó considerablemente.

Con base en los resultados anteriores, se decidió eliminar el uso del calcio para la última etapa del mejoramiento del medio.

La evolución del mejoramiento del medio puede apreciarse en la gráfica No. 10.



En esta gráfica puede observarse cómo ha evolucionado la producción de lipasas a medida que se van evaluando y modificando los diferentes elementos constituyentes del medio y por lo que hasta ahora puede apreciarse, el mejoramiento, al menos desde este punto de vista, ya ha alcanzado una meseta. No debe interpretarse esto en el sentido de minimizar el interés por nuevos componentes que puedan tener efecto significativo en la producción. Por el contrario, debe estimularse éste y también la búsqueda de las mejores condiciones de fermentación.

Resultados de la Optimización de la Concentración de los Nutrientes Relevantes.

Para la etapa final, los resultados obtenidos se muestran en la tabla siguiente:

Tabla 22. Resultados de la Optimización.

CORRIDA	BIOMASA mg/mL	pH final	PROTEINA EXTRACELULAR µg/mL
1 (control)	20.24	6.10 ± 0.01	4636.00 ± 74.14
2	13.33	6.47 ± 0.01	2539.00 ± 111.2
3	23.55	6.33 ± 0.02	6510.00 ± 259.4
4	24.00	6.15 ± 0.17	5127.20 ± 287.3
5	19.10	6.22 ± 0.01	2545.30 ± 139.0
6	11.70	6.83 ± 0.50	6700.00 ± 417.0
7	12.56	6.37 ± 0.10	2712.40 ± 23.20
8	26.10	6.48 ± 0.10	2719.00 ± 88.04
9	21.00	6.50 ± 0.11	6542.65 ± 269.00

Continuación de la tabla 22.

CORRIDA	ACTIVIDAD LIPOLITICA µmol ác. but./min mL	ACTIVIDAD PROTEOLITICA µg Tir/mL
1 (control)	126.20 ± 9.20	312.87 ± 20.79
2	117.44 ± 2.05	189.13 ± 8.66
3	40.64 ± 14.40	533.41 ± 45.05
4	62.80 ± 5.06	310.42 ± 6.93
5	11.27 ± 0.54	135.22 ± 1.73
6	128.39 ± 2.70	455.00 ± 17.32
7	130.19 ± 0.92	149.92 ± 8.66
8	25.68 ± 1.01	143.79 ± 3.46
9	115.77 ± 1.71	477.05 ± 10.40

El tratamiento estadístico realizado a los resultados anteriores fue el método de Box-Wilson. Este es un método que permite alcanzar rápidamente el nivel de rendimiento óptimo

en el caso en que dicho rendimiento depende de uno o más componentes del medio de cultivo. Para el empleo de este tratamiento es indispensable el uso de un plan factorial como el que se empleó en este trabajo (Neuwrith, 1957; Kern, 1960; Hunter, 1960; Schultz, 1960).

Del empleo de este método se obtuvo la siguiente ecuación:

$$Y = 95.5327 + 11.5341X_1 + 21.7359X_2 - 18.9818X_3 - 41.1526X_4$$

De donde:

X1= Coeficiente de regresión para la fuente de carbono.

X2= Coeficiente de regresión para la fuente de nitrógeno.

X3= Coeficiente de regresión para el magnesio.

X4= Coeficiente de regresión para el aceite de olivo.

Se observa que los parámetros de regresión X2 y X4 presentan los mayores valores, por lo que se concluye que éstos influyen mayormente en el rendimiento (Neuwrith, 1957; Kern, 1960; Hunter, 1960; Schultz, 1960).

Calculando las unidades de variación para obtener la concentración óptima de cada variable obtenemos lo siguiente:

Fuente de Carbono	X1= 0.1401
Fuente de Nitrógeno	X2= 0.2641
Magnesio	X3= -0.0115
Aceite de Olivo	X4= -1

Lo cual se interpreta como que el factor X1 debe incrementarse en 0.1401 unidades a partir del medio original, el factor X2 incrementarse en 0.2641 unidades, el factor X3

decrementarse en 0.0115 unidades a partir de medio original y el factor X4 decrementarse 1 unidad.

