



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

2EJ

**Producción de lipasa por *Rhizopus delemar*
sobre una resina sintética
(Amberlita IRA-900)**

EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO DE ALIMENTOS

P R E S E N T A :

NOE SAUL ANGELES REYES



MEXICO, D. F.

1995

FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.	Profa. Rosa María Ramirez Gama.
Vocal.	Prof. Pierre Christen.
Secretario.	Profa. Zoila Nieto Villalobos.
1er Suplente.	Profa. Ma de Lourdes Escamilla Hurtado.
2do Suplente.	Profa. Ma Guadalupe Tzusuki Reyes.

**TRABAJO QUE SE DESARROLLO EN EL:
LABORATORIO DE BIOPROCESOS DE LA UNIVERSIDAD AUTONOMA
METROPOLITANA UNIDAD IZTAPALAPA.**

ASESOR.



Prof. Pierre Christen.

ASESOR TECNICO.



Profa. Amelia Farrés.

SUSTENTANTE.



Noé Saúl Angeles Reyes.

A LA MEMORIA DE MI MADRE .

Por su eterno amor.

A MI PADRE.

Por darme su mano en el camino difícil de la vida..

A MIS HERMANOS.

Javier, Verónica y Marco Antonio.

Porque ustedes hacen diferente mi vida.

A LA SEÑORA SERAFINA.

Por su gran corazón.

A ROCIO.

Por caminar junto a mi.

AGRADECIMIENTOS.

A mis asesores, con respeto.

Dr. Pierre Christen.
Dra. Amelia Farrés.

A las instituciones que hicieron posible este trabajo.

ORSTOM (Instituto Francés de Investigación Científica para el
Desarrollo en Cooperación.)

Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa.

Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química.

En especial al Dr. Sergio Revah M.

Por permitirme formar parte de su especial grupo de trabajo.

A mis compañeros y amigos del grupo de trabajo del Dr. Sergio R.

Sergio H, Margarita V, Irene P, Evangelina H, Juan Carlos M, Isabel E,
Dr. Fermin P, M en C. Maria Elena A, Clara C, Rufino T, Claudia A,
Maribel.

A mis compañeros y Amigos del grupo de trabajo de la Dra.

Amelia Farrés.

Ismael, Rodolfo, Rene, Ma Luisa, Alicia, Adelfo, Jesus, Enrique, Laura.

**A mis compañeros y amigos de la generación 89 de la facultad de
Química UNAM.**

Armando C, Lorna D, Iliana L, Lupita G, Paty P, Maribel S, Claudia Y,
Jorge A, (Jesus, Mónica, Verónica, Claudia, Sandra) Hugo D, Adriana C,
Guillermo D.

A quienes formaron parte de mi formación profesional.

GRACIAS.

Indice.		
1.	Resumen.	1
2.	Antecedentes.	3
3.	Introducción.	5
3.1.	Enzimas en la Industria de Alimentos.	5
3.2.	Lipasas.	5
3.3.	Selectividad de las lipasas.	6
3.4.	Fermentación sólida.	6
3.4.1.	Definición de fermentación en estado sólido.	6
3.4.2.	Ventajas y desventajas de la fermentación sólida	7
3.4.3.	Antecedentes de la fermentación sólida	7
3.5.	Generalidades de la fermentación en estado sólido	8
3.5.1.	Microorganismos.	8
3.5.2.	Soporte.	9
3.5.2.1.	Pretratamiento del soporte.	9
3.5.3.	Parámetros del proceso	10
3.5.3.1.	Efecto de la temperatura.	10
3.5.3.2.	Efecto de la aireación.	10
3.5.3.3.	Efecto de Aw (Actividad de agua).	10
3.5.3.4.	Efecto del pH.	10
3.5.3.5.	Efecto de la humedad.	11
3.5.3.6.	Tamaño de partícula.	11
3.5.3.7.	Efecto de la concentración del inóculo	11
3.6.	Generalidades de la adsorción.	11
3.6.1.	Tipos de enlace enzima soporte.	11
3.6.2.	Concentración de enzima.	12
3.6.3.	Tiempo de contacto.	12
3.6.4.	Efecto del pH.	12
3.6.5.	Composición del medio.	12
3.6.6.	Cantidad de soporte.	12
3.6.7.	Area específica del soporte.	12
3.6.8.	Desventaja de la adsorción.	12
3.7.	Justificación.	13
4.	Objetivo.	14
5.	Estrategia.	14

6.	Material y Métodos	16
6.1.	Microorganismos.	16
6.2.	Obtención de esporas.	16
6.3.	Condiciones experimentales en los medios de cultivo.	17
6.3.1	Condiciones de cultivo en la selección de la cepa.	17
6.3.2.	Condiciones del medio de cultivo para la fermentación líquida y sólida.	17
6.3.3.	Condiciones de cultivo en la fermentación líquida.	18
6.3.4.	Preparación y condiciones de cultivo en fermentación sólida.	18
6.3.4.1.	Soporte.	19
6.3.4.2.	Pretratamiento del soporte.	19
6.4.	Adsorción de lipasa de <i>Rhizopus delemar</i> y lipasa de <i>Mucor miehei</i> de (Novo Industri Japan Ltd., Japón.) a varias concentraciones de Amberlita entera.	19
6.4.1.	Condiciones de adsorción.	19
6.4.2.	Cinética de adsorción en Amberlita entera y triturada (malla 100).	20
6.5.	Condiciones de desorción.	20
6.5.1.	Desorción con cloruro de sodio.	20
6.5.2.	Desorción a diferentes pH.	20
6.6.	Definición de términos en los experimentos de Adsorción y Desorción.	21
6.7.	Métodos Analíticos.	22
6.7.1.	Determinación de actividad lipolítica.	22
6.7.2.	Determinación de biomasa.	23
6.7.2.1.	Determinación de biomasa en fermentación en medio líquido.	23

6.7.2.2.	Determinación de biomasa en la fermentación en estado sólido.	24
6.7.2.2.1.	Separación biomasa-soporte.	24
6.7.3.	Determinación de pH.	24
6.7.3.1.	Determinación de pH en la fermentación en estado líquido.	24
6.7.3.2.	Determinación de pH en la fermentación en estado sólido.	24
6.7.4.	Determinación de humedad relativa.	24
6.7.5.	Determinación de Actividad de agua(Aw).	24
6.7.6.	Respirometría.	25
6.7.6.1.	Determinación de CO ₂ y O ₂	25
6.7.6.1.1.	Determinación de CDPR y OUR.	25
6.7.6.1.2.	Determinación del coeficiente respiratorio (C.R.).	25
6.7.6.2.	Condiciones de trabajo en el cromatógrafo de gases.	26
7.	Resultados y Discusión.	27
7.1.	Selección de la cepa de trabajo.	27
7.2	Comparación de la lipasa producida por <i>Rhizopus delemar</i> con lipasas comerciales.	27
7.3.	Fermentación líquida.	28
7.3.1.	Cinética de crecimiento y producción de lipasas por <i>Rhizopus delemar</i> en fermentación sumergida.	28
7.3.2.	Efecto de la centrifugación en la actividad lipolítica.	29
7.3.3	Efecto del pH en la estabilidad de la lipasa.	29
7.4.	Fermentación sólida.	31
7.4.1.	Prueba de crecimiento.	31
7.4.2.	Crecimiento y producción de lipasas por <i>Rhizopus delemar</i> en fermentación sólida.	31
7.4.2.1.	Fermentación con Glucosa.	32
7.4.2.2.	Fermentación con Maltosa.	32
7.4.2.3.	Fermentación con Dextrina.	35