Los resultados para al fuente de carbono y nitrógeno concuerdan bastante bien con reportes para otros sistemas, en los cuales los niveles empleados de estas fuentes son superiores a los del medio D (Chander, 1981; Ishihara, 1989; Okeke, 1990; Valero, 1991; Pokorny, 1994). El hecho de que estos parámetros deban incrementarse puede deberse a que se necesita un mayor desarrollo del microorganismo para incrementar la producción de lipasas. Por otro lado, el resultado para el magnesio es un tanto sorprendente, ya que en la evaluación del mismo se evidenció un efecto positivo. Una posible explicación para ello es pensar que el exceso de Mg^{2+} forma complejos con los nucleótidos trifosfato impidiendo así su utilización para el metabolismo, o bien, que forma complejos con proteínas (que pudieran ser enzimas) ocasionando con ello modificaciones estructurales (Styer, 1988). Sin embargo, este último resultado muestra que no es necesario emplearlo en las cantidades originales del medio D.

El hecho de que deba reducirse la concentración del aceite de olivo ratifica su función como inductor y al parecer sugiere que el microorganismo prefiere utilizar a la dextrina como fuente de carbono. No se descarta la posibilidad de que exista represión por lípidos o ácidos grasos.

Por último, se observa que en cualquiera de las condiciones probadas, la actividad proteolítica aumentó en comparación con el medio D original. Sin embargo, el aumento del 52.57% que se obtuvo hasta la evaluación del calcio, se redujo a un 36.91% en esta última etapa, como consecuencia de variar la concentración de los nutrimentos.

CONCLUSIONES.

La mejor fuente de carbono para la producción de enzimas lipolíticas de *P. caseicum* es la dextrina.

Este sistema, a diferencia de otros (p.e. *R. delemar* y *A. niger*), no presenta regulación en la actividad de sus enzimas lipolíticas por la fuente de carbono, en concentraciones de 1 hasta 4%.

La mejor fuente de nitrógeno para la producción de enzimas lipolíticas de *P. caseicum* es la peptona.

El magnesio tiene un efecto positivo en la producción de las enzimas lipolíticas.

La nueva formulación de elementos traza tiene un efecto positivo en la producción de las enzimas lipolíticas y en el desarrollo microbiano.

El aceite de olivo tiene una función importante en este sistema como inductor de lipasas.

El nitrato como fuente complementaria de nitrógeno tiene un efecto negativo en la producción de enzimas lipolíticas cuando se emplea con aceite de olivo, ya que diluye el efecto inductor de este último.

El nitrato empleado en ausencia de aceite de olivo tiene un efecto positivo en la producción de enzimas lipolíticas.

El calcio no tiene ningún efecto sobre la producción de las enzimas lipolíticas de este sistema. Sin embargo, favorece la producción de enzimas proteolíticas, lo que resulta inconveniente por generar la degradación de lipasas y oligopeptidos responsables de sabores amargos.

La actividad lipolítica del microorganismo se elevó hasta un 158% con respecto a la obtenida en el medio D original.

La actividad proteolítica del microorganismo se redujo en las etapas iniciales de la mejora del medio, es decir, cuando se evaluaron diversos nutrientes. Sin embargo al final de dicha mejora aumentó hasta un 36.91% respecto al medio original.

Al finalizar la optimización, se obtuvo la siguiente ecuación para el medio:

$$Y = 95.5327 + 11.5341X_1 + 21.7359X_2 - 18.9818X_3 - 41.1526X_4$$

RECOMENDACIONES.

Sería conveniente evaluar otras fuentes de carbono no relacionadas tan directamente con la glucosa.

Deben hacerse estudios adicionales sobre la regulación de las enzimas lipolíticas de este sistema a mayores concentraciones de la fuente de carbono.

Aunque se disminuyó la concentración del aceite de olivo a la mitad, deben hacerse estudios adicionales para determinar si es posible una mayor disminución del mismo, lo cual representaría grandes ventajas en términos de formulación del medio.

Además de los parámetros ya evaluados, deben hacerse estudios acerca de las mejores condiciones de temperatura, pH y aereación para la producción de las enzimas lipolíticas de este sistema. La preferencia es evaluar el pH a condiciones constantes a lo largo de la fermentación

Si se desea utilizar este medio para la producción de lipasas con el empleo de este sistema, sería conveniente realizar una inactivación de la actividad proteolítica, a fin de mantener por más tiempo la actividad lipolítica.

El mejoramiento de este medio ya ha alcanzado una meseta en cuanto a sus componentes principales. Sin embargo, es posible continuar la búsqueda de nuevos componentes que incidan de manera significativa en el medio, para seguir incrementando la producción de las enzimas lipolíticas de este sistema.

BIBLIOGRAFIA.