7.4.3.	Comparación de la producción de lipasas con las diferentes fuentes de carbono.	35
7.5.	Relación Soporte-Enzima.	39
7.5.1.	Experimentos de desorción.	39
7.5.1.1.	Adsorción de lipasa comercial de <i>Mucor miehei</i> y <i>Rhizopus delemar</i> en Amberlita IRA- 900.	39
7.5.1.2.	Adsorción de lipasa de <i>Rhizopus delemar</i> en Amberlita triturada.	42
7.5.1.3.	Porcentajes de lipasa adsorbida no expresada.	42
7.5.1.4.	Estabilidad de la lipasa de <i>Rhizopus delemar</i> con Amberlita.	44
7.5.1.5.	Cinética de adsorción de lipasa en Amberlita	44
7.5.2.	Experimentos de desorción.	46
7.5.2.1.	Desorción de lipasa con cloruro de sodio.	46
7.5.2.2.	Desorción de lipasa a diferentes pH.	46
7.6.	Termorresistencia de la lipasa adsorbida en Amberlita.	48
8.	Conclusiones.	49
9.	Bibliografía.	51

Indice de Figuras

Fig. 5.1.	Estrategia. Diagrama de flujo.	15
Fig. 6.3.4.	Equipo para fermentación en estado sólido	18
Fig. 6.7.1.	Titulador potenciométrico.	22
Fig. 7.1	Cinética de producción de lipasas por <i>R. delemar</i> . Efecto de la centrifugación en la actividad lipolítica.	30
Fig. 7.2	Estabilidad del extracto a diferentes pH.	30
Fig. 7.3	Evolución de la respirometría y producción de lipasas de <i>R. delemar</i> crecido en Amberlita (Glucosa 20g/l).	33
Fig. 7.4	Evolución del pH, humedad y actividad lipolítica de <i>R. delemar</i> crecido en Amberlita (Glucosa 20g/l).	33
Fig. 7.5	Evolución de la respirometría y producción de lipasas de <i>R. delemar</i> crecido en Amberlita (Maltosa 20g/l).	34
Fig. 7.6	Evolución del pH y actividad lipolítica de la fermentación sólida de <i>R. delemar</i> (Maltosa 20g/l).	34
Fig. 7.7	Evolución de la respirometría y producción de lipasas de <i>R. delemar</i> crecido en Amberlita (Dextrina 20g/l).	36
Fig. 7.8	Cinética de producción de lipasas de <i>R. delemar</i> crecido en Amberlita (Sustrato 20g/l).	36
Fig. 7.9	Adsorción de lipasa comercial de <i>M. miehei</i> en Amberlita	40
Fig. 7.10	Actividad lipolítica adsorbida y expresada de lipasa comercial de <i>M. miehei</i> en Amberlita.	40
Fig. 7.11	Adsorción de lipasa de <i>R. delemar</i> en Amberlita.	41
Fig. 7.12	Actividad lipolítica adsorbida y expresada de lipasa de <i>R. delemar</i> en Amberlita.	41
Fig. 7.13	Adsorción de lipasa de <i>R. delemar</i> en Amberlita triturada.	43
Fig. 7.14	Actividad lipolítica adsorbida y expresada de lipasa de <i>R. delemar</i> en Amberlita triturada.	43
Fig. 7.15	Porcentaje de actividad lipolítica no expresada en Amberlita entera y triturada.	43
Fig. 7.16	Evolución de la actividad lipolítica vs tiempo . Influencia de la presencia de Amberlita.	45
Fig. 7.17	Cinética de adsorción de lipasas de <i>R. delemar</i> en Amberlita entera y triturada.	45

Fig. 7.18	Porcentaje de desorción de lipasa de <i>R. delemar</i> a diferentes concentraciones de NaCl (pH=6).	47
Fig. 7.19	Porcentaje de desorción de lipasa de <i>R. delemar</i> a diferentes pH.	47

Indice de Tablas.

Tabla 3.4.3.	Antecedentes de la fermentación sólida.	8
Tabla 6.1.	Cepas utilizadas en la selección.	16
Tabla 7.1.	Tamaño promedio de los halos de hidrólisis.	27
Tabla 7.2.	Actividad lipolítica de lipasa de <i>Rhizopus delemar</i> y lipasas comerciales.	28
Tabla 7.4.1.	Crecimiento de <i>Rhizopus delemar</i> en caja petri con diferentes fuentes de carbono.	31
Tabla 7.4.3.	Comparación de la productividad de lipasas en fermentación sólida y líquida.	37
Tabla 7.4.3.1.	Comparación de los resultados experimentales con los de la literatura.	38
Tabla 7.5.	Relación soporte-enzima en ambos tamaños de Amberlita y relación con la fermentación en estado sólido.	48

1. Resumen.

Las lipasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de triacilglicéridos en la interfase aceite-agua, pueden ser de origen animal (páncreas de porcino), vegetal (semillas oleaginosas) o microbiano (bacterias, hongos y levaduras), son ampliamente utilizadas en la industria de los alimentos, principalmente la industria de procesamiento de lácteos para la obtención de quesos y cremas maduradas, modificación de grasas de la leche y en la elaboración de yogurt, entre otros.

En los últimos años se ha tratado de mejorar los métodos de obtención de lipasas optimizando los medios de cultivo y las variables físicas que intervienen en el crecimiento de los microorganismos, como temperatura y pH, entre otros.

En el presente trabajo se caracteriza el crecimiento y producción de lipasas por *R. delemar* en fermentación sólida utilizando una resina de intercambio iónico (Amberlita IRA-900) como soporte y se caracteriza la relación soporte-lipasa.

De dos cepas de *Rhizopus delemar* se seleccionó la mayor productora de lipasas, considerando a *Rhizopus delemar* CDBB H313. La selección se hizo en base al diámetro de halos de hidrólisis de triacilglicéridos en caja Petri.

Se realizó una cinética de crecimiento y producción de lipasas en medio líquido obteniéndose la mayor producción de lipasas a las 48h de la fermentación (14.07 U/ml). Se observó que el extracto lipolítico es más estable a pH de 5 aunque el pH óptimo de la lipasa es de 6.5.

Previo a la fermentación sólida, se hicieron pruebas de crecimiento en caja Petri utilizando glucosa, maltosa, almidón y dextrina como fuentes de carbono, siendo dextrina la fuente de carbono con la cual se observó mayor crecimiento de las colonias, precedida de maltosa y glucosa, descartando al almidón por presentar un crecimiento bajo.

Fue posible el crecimiento y producción de lipasa por fermentación sólida, utilizando dextrina, maltosa y glucosa como fuentes de carbono, observándose la mayor producción de lipasas con dextrina (15.66U/ml o 95.62U/g.MS), alrededor de las 20h de fermentación.

Se adsorbió lipasa de *Rhizopus delemar* en Amberlita entera y triturada (diámetro de partícula de 0.53mm y 0.10mm. respectivamente), obteniéndose valores de adsorción de 10% para la lipasa de *R. delemar* en Amberlita entera y 98.7% en Amberlita triturada. Se observó que la cantidad de lipasa que se adsorbe, no se expresa en su totalidad, es decir hay pérdidas de lipasa posiblemente por los fenómenos de impedimento estérico, bloqueo de sitios activos, gradientes de

concentración intraparticular y adsorción en multicapas, que se pueden presentar cuando se adsorbe una enzima por el método de adsorción.

Se trató de desorber la lipasa de *R. delemar* de la Amberlita, cambiando el pH del medio y adicionando varias concentraciones de NaCl para favorecer el intercambio iónico, logrando desorber solamente un 37.7% de lipasa con 5g de NaCl.

2. Antecedentes.

Dentro del amplio campo de la biotecnología las enzimas han ido adquiriendo cada día mayor importancia. Entre gran variedad de estas, son de especial interés para el presente trabajo las lipasas o glicerol éster hidrolasas (EC 3.1.1.3)

Aunque el principal mercado de las lipasas sigue siendo para las de origen animal (extraídas de glándulas) (López-Munguía, 1993), existe un potencial importante en lipasas de origen microbiano, siendo de especial interés su aplicación en productos lácteos, debido a que la composición de la grasa de la leche hace posible el uso de lipasas para el desarrollo de nuevos sabores, mejorando la palatabilidad, aroma y aceptación de los productos fermentados de leche. En varios tipos de quesos las lipasas son de gran importancia, debido a que promueven la madurez del queso y a su vez generan sabores, proporcionando al queso cuerpo y textura; algunos ejemplos de esto son: el desarrollo de sabor del queso tipo Cheddar utilizando lipasas de *Aspergillus oryzae*, el uso de *Penicillium camemberti* y *Penicillium candidum* en la manufactura de queso tipo Camembert y Brie (Arnold *et al.* 1974).

Además de las diferentes aplicaciones que se tienen para las lipasas, también hay un gran número de investigaciones dedicadas a optimizar los procesos de producción de estas. Entre otros se encuentran: la optimización de las condiciones de producción y de máxima actividad de la lipasa de *Penicillium caseicolum* (Alhir *et al.* 1990) y optimización del medio de crecimiento para la producción de lipasa de *Pseudomonas fragi* (Alford & Pierce, 1963). Los trabajos anteriores se han hecho por fermentación sumergida, sin embargo, la fermentación en estado sólido también ofrece una importante alternativa para la producción de lipasas. Por ejemplo: se puede citar el trabajo de Rivera-Muñoz *et al.* (1991), en la producción de lipasas de *P. candidum*, *Mucor miehei* y *P. camembertii* crecidos sobre salvado de trigo

Entre la gran variedad de hongos productores de lipasas, también se encuentra *Rhizopus delemar*. Diferentes cepas de este hongo se han sometido a varios estudios que tienen como principal objetivo la producción de lipasas. Entre otros trabajos se han hecho investigaciones sobre su crecimiento y la producción de lipasas sobre espuma de poliuretano, quedando a su vez las células inmovilizadas (Chen & Mc Gill, 1992). También se han hecho estudios sobre su capacidad productora de lipasas utilizando glicerol como fuente de carbono (Haas & Bailey, 1993), por otro lado Martínez *et al* (1993) optimizaron el medio de cultivo para incrementar la producción de lipasas en fermentación líquida, para la cepa CDBB

H313. Esta misma cepa y medio de cultivo se utilizarán en el presente trabajo, con la finalidad de caracterizar su crecimiento y producción de lipasas en fermentación sólida, utilizando Amberlita IRA-900 como soporte.

Por otro lado, en el departamento de Ingeniería Química de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, lugar de donde se desarrolló el presente trabajo, se están realizando trabajos de biodegradación de gases de proceso por biofiltración y producción de aromas por *Ceratocystis fimbriata* por fermentación en estado sólido (Christen *et al.* 1992). También se han realizado trabajos sobre la producción de enzimas proteolíticas y metabolismo microbiano sobre soportes sólidos (Amberlita IRA-900) mediante el uso del hongo del género *Aspergillus* (Auria *et al.* 1990), así como la producción de lipasas por *Yarrowia lipolytica* en fermentación líquida y sólida utilizando Amberlita como soporte (Corzo, 1993).

3. Introducción.

3.1. Enzimas en la Industria de Alimentos.

Las enzimas son moléculas homo- o hetero-proteicas que catalizan reacciones químicas, por lo general son específicas de las reacciones que catalizan y se ha identificado una gran variedad. Muchas de ellas, tienen una amplia gama de aplicaciones en el área de alimentos, produciendo metabolitos de interés y modificando algunas propiedades del alimento (Anónimo, 1989).

Algunas de las tantas aplicaciones de enzimas en la industria alimentaria son: generación de sabores en productos lácteos por lipasas y proteasas, coagulación de proteínas en la fabricación de quesos por proteasas, clarificación de jugos por pectinasas, producción de jarabes fructosados por isomerasas, producción de leche con bajos niveles de lactosa por hidrolasas y en la panificación el uso de amilasas, entre otras (Wasserman, 1990).

Las enzimas son de origen vegetal, animal o microbiano (levaduras, hongos y bacterias). En el campo de la biotecnología se ha explotado principalmente la producción de enzimas de origen microbiano y en la actualidad existe un gran número de investigaciones dedicadas a mejorar los niveles de producción de enzimas por manipulación genética y optimización de condiciones, buscando como principal objetivo obtener eficiencia en varias operaciones del proceso, como son: establecer condiciones fisicoquímicas de la fermentación, procesos prácticos para recuperar metabolitos (Harlander, 1989), así como proceso de escalamiento a nivel industrial (Geraats, 1994).

3.2. Lipasas.

En el presente trabajo se hará referencia a un tipo de enzima llamada lipasa; Las lipasas son definidas como glicerol éster hidrolasas (EC 3.1.1.3), e hidrolizan tri, di y monoglicéridos en la interfase aceite-agua. Para que lleven a cabo su función el sustrato debe ser insoluble en agua. Si decrece el contenido de agua en el medio de reacción, las lipasas pueden llevar a cabo reacciones de síntesis e interesterificación de grasas y aceites. También, como el resto de las enzimas, las lipasas se originan de fuentes animales, vegetales y microbianas, como levaduras y bacterias; los microorganismos utilizan a las lipasas para degradar triacilglicéridos de origen animal o vegetal que utilizan como fuente de carbono y energía para su crecimiento (Novotny *et al.* 1988). Desde el punto de vista industrial las lipasas extracelulares presentan ventajas sobre aquellas intracelulares, por el hecho de ser

más fácilmente recuperables, evitando así la ruptura celular y facilitando su purificación (Priest, 1985).

3.3. Selectividad de las lipasas.

Las lipasas microbianas pueden hidrolizar el triacilglicérido en posiciones 1 y 3 obteniéndose ácidos grasos libres, 1-monoglicérido o 1,3-diglicérido que se podrían hidrolizar posteriormente; a este tipo se le llama lipasa específica, por otra parte la lipasa no específica no distingue entre las tres posiciones del triacilglicérido. La especificidad de las lipasas depende del tipo y origen de estas (Arnold *et al.* 1974).