- Alhir, S. y Markakis, P. "Lipase of *Penicillium caseicola*." J. Agric. Food Chem. (38) 598-601 (1990).
- Anónimo "Enzyme Usage Grows as Special Enzyme Systems are Developed." Food Eng. 62 (1) 32 January, (1990).
- Banerjee, M.; Sengupta, I. y Majumdar, S. K. "Lipase Production by *Hansenula anomala* var. *schneeggi*." J. Food Sci and Technol. 22 137-138 March, (1985).
- Berry, D. R. "Physiology of Industrial Fungi" pp.1-15, Blackwell Scientific Publications Oxford, England (1988).
- Bigelis, Ramunas. "Flavor Metabolites and Enzymes From Filamentous Fungi." Food Technol. 1 (11) 151-158 November, (1992)
- Bodie, E. A. "Microorganisms Provide Source Of Industrial Enzymes." Food Eng. 61 (1) 48-50 January, (1989).
- Celerin, E. M. y Fergus, C. L. "Effects of Nutrients, Temperature, and Relative Humidity on Germination of the Ascospores of *Chaetomium thermophile* var *coprophile*." Mycologia 63 1030-1045 (1971).
- Chander, H.; Batish, V.; Ghodekar, D. y Srinivasan, R. "Factors Affecting Lipase Production in *Rhizopus nigricans*." J. Dairy Sci. 64 193-196 (1981).

- Chander, H. y col. "Factors Affecting Lipase Production in *Aspergillus wentii*." J. Food Sci. 45 598-600 (1980).
- Chopra, A.; Chander, H.; Batish, V. y Ranganathan, B. "Factors Affecting Lipase Production by *Mucor racemosus*." J. Food Protection 44 (9) 661-664 (1981).
- Christen, P. y Raimbault, M. "Optimization of Culture Medium for Aroma production by *Ceratozystis fimbriata*." Biotechnol. Lett. 13 (7) 521-526 (1991).
- Conn E. E. y Stumpf P. K. "Outlines of Biochemistry" 3rd Edition Ed. John Wiley & Sons N.Y., USA (1972).
- Cottle, W. E. "Unraveling Proteases Roles." Biotechnology 5 (2) 108-106 (1987).
- Diaz Altamirano, M. "Lipasa: Estudios Sobre su Sintesis en *Penicillium candidum*." Tesis de Maestría UACPyP, CCH. Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, México, D.F. (1992).
- Derewenda, Z. y Sharp, A. "News from the Interface: The Molecular Structures of Triacylglyceride Lipases." Trends Biochem. Sci. 18 20-25 (1993).
- Dwayne D.Hegedus. y George G.K. "Production of an Extracellular Lipase by *Beauveria bassiana*." Biotechnol. Lett. 10 (9) 637-642 (1988).
- Espinosa E., Sánchez S. y Farrés A. "Nutritional Factors Affecting Lipase Production." Biotechnol. Lett. 12 (3) 209-214 (1990).

- Espinosa, E. "Mejoramiento de las Condiciones de Producción de Lipasa de *Rhizopus delemar* Destinada a la Modificación de un Sustrato Lácteo." Tesis de Maestría UACPyP, CCH. Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, México, D.F. (1990).
- Faith, W. T.; Neubeck, C. E. y Reese, E.T. "Production and Application of Enzymes." *Adv. Biochem Eng.* **1** 77-111 (1971).
- Fukumoto, J.; Tsuru, D. y Tamamoto, T. "Studies on Mold Protease I Purification, Crystallization and some Enzyme Properties of Acid Protease of *Rhizopus chinensis*." *Agric. Biol. Chem.* **37** 710-717 (1967).
- Gilbert, J.; Drozd, J. W. y Jones, C. W. "Physiological Regulation and Optimization of Lipase Activity in *Pseudomonas aeruginosa* EF2." *J. Gen. Microbiol.* **137** 2215-2221 (1991)
- Godfrey, T. y Reichelt, "The Application of enzymes in Industry" pp. 1-7 The Nature Press, USA, N.Y. (1983).
- Godtfredsen, S. E. "Microbial Lipases. " En: "Microbial Enzymes and Biotechnology." Fogarty W. M. Chap. 7 Appl. Science Publ. N.Y., USA. (1990).
- Goldberg, I. y Williams, R. " Biotechnology and Food Ingredients." pp. 31-33 Van Nostrand Reinhold N.Y., USA. (1991).
- Harwood, John. "The Versatility of Lipases for Industrial Uses." *Trends Biochem. Sciences.* **14** (4) 125-126 (1989).