3.4. Fermentación sólida.

La mayoría de las investigaciones sobre producción de enzimas se han hecho por fermentación en estado líquido. En los últimos años la fermentación en estado sólido (FES) ha representado otra opción para el crecimiento microbiano y la producción de metabolitos de interés.

3.4.1. Definición de fermentación en estado sólido.

En términos generales se refiere al tratamiento de un material húmedo, no suspendido en el agua y sin escurrimiento acuoso, que permite el desarrollo de una fermentación empleando uno o varios microorganismos. En todos los casos los microorganismos pueden ser hongos, bacterias o levaduras. Según Auria *et al.* (1990), la fermentación en estado sólido, es un sistema de cuatro fases, donde la fase continua es una mezcla de gases que fluyen a través de un lecho sólido, compuesto por un soporte insoluble en agua, que contiene absorbida una solución acuosa de nutrientes, sin observarse drenaje alguno y considera como la última fase al microorganismo que crece en el soporte o en el espacio libre interparticular. En los procesos de fermentación en estado sólido el material húmedo puede o no cumplir con las funciones del sustrato; en ocasiones simplemente actuará como soporte inerte mientras que en otras será la fuente directa de carbono y energía. En el primer caso, el sustrato, junto con los demás nutrientes, deberá absorberse previamente en el soporte (Oriol *et al.* 1988).

3.4.2. Ventajas y desventajas de la Fermentación sólida.

Como se mencionó anteriormente la fermentación en estado sólido se define como: cualquier proceso microbiano en donde el crecimiento del microorganismo y la formación de producto se lleva a cabo en la superficie y/o dentro de materiales sólidos con bajo contenido de humedad (Mudgett, 1986). Estos procesos presentan ventajas apreciables sobre los de fermentación líquida, pero también presentan algunas desventajas. Lo anterior lo analizaron: Moo-Young, *et. al.* (1983); Raimbault,(1980); Bailey & Ollis, (1987), y se presentan a continuación:

Ventajas.

- Trabaja en condiciones no estériles.
- No requiere grandes cantidades de agua
- Se obtienen rendimientos altos.
- Produce pocos efluentes
- Da productos concentrados que facilitan su extracción.
- El volumen del reactor es reducido.
- Requieren menos energía.

Desventajas.

- Se encuentran importantes problemas de transferencia de calor y masa
- El sustrato requiere casi siempre de un pretratamiento químico y/o físico.
- El tamaño del inóculo debe ser muy alto.
- Requiere mucha mano de obra.

No es sencillo seleccionar la tecnología adecuada con las ventajas y desventajas que aquí se presentan, debido a que cada caso requerirá de un análisis particular.

3.4.3. Antecedentes de la fermentación sólida.

La fermentación en estado sólido ha sido utilizada desde la antigüedad y revisada por varios autores. (Aidoo *et al.* (1982), Pandey (1991)) y se muestra a continuación la evolución histórica de este proceso fermentativo.

Tabla 3.4.3. Antecedentes de la Fermentación Sólida.

2600 a.c.	Elaboración de pan por los Egipcios
2500 a.c.	Fermentación de pescado, preservación con azúcar, sales etc. Inicializa el proceso del koji en China y Japón.
1000 a.c.	Elaboración de queso por <i>Penicillium roqueforti</i> .
Siglo XVIII	Elaboración de vinagre de manzana.
1860-1900	Composteo para tratamiento de aguas residuales.
1900-1920.	Elaboración de ácido kójico y producción de enzimas fúngicas.
1920-1940.	Producción de ácido glucónico y cítrico.
1940-1950.	Gran desarrollo en la industria de la fermentación. Producción de penicilina en sistema sólido y líquido.
1950-1960	Transformación de esteroides por cultivos fúngicos.
1960-1980.	Producción de micotoxinas y de proteínas para el enriquecimiento de alimentos.
1980.	Elaboración de varios productos como alcohol, ácido giberélico, ácido cítrico y producción de enzimas.

Como se puede observar, en los últimos años la fermentación en estado sólido ofrece un potencial interesante para la producción industrial de enzimas, ácidos orgánicos y antibióticos por medio del empleo de microorganismos; algunas especies de hongos y levaduras en condiciones ambientales de baja humedad y asepsia natural pueden proporcionar concentraciones elevadas de producto poco usuales y una reducción de requerimientos de energía para la esterilización, la transferencia de oxígeno y recuperación de producto.

3.5. Generalidades de la fermentación en estado sólido.

3.5.1. Microorganismos.

En general el tipo de microorganismo que puede crecer en condiciones de fermentación sólida queda determinado por la actividad de agua (A_w), la cual es definida como la humedad relativa del aire en equilibrio con el sustrato. La actividad de agua determina la transferencia de agua y solutos a través de la membrana celular y su control puede ser empleado para modificar la producción metabólica de un microorganismo (Pandey *et al.* 1991).

3.5.2. Soporte.

La matriz sólida debe tener la capacidad de absorber la cantidad de agua necesaria para que el microorganismo lleve a cabo adecuadamente las reacciones metabólicas vinculadas a su crecimiento y desarrollo (Viniestra, 1988).

Los soportes utilizados en la fermentación sólida son muy variables y en su mayoría son de bajo costo y provienen de desechos industriales. Según la revisión de Pandey *et al.* (1991), se ha utilizado bagazo de caña para producción de penicilina por *Penicillium chrysogenum*, salvado de trigo para producción de lipasas por *Penicillium spp.*, *Geotrichum candidum*, *Mucor meihei*, *Rhizopus arrhizus* y *Rhizopus delemar*, así como frijol de soya para el crecimiento de *Rhizopus oligosporus*.

En la mayoría de los casos se trata de soportes que no tienen propiedades bien definidas, lo que dificulta un mayor entendimiento de aspectos tales como la cinética de crecimiento y fenómenos de transporte. A fin de evitar esto, se ha empleado en estudios recientes una resina polimérica aniónica (Amberlita IRA-900) impregnada con una solución nutritiva, para la caracterización del crecimiento de *Aspergillus niger* (Auria *et al.* 1990), así como para el crecimiento de la levadura *Candida utilis*. utilizando glucosa y etanol como fuente de carbono (Christen *et al.* 1993). El uso de estos soportes permite al microorganismo usar carbohidratos monoméricos inmediatamente, se evita la destrucción de la matriz sólida durante el crecimiento, lo que permite asegurar condiciones geométricas de empaque constantes y además facilita comparaciones con cultivos sumergidos (Oriol *et al.* 1988). Algunos de estos soportes se pueden utilizar para inmovilizar a la célula, como lo muestra Chen & Mc Gill (1992), donde se utiliza espuma de poliuretano como soporte para el crecimiento, inmovilización y producción de lipasas de *Rhizopus delemar*; en el área de producción de aromas se ha utilizado celita y poliuretano donde se absorbe y atrapa lipasa de *Candida cylindracea* para producir L- mentol-5-fenil valerato, según la revisión de Christen & López (1994). Como se puede observar, existe una amplia gama de soportes para fermentación en estado sólido y el uso de cada uno dependerá del objetivo del estudio.

3.5.2.1. Pretratamiento del soporte.

Los pretratamientos tienen la función de aumentar el área de contacto, reteniendo agua y nutrientes solubles, proporcionar lugares de fácil penetración microbiana, entre otros. Pueden ser tratamientos químicos o mecánicos, desde descascarado, lavado con agua, humidificación, vaporización, pulido, tamizado,

fragmentación, molienda hasta tratamientos químicos con álcali, cloruro de sodio, o soluciones ácidas.

3.5.3. Parámetros del proceso.

En general para la fermentación en estado sólido existen varios parámetros importantes que ayudan a la obtención de mejores resultados. Estos parámetros son: temperatura, aireación, A_w , pH, humedad, tamaño de partícula e inóculo. Debido a que cada sistema en particular requiere de condiciones específicas, a continuación se mencionan algunos de los aspectos más relevantes de cada parámetro.

3.5.3.1. Efecto de la temperatura.

Este parámetro en particular debe mantenerse fijo, ya que el crecimiento celular siempre trae asociadas importantes cantidades de calor metabólico, que tienden siempre a calentar el medio de cultivo y pueden acelerar o parar el desarrollo celular o secar el medio de cultivo.

3.5.3.2. Efecto de la aireación.

La tasa con que se alimenta el aire es siempre directamente proporcional al desarrollo del fenómeno de secado, indeseable en todo sistema de fermentación sólida, debido a que la deshidratación del medio de cultivo provoca que la transferencia de nutrientes y metabolitos producidos sea muy lenta, la presión osmótica del medio aumenta y se acelera el proceso de conidiación e inicia la síntesis de metabolitos secundarios. Para controlar este parámetro se sugiere alimentar el aire siempre saturado.

3.5.3.3. Efecto de A_w (actividad de agua).

La actividad de agua se puede definir como la humedad relativa de la atmósfera gaseosa, que se encuentra en equilibrio con la humedad del sustrato. Este concepto no solo incluye la presencia del solvente sino también la disposición del mismo en función de los solutos y metabolitos presentes. En la fermentación sólida, al principio cuando el agua se encuentra más disponible se ve alterada por fuerzas intermoleculares desiguales entre las moléculas del soluto a solvente, solvente a solvente y de sustrato a solvente; después el agua se incorpora a las células y finalmente las fuerzas entre metabolitos extracelulares y solvente también impedirán al agua estar disponible.

3.5.3.4. Efecto del pH.

En el desarrollo de la fermentación se pueden producir metabolitos que ocasionan algunas veces la disminución o el aumento de pH en el sistema, esto puede traer como consecuencia la inhibición de la actividad metabólica del microorganismo. La capacidad amortiguadora de algunos sustratos ayuda a la eliminación de control de pH durante la fermentación. Esta ventaja es aprovechada al ajustar el pH inicial de los sólidos durante la impregnación de los nutrientes (Raimbault, 1980).

3.5.3.5. Efecto de la Humedad.

La humedad es uno de los parámetros más críticos en la fermentación en estado sólido. Es importante tener un sustrato con suficiente humedad para el crecimiento del hongo, sin superar el nivel que traería como consecuencia el crecimiento de bacterias, disminución de la porosidad del soporte y disminución de la difusión de oxígeno. El óptimo de humedad dependerá del tipo de productos deseados y condiciones del cultivo.

3.5.3.6. Tamaño de partícula.

Del tamaño de partícula depende la transferencia de calor, intercambio de gases que habrá en el fermentador y el área de crecimiento. Si el tamaño de partícula es muy pequeño, habrá una mayor superficie para el crecimiento del microorganismo, provocando grandes caídas de presión y zonas anaerobias en el fermentador.

3.5.3.7. Efecto de la concentración del inóculo.

En la fermentación sólida se debe inocular elevadas concentraciones de espora, para asegurar que no se presenten contaminaciones durante la fermentación. Si la densidad es alta puede haber escasez de nutrientes necesarios para la formación del producto.

3.6. Generalidades de la Adsorción.

El crecimiento de *Rhizopus delemar* sobre una resina de intercambio iónico (Amberlita IRA-900), involucra la adsorción entre las enzimas producidas en la fermentación y la resina. Monsan (1987) menciona algunos de los fenómenos involucrados en la adsorción de enzimas y se mencionan a continuación.

3.6.1. Tipos de enlace enzima - soporte.

Cada sistema enzima- soporte está sujeto a varios tipos de fuerza de atracción como pueden ser:

- Fuerzas de Van der Waals.
- Interacciones hidrofóbicas.
- Puentes de hidrógeno.
- Transferencia de cargas.
- Intercambio de ligandos.
- Intercambio de iones.
- Quimiosorción.

3.6.2. Concentración de Enzima.

La adsorción de la enzima es creciente hasta un punto de saturación del soporte y posteriormente se mantiene constante, tendencia descrita en las isotermas de saturación de Langmuir y Freundlich.

3.6.3. Tiempo de contacto.

La velocidad de adsorción dependerá de las características fisicoquímicas de la enzima y del soporte; de las dimensiones de las moléculas, las cargas eléctricas presentes, etc., y aumentará con la temperatura.

3.6.4. Efecto del pH.

Está orientado hacia la modificación de cargas naturales tanto del soporte como de la enzima, según el valor de pH de los grupos ionizables. Se ha observado que la adsorción es máxima alrededor del punto isoeléctrico, donde la solubilidad de proteínas es mínima.

3.6.5. Composición del medio.

Se ha visto que a determinadas concentraciones, la presencia de solventes orgánicos y de sales produce un efecto favorable a la adsorción.

3.6.6. Cantidad de soporte.

En una solución dada es posible aumentar la cantidad de soporte hasta lograr la adsorción de casi la totalidad de la enzima.

3.6.7. Area específica del soporte.

Es un parámetro fundamental que puede decidir el que un soporte dado sea adecuado para adsorber una enzima. Los posibles fenómenos de impedimento estérico, así como los gradientes de concentración intraparticular, pueden disminuir la actividad enzimática observada, a pesar de adsorber una cantidad considerable de enzima.

3.6.8. Desventaja de la adsorción.

La molécula de enzima no es modificada por la adsorción pero la actividad del complejo no es proporcional a la enzima adsorbida, ya que puede existir adsorción en multicapas que limita el acceso del sustrato a las capas internas.

3.7. Justificación.

Dentro de un screening de 20 hongos productores de lipasas se seleccionó *Rhizopus delemar*, este es un hongo filamentoso que presenta un comportamiento bueno en fermentación líquida. Sin embargo se ha demostrado que su producción de lipasas y proteasas en un sistema sólido utilizando salvado de trigo como soporte es baja. Por otro lado la lipasa de *Rhizopus delemar* además de producir sabores típicos a queso cuando actúa sobre un sustrato lácteo, ha demostrado ser versátil por sus múltiples aplicaciones industriales, por ejemplo: síntesis de esteres (Langrand *et al.* 1988), producción de pan (Mohsen, 1986), síntesis de emulsificantes alimentarios (Nagao, 1989) y transesterificación en modificación de grasas (Osterberg, 1989), entre otros. Por lo tanto y debido a sus múltiples aplicaciones industriales, no es necesario abrir un mercado para esta lipasa. El presente trabajo surge de la necesidad de optimizar la producción de lipasas de *Rhizopus delemar* en un sistema sólido utilizando Amberlita como soporte, analizando su comportamiento cuando se utiliza un medio nutritivo que ha dado buenos resultados en la producción de lipasas en fermentación líquida.