- Höfelmann, M.; Hartmann, J.; Zink, A. y Schreier, P. "Isolation, Purification, and Characterization of Lipase Isoenzymes from a Technical *Aspergillus niger* Enzyme." *J. Food Sci.* 50 (6) 1721-1725 (1985).
- Homma, M.; Chibana, H. y Tanaka, K. "Induction of Extracellular Proteinase in *Candida albicans*." *J. Gen. Microbiol.* 139 1187-1193 (1993).
- Hunter, J. S. "Optimize Your Chemical Process with Evolutionary Operation." *Chem. Eng.* (9) 193-202 (1960).
- Ishihara, K.; Suzuki, T.; Yamane, T. y Shimizu, S. "Effective Production of *Pseudomonas fluorescens* Lipase by Semi-batch Culture with Turbidity-dependent Automatic Feeding of both Olive Oil and Iron ion." *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 31 45-48 (1989).
- Iwai, M. y Tsujisaka, Y. "Fungal Lipase." En: "Lipases." Borgström, B. y Brockman, H. Editors Elsevier Science Publishers B. V. Netherlands pp.443-455 (1984).
- Jacobsen, T. y col. "Extracellular and Cell-bound Lipase Activity in Relation to Growth of *Geotrichum candidum*." *Appl. Microbiol.* 32 256-261 (1989).
- Kawasaki W. L. "Efecto de Glucosa Sobre la Producción de Lipasas por *Rhizopus delemar* en Fermentación Sumergida." Tesis Facultad de Ciencias, UNAM. México, D.F. (1991).
- Kennedy, M. J.; Reader, S. L. y Davies, R. J. "The Kinetics of Developing Fermentation Media." *Process Biochem.* 29 529-534 (1994).

- Kern, D. "A Farewell to the Cook-Book." *Ind. Eng. Chem.* 52 36-41 (1960).
- Klibanov, A. M. "Advances in Enzymes." En: "Biotechnology Challenges for the Flavor and Food Industry." Lindsay, R. C. y Willis, B. J. Editores. Elsevier Applied Science N.Y., U.S.A pp. 25-45 (1988).
- Klibanov, A. M. "Enzymes That Work In Organic Solvents." *Chemtech.* June 354-359 (1986).
- Kornacki, K. y Stepaniak, L. "Production of Lipases by Moulds of *Penicillium roqueforti* and *Penicillium candidum* Under Selected conditions of Surface and Submerged Cultivation." *Act. Alim. Polonica VI (XXX)* 281-287 (1980).
- Kunz, Benno. "Cultivo de Microorganismos para la Producción de Alimentos." pp.4-5 Ed. Acribia, S.A. Zaragoza, España (1986).
- Langrand y col. "Lipase Catalyzed Formation of Flavour Esters." *Biotechnol. Lett.* 10 (8) 549-554 (1988).
- López-Munguía A. y Quintero R. "Tecnología Enzimática." Ed. UNAM pp 11. México D.F. (1987).
- Lowry O. H. y col. "Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent." *J. Biol. Chem.* 193 265-275 (1951).
- Martinez, P; Christen, P. y Farrés, A. "Medium Optimization by a Fractional Factorial Design for Lipase Production by *Rhizopus delemar*." *J. Ferment. Bioeng* 76 (2) (1993).

- Matute, P. "Producción y Evaluación de Sistemas Lipolíticos..." Tesis Universidad Iberoamericana 19-20 México, D. F. (1992).
- Meyers, E. y Knight, S. G. "Studies on the Nutrition of *Penicillium roqueforti*" Appl. Microbiol. 6 (3) 174-178 (1958).
- Neuwirth, S. I. y Naphtali, L. M. "New Statistical Method Rapidly Determines Optimum Process Condition." Chem. Eng. (6) 238-242 (1957).
- Niedleman Saul, L. "Enzymes in the Food Industry: A Backward Glance." Food Thecnology 88-91 January (1991).
- O'connor, K. O. y Bailey, J. E. "Hydrolysis of Emulsified Tributyrin by Porcine Pancreatic Lipase." Enzyme Microbiol. Technol. 10 352-356 June (1988).
- Okeke, C y Okolo, B. "The Effect of Cultural Conditions on the Production of Lipase by *Acremonium strictum*." Biotechnol. Lett. (10) 12 747-750 (1990).
- Orozco Barrera, Maria E. "Aplicación de Sistemas Enzimáticos Lipolíticos en la Obtención de Sabores lácteos a Partir de Grasa de Leche." pp. 19-20 Tesis Universidad Iberoamericana, México, D.F. (1993).
- Petrovic S. E. y col. "Effect of Various Carbon Sources on Microbial Lipases Biosynthesis." Biothechnol. Lett. 12 (4) 299-304 (1990).
- Piazza, G; Bilyk, A.; Schwartz, D. y Hass, M. "Lipolysis of Olive Oil and Tallow in a n Emulsifier-free-two-phase System by the Lipase from Oat Seeds." Biotechnol. Lett. (7) 11 487-492 (1989).