4. Objetivo

- Caracterizar el crecimiento y la producción de lipasas por *Rhizopus delemar* en fermentación sólida así como la relación Enzima /Soporte.

5. Estrategia.

1.- De dos cepas de *Rhizopus delemar* seleccionar la de mayor actividad lipolítica y evaluarla con preparaciones comerciales de lipasas.

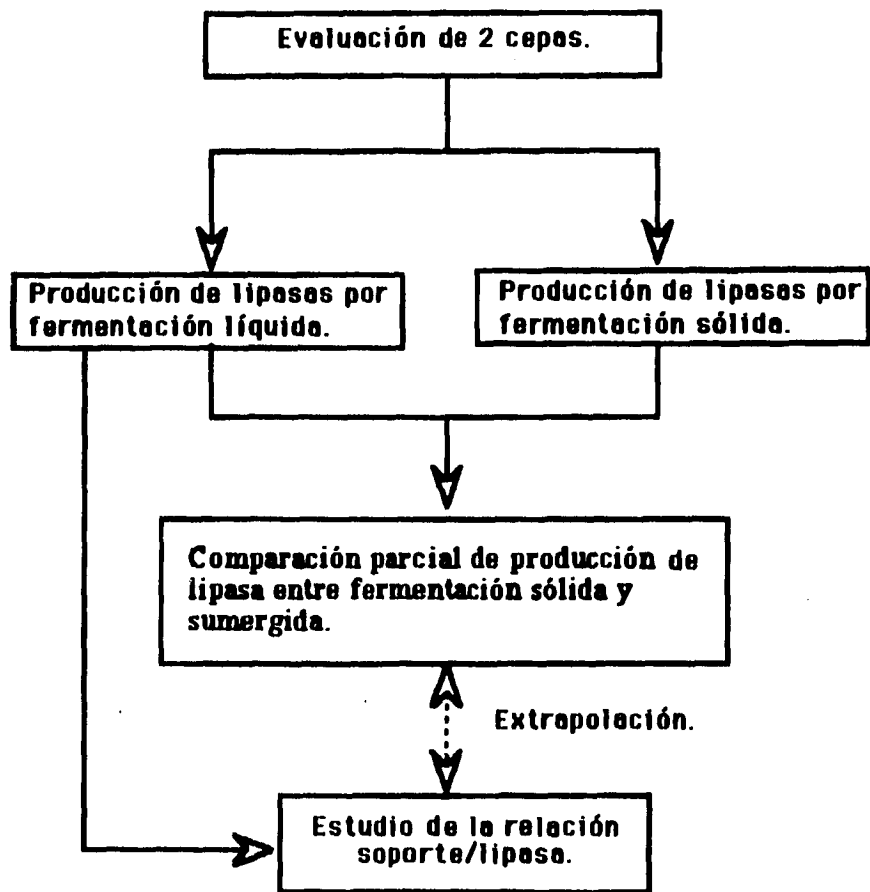
2.- Reproducir los experimentos de cinética de crecimiento y producción de lipasa por *Rhizopus delemar* en fermentación sumergida hechos por Martinez *et al.* (1993).

3.- Establecer la cinética de crecimiento y producción de lipasas por *Rhizopus delemar* en fermentación sólida utilizando tres fuentes de carbono dextrina, maltosa y glucosa con un flujo de aireación de 0.5l/h.gMS.

4.- Hacer una comparación parcial de la producción de lipasas entre los dos tipos de fermentaciones.

5.- Estudiar la relación soporte/enzima, con la finalidad de obtener los porcentajes de adsorción y desorción de lipasa en Amberlita, e inferir en los resultados de producción de lipasas en medio sólido.

Fig. 5.1. Estrategia. Diagrama de flujo.



6. Material y Métodos.

6.1. Microorganismos.

En el presente trabajo se inicializaron los experimentos haciendo una comparación de la producción de lipasas entre las siguientes cepas.

Tabla. 6.1. Cepas utilizadas en la selección.

Cepa.	Origen.
<i>Rhizopus delemar</i> CDBB H313	CINVESTAV IPN México.
<i>Rhizopus delemar</i> NRRL 1472	CINVESTAV IPN México.

La cepa *Rhizopus delemar* CDBB H313 se mantuvo en agar papa dextrosa a 29°C y fue resemebrada cada mes. El liofilizado de la cepa NRRL 1472 de *Rhizopus delemar* se recuperó en medio nutritivo y posteriormente se sembró en agar papa dextrosa, se incubó a 29°C durante 6 días para su propagación.

6.2. Obtención de esporas.

Las esporas de *Rhizopus delemar* fueron sembradas en matraces Erlenmeyer de 250ml, con 50ml de agar papa dextrosa, e incubadas a 29°C durante 6 días; las esporas se cosecharon con 10ml de agua destilada, 2ml de Tween 80, perlas de vidrio y agitación constante durante 5 min. De esta solución de esporas se tomó 1ml y se hizo una dilución 1:9 en agua destilada. El conteo de esporas se hace en cámara de Neubauer, cuantificándolas mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Esporas/ml} = \text{No de esporas promedio} \times \text{factor de corrección} \times \text{dilución.}$$

Donde el factor es 25×10^4 (Dado por la geometría de la celda).

El número de esporas por mililitro de medio utilizado en la fermentación sumergida fue: 1×10^7 , en la fermentación en sólido se utilizaron 1×10^7 esp/g.MS.

Donde MS se refiere a la materia seca o soporte (Amberlita).

6. Material y Métodos.

6.1. Microorganismos.

En el presente trabajo se inicializaron los experimentos haciendo una comparación de la producción de lipasas entre las siguientes cepas.

Tabla. 6.1. Cepas utilizadas en la selección.

Cepa.	Origen.
<i>Rhizopus delemar</i> CDBB H313	CINVESTAV IPN México.
<i>Rhizopus delemar</i> NRRL 1472	CINVESTAV IPN México.

La cepa *Rhizopus delemar* CDBB H313 se mantuvo en agar papa dextrosa a 29°C y fue resembrada cada mes. El liofilizado de la cepa NRRL 1472 de *Rhizopus delemar* se recuperó en medio nutritivo y posteriormente se sembró en agar papa dextrosa, se incubó a 29°C durante 6 días para su propagación.

6.2. Obtención de esporas.

Las esporas de *Rhizopus delemar* fueron sembradas en matraces Erlenmeyer de 250ml, con 50ml de agar papa dextrosa, e incubadas a 29°C durante 6 días; las esporas se cosecharon con 10ml de agua destilada, 2ml de Tween 80, perlas de vidrio y agitación constante durante 5min. De esta solución de esporas se tomó 1ml y se hizo una dilución 1:9 en agua destilada. El conteo de esporas se hace en cámara de Neubauer, cuantificándolas mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Esporas/ml} = \text{No de esporas promedio} \times \text{factor de corrección} \times \text{dilución.}$$

Donde el factor es 25×10^4 (Dado por la geometría de la celda).

El número de esporas por mililitro de medio utilizado en la fermentación sumergida fue: 1×10^7 , en la fermentación en sólido se utilizaron 1×10^7 esp/g.MS.

Donde MS se refiere a la materia seca o soporte (Amberlita).

6.3. Condiciones experimentales en los medios de cultivo.

6.3.1. Condiciones de cultivo en la selección de la cepa.

De una solución de esporas que contenía 1×10^7 esp/ml, se hicieron 5 diluciones 1:9, es decir, 1ml de solución de esporas y 9ml de agua destilada previamente esterilizada, de tal forma que se obtuvieran 1×10^2 esp/ml de solución, de esta solución se tomó 1ml y se inoculó en cajas petri que contenían agar papa dextrosa y 1% de tributirina emulsificada en el medio. Posteriormente se incubaron a 29°C durante un periodo de 120h. A 100 colonias de cada caja se les midió el crecimiento del halo de hidrólisis (formado por la acción de las lipasas producidas durante el crecimiento del hongo sobre la tributirina), cada 24h.

6.3.2. Composición del medio de cultivo para fermentación líquida y sólida.

Se partió de un medio de cultivo previamente optimizado, para el crecimiento y producción de lipasas de *Rhizopus delemar* donde la pasta de soya fue substituida por caseinato de sodio, debido a que su baja solubilidad representa problemas en la preparación del medio nutritivo y en la determinación de biomasa, sin embargo, en la optimización del medio de cultivo, el caseinato de sodio también fue seleccionado como una buena fuente de nitrógeno para la producción de lipasas (Martinez *et al.* 1993).

Composición del medio de cultivo base.

Caseinato de sodio	12g/l
Dextrina amarilla	6g/l
Aceite de oliva	10ml/l (inductor)
Tween 80	2.3ml/l (surfactante)

Sales.

Mg SO ₄	0.5g/l
K ₂ HPO ₄	1.0g/l
KNO ₃	2.5g/l

Elementos traza.

ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	439.8mg/l
Fe(NO ₃) ₂	723.5mg/l
MnSO ₄ . 4 H ₂ O	203.0mg/l

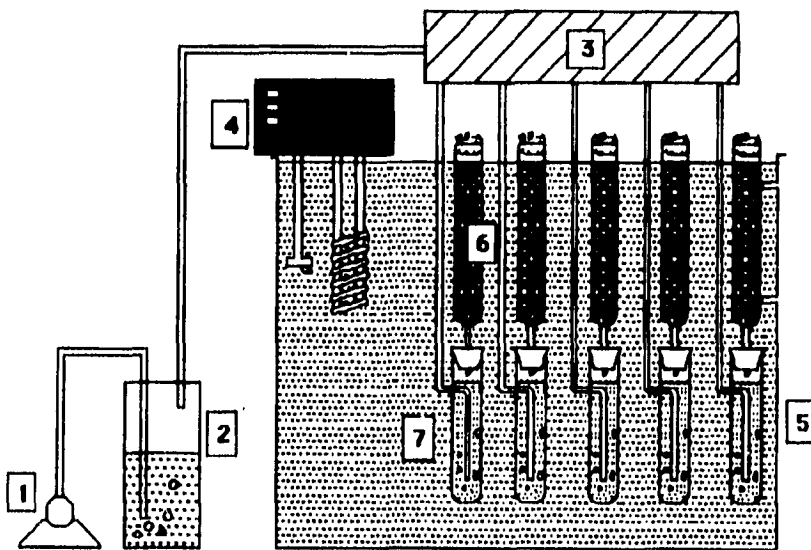
6.3.3. Condiciones de cultivo en la fermentación líquida.

La fermentación en medio líquido se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer de 250ml, conteniendo un volumen de medio de cultivo de 50ml previamente ajustado a pH=6 y 1ml de solución de esporas. Los matraces se colocaron en una incubadora New Brunswick modelo G24, a 29°C temperatura controlada y 150rpm de agitación por 48h. La fuente de carbono y nitrógeno se esterilizaron por separado de los elementos traza y las sales a 15 PSI durante 15min.

6.3.4. Preparación y condiciones de cultivo en fermentación sólida.

Para la fermentación en estado sólido se utilizó el mismo medio de cultivo utilizado en la fermentación líquida, aumentando las concentraciones de los nutrientes en la misma proporción, tomando como base 20 g/l de Dextrina. El medio líquido se inoculó con esporas y se mezcló con Amberlita en una cantidad tal que tuviera del 60 al 62% de humedad. Se empacaron 10 biorreactores tipo columna con 12g de Amberlita húmeda por biorreactor(Raimbault & Alazard, 1988). La fermentación se llevo a cabo a 29°C con un pH inicial de 6.0 y un flujo de aire saturado de 0.5 l/h.gMS. en el siguiente equipo.

Fig. 6.3.4. Equipo para fermentación en estado sólido.



**1. Bomba de aire, 2. Humidificador, 3. Distribuidor de flujo, 4. Termoregulator
5. Baño de Agua, 6. Columnas de fermentación, 7. Humidificadores.**

6.3.4.1. Soporte.

El soporte es una resina de intercambio iónico de nombre Amberlita tipo IRA-900 (Rhom & Haas, 1984), compuesta por 90% de estireno y 10% de polivinil benceno, a la cual se le realiza una amidación y presenta las siguientes características:

Forma esférica.

Diámetro promedio: 0.53mm

Rango de diámetro: 16 a 50 mesh.

Rango de diámetro de los poros: 2.5 a 23 mm.

Densidad real: 1.07 g/ml.

Retención de humedad: 60- 62%

Rango de trabajo de pH= 0-14.

Forma iónica: cloruros.

6.3.4.2. Pretratamiento del soporte.

La Amberlita se lavo varias veces con agua destilada para eliminar polvo y materia ajena. Se puso a secar a 70°C durante 48h y posteriormente se adicionan 4ml de agua por cada gramo de soporte seco, se puso en agitación y se llevo a pH=6 con HCl 0.1 N hasta estabilización. Una vez hecho lo anterior se elimino el sobrenadante por decantación para posteriormente tratarla con buffer de fosfatos ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{KHPO}_4$), pH= 6; se agregaron 2ml de solución buffer por cada gramo de Amberlita húmeda dejando en agitación por 24h y posteriormente se puso a secar a 70°C por 24h (Auria *et al.* 1990).

6.4. Adsorción de lipasa de *Rhizopus delemar* y lipasa de *Mucor miehei* de (Novo Industri Japan Ltd., Japón.) a varias concentraciones de Amberlita entera.

6.4.1. Condiciones de adsorción.

Sistema de matraces en agitación.

La adsorción se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer de 250ml con 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 y 6.0 gramos de Amberlita previamente amortiguada a pH=6 , con un volumen de 50 ml de extracto enzimático de *Rhizopus delemar* o solución enzimática de lipasa comercial de *Mucor miehei*, adicionados de 0.1% de azida de sodio, con la finalidad de evitar contaminación bacteriana. El experimento se llevó a

cabo a 29°C y 150 r.p.m. durante 24h. En los dos experimentos se cuantificó un control, el cual se llevó a cabo en las mismas condiciones experimentales pero sin Amberlita. Se utilizó también Amberlita triturada para llevar a cabo este experimento. La trituración de ésta se hizo con un ultra-turrax y posteriormente se hizo pasar a través de un tamiz con malla 100, con el cual se obtiene un diámetro promedio de partícula de 0.10mm.