- Rapp, P y Backhaus, S. "Formation of Extracellular Lipases by Filamentous Fungi, Yeasts, and Bacteria." *Enz. Microbial Technol.* 14 938-943 November, (1992).
- Rivera-Munoz y col. "Production of Microbial Lipases in a Solid State Fermentation System." *Biotechnol. Lett.* 13 (4) 277-280 (1991).
- Rucka Magdalena y B.Turkiewicz. "Ultrafiltration Membranes as Carriers for Lipase Immobilization." *Enz. Microbial Technol.* 12 52-55 January (1990).
- Sanchez, S. y Farrés, A. "Regulación de Enzimas Microbianas." En: "Tecnología Enzimática." López-Munguía y Quintero, R., Compiladores. Ed. UNAM, México D.F. pp. 38 (1987).
- Stepaniak, L. y col. "Influence de Certaines Conditions de la Culture Superficielle sur la Production des Lipases et des Protéases par de souches de *Penicillium roqueforti* et *Penicillium candidum*." *Memoires Originaux* No. 591-592 Janvier-Février 45-55 (1980).
- Stryer, L. "Biochemistry." W.H Freeman and Co. 3rd. Edition. N.Y., USA (1988).
- Schultz, S.; Reihand, D. y Lind, E. "Statistical Methods in Fermentation Development." *Ind. Eng. Chem.* 52 (10) 827-828 (1960).
- Sztajer, J.; Maliszewska, I. y Wieczorek, J. "Production of Exogenous Lipases by Bacteria, Fungi And Actinomycetes." *Enz. Microbial Technol.* 10 492-497 (1988).
- Teunissen, M. J., Op den Camp, H. J. y col. "Comparision Characteristics of Anaerobic Fungi Isolated From Ruminant and non-Ruminant Hervivores During Cultivation in a Defined Medium." *J. Genl. Microbiol.* 137 (6) 1401-1408 (1991).

- Tobalina, F.; Rivera, M. y Farrés, A. "Generation of Cheese Like Flavours by Lipases From *P. candidum* and *R. delemar*." Proceedings of The XXIII International Dairy Congress. pp.322 Montreal, Canada (1990).
- Tsujiyaka, Y., Iwai, M. y Tominaga, Y. "A Comparative Study on Some Properties of Fungal Lipases." Ferment. Technol. Today IV 315-320 (1972).
- Tsuneo Yamane y col. "Intramolecular Esterification by Lipase Powder in Microaqueous Benzene: Effect of Moisture Content." Biotechnol Bioeng. 34 838-843 (1989).
- Valero, Francisco y col. "Fermentation Behaviour of Lipase Production by *Candida rugosa* Growing on Different Mixtures of Glucose and Olive Oil." J. Ferm. Bioeng. 72(5) 399-401 (1991).
- Varnam, A. H. "The Exploitation of Microorganisms in the Processing of Dairy Products." En: "Exploitation of Microorganisms." Gareth Jones D. Editor Ed. Chapman & Hall, London, England. pp.293-295 (1993).
- Vázquez, E. O. y Rivera-Muñoz, G. "Efecto del Tipo de Fuente de Nitrógeno y Aceites Comestibles Adicionados Sobre la Producción de Lipasas por *Penicillium candidum* en Cultivo en Estado Sólido." Memorias del V Congreso Nacional de Biotecnología (3) 92-94 Puerto Vallarta, México (1993).
- W. Pronk y col. "The Hydrolysis of Triglycerides by Immobilized Lipase in a Hydrophilic Membrane Reactor." Biotechnol Bioeng. 32 512-518 (1988).

-Wang, D. Cooney, C. "Fermentation and Enzyme Technology." pp.46-47 John Wiley & Sons. N.Y. USA (1979).

-Welsh, F. W. "Lipase Mediated Production of Flavor and Fragrance Esters from Fusel Oil." *J. Food Science* 54 (6) 1565-1568 (1989).

-Wiseman, A. "Manual de Biotecnología de los Enzimas." pp. 270-271 Ed. Acribia S.A. Zaragoza, España (1985).

-Zafra, J. M. "La Vida en Bolsas." *Diario "El País."* Madrid, España. Mayo 10 (1992).

ANALISIS DE VARIANZA PARA LA FUENTE DE CARBONO.

One-Way Analysis of Variance

Data: 26.30,28.24,27.27,7.09,12.15,9.62,36.06,36.53,36.295

Level codes: 1,1,1,2,2,2,3,3,3

Labels:

Means plot: Conf. Int. Confidence level: 99 Range test: Duncan

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
Between groups	1104.5288	2	552.26438	223.981	.0000
Within groups	14.7940	6	2.46567		
Total (corrected)	1119.3228	8			

0 missing value(s) have been excluded.

Multiple range analysis for 26.3,28.24,27.27,7.09,12.15,9.62,36.06,36.53,36.295

Method: 95 Percent Duncan

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
2	3	9.620000	*
1	3	27.270000	*
3	3	36.295000	*

contrast	difference
1 - 2	17.6500 *
1 - 3	-9.02500 *
2 - 3	-26.6750 *

* denotes a statistically significant difference.

ANALISIS DE VARIANZA PARA LA FUENTE DE NITROGENO.

One-Way Analysis of Variance

Data: 73.764,52.229,67.394,65.999,57.537,55.505

Level codes: 1,1,1,2,2,2

Labels:

Means plot: Conf. Int. Confidence level: 99 Range test: Duncan

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
Between groups	34.30129	1	34.301286	.447	.5469
Within groups	306.72295	4	76.680738		
Total (corrected)	341.02424	5			

0 missing value(s) have been excluded.

Multiple range analysis for 73.764,52.229,67.394,65.999,57.537,55.505 by 1,1,1,2

Method: 99 Percent Duncan

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
2	3	59.680333	*
1	3	64.462333	*

contrast	difference
1 - 2	4.78200

* denotes a statistically significant difference.

ANALISIS DE VARIANZA PARA EL MAGNESIO Y ELEMENTOS TRAZA.

One-Way Analysis of Variance

Data: 52.35,50.89,55.17,48.26,45.54,46.9

Level codes: 1,1,1,2,2,2

Labels:

Means plot: Conf. Int. Confidence level: 95 Range test: Duncan

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
Between groups	52.274017	1	52.274017	15.881	.0163
Within groups	13.166667	4	3.291667		
Total (corrected)	65.440683	5			

0 missing value(s) have been excluded.

Multiple range analysis for 52.35,50.89,55.17,48.26,45.54,46.9 by 1,1,1,2,2,2

Method: 95 Percent Duncan

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
2	3	46.900000	*
1	3	52.803333	*

contrast	difference
1 - 2	5.90333 *

* denotes a statistically significant difference.

ANALISIS DE VARIANZA PARA EL NITRATO Y ACEITE DE OLIVO.

One-Way Analysis of Variance

Data: 106.2784,110.8583,108.5683,118.7746,122.7176,118.71398

Level codes: 1,1,1,2,2,2

Labels:

Means plot: Conf. Int. Confidence level: 99 Range test: Duncan

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
Between groups	198.38857	1	198.38857	37.762	.0036
Within groups	21.01437	4	5.25359		
Total (corrected)	219.40294	5			

0 missing value(s) have been excluded.

Multiple range analysis for 106.2784,110.8583,108.5683,118.7746,122.7176,118.713

Method: 99 Percent Duncan

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
1	3	108.56833	*
2	3	120.06873	*

contrast	difference
1 - 2	-11.5004 *

* denotes a statistically significant difference.

ANÁLISIS DE VARIANZA PARA EL CALCIO.

One-Way Analysis of Variance

Data: 205.7324, 196.7091, 202.0169, 201.2951, 201.2738, 201.2845

Level codes: 1,1,1,2,2,2

Labels:

Means plot: Conf. Int. Confidence level: 99 Range test: Duncan

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
Between groups	.061004	1	.061004	.006	.9431
Within groups	41.132768	4	10.283192		
Total (corrected)	41.193772	5			

0 missing value(s) have been excluded.

Multiple range analysis for 205.7324, 196.7091, 202.0169, 201.2951, 201.2738, 201.284

Method: 99 Percent Duncan

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
2	3	201.28447	*
1	3	201.48613	*

contrast	difference
1 - 2	0.20167

* denotes a statistically significant difference.