6.4.2. Cinética de adsorción en Amberlita entera y triturada (malla 100).

Para la cinética de adsorción se hicieron determinaciones de actividad lipolítica del sobrenadante y de la Amberlita a las 2, 4, 8, 16, 20 y 24h. Los matraces contenían 2g de Amberlita y 50ml de extracto lipolítico de *Rhizopus delemar*, las condiciones experimentales fueron las mismas que se describieron anteriormente.

6.5. Condiciones de Desorción.

6.5.1 Desorción con cloruro de sodio.

Sistema de matraces en agitación.

La desorción se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer de 250ml con 2g de Amberlita triturada y con 50ml de una solución de cloruro de sodio de tal manera que quedaran 2.5, 3.0, 5.0 y 6.0 gramos de cloruro de sodio por gramo de Amberlita triturada, el experimento se llevó a cabo a 29°C, 150 r.p.m. y pH=6, durante 24h, al final del experimento se separó la Amberlita del sobrenadante por decantación ya que el sistema es heterogéneo, posteriormente se le determinó actividad lipolítica al sobrenadante.

6.5.2. Desorción a diferentes pH.

Para la desorción, se utilizaron matraces Erlenmeyer de 250ml, donde dos gramos de Amberlita fueron puestos en contacto con diferentes soluciones de buffers, en un rango de pH de 2 a 6. Las soluciones buffer utilizadas fueron tris-malatos, citratos y fosfatos a concentraciones 0.2M, al mismo tiempo se corrió un blanco con agua destilada; El experimento se llevó a cabo a 29°C, y una agitación de 150 r.p.m. durante 24h, posteriormente el sobrenadante se separó por decantación y se le determinó actividad lipolítica.

6.6. Definición de términos en los experimentos de Adsorción y Desorción.

Las cantidades de lipasa adsorbida, desorbida y expresada, así como sus porcentajes fueron determinados mediante las siguientes fórmulas.

***Unidades adsorbidas (Uads).**

$$Uads = U_i - U_r.$$

$$\% Uads = (U_i - U_r) / U_i \times 100$$

Donde:

Uads= Unidades adsorbidas por gramo de Amberlita.

U_i= Unidades iniciales.

U_r= Unidades residuales en el sobrenadante.

***Unidades expresadas: (Uexp)**

-Actividad de la lipasa adsorbida en Amberlita.

$$\% Uexp = Uexp / Uads \times 100$$

***Unidades desorbidas: (Udes)**

-Medición unidades presentes en el sobrenadante.

$$\% Udes \text{ tot} = (Udes / Uads) \times 100$$

$$\% Udes \text{ rel} = (Udes / Uexp) \times 100$$

Donde:

-Udes=Unidades desorbidas presentes en el sobrenadante.

-Uads= Unidades adsorbidas por la Amberlita.

$\% Udes \text{ tot}$ = Unidades desorbidas con respecto al total de unidades adsorbidas.

$\% Udes \text{ rel}$ = Unidades desorbidas con respecto al total de unidades expresadas.

6.7. Métodos Analíticos.

6.7.1. Determinación de actividad lipolítica.

En la actualidad existen varios métodos para medir la actividad hidrolizante de las lipasas. Por lo regular se hace mediante la cuantificación de los ácidos grasos liberados durante la hidrólisis de triacilglicéridos, los cuales son los sustratos naturales de estas enzimas. Debido a que las compañías que producen o utilizan lipasas, tienen sus propias técnicas de medición, se hace más difícil la comparación entre actividades lipolíticas. Algunas de las técnicas que se utilizan para la cuantificación de lipasas son:

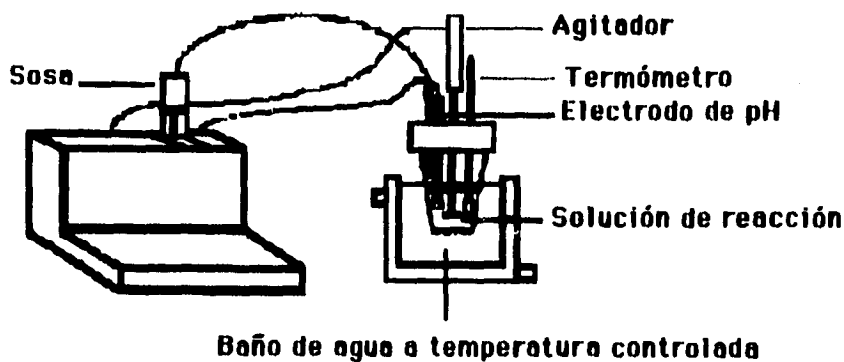
Por titulación de ácidos grasos a pH constante (Nahas, 1988).

Por caída de pH por liberación de ácidos grasos (Menassa & Lambert, 1982).

Por titulación de ácidos grasos sin control de pH (Dole & Mienertz, 1960).

En el presente trabajo se determina la actividad lipolítica por titulación de ácidos grasos con control de pH o pH stat, este hace un seguimiento de la lipólisis a través de la liberación de ácidos grasos, donde la acidez generada es titulada con un álcali de concentración conocida manteniendo el pH del sistema constante. La determinación de actividad lipolítica se hizo en un titulador automático Mettler DL-21 compuesto por un agitador de varilla, un electrodo para medir pH y un dosificador para la solución tituladora; según se muestra a continuación.

Fig. 6.7.1. Titulador potenciométrico.



Titulador Mettler DL21

Corzo (1993)

El medio de reacción contiene 18ml de tributirina al 5% (compuesta de 50ml de tributirina , 10ml de Tween y 940 ml de buffer tris-maleatos 2.5 mM, pH=6 generando la emulsión con un ultra-turrax a 8000 r.p.m. por 2 min) y 12ml de extracto enzimático pretitulado a pH=6. Para la determinación de actividad lipolítica de la lipasa que está adsorbida en la resina, en lugar de 12 ml de extracto, se pone un gramo de Amberlita húmeda.

La determinación de actividad lipolítica se llevó a cabo a 37°C, pH=6 con agitación constante. La temperatura del medio de reacción se controló con baño de agua, con un regulador de temperatura (HAAKE Instruments Inc).

El ácido butírico liberado de la tributirina (triglicérido del ácido butírico) por hidrólisis enzimática (lipasa), fue cuantificado por titulación con NaOH 5mM durante 5 min. Por lo que una unidad de actividad lipolítica (U) se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1mM de ácidos grasos en un minuto. En este método la cantidad de ácidos grasos liberados es proporcional a la cantidad de hidróxido de sodio gastado para neutralizar la acidez generada por la enzima, por lo que se puede expresar el resultado utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad (U/ml)} = (V \times N) \times 1/t \times 1/V_e$$

Donde:

V = volumen de sosa gastado (X ml)

Ve= Volumen de extracto enzimático. (8 ml)

N= Normalidad de la sosa (50 mM)

t = 5 min

La técnica empleada anteriormente, surge de la modificación de la técnica descrita por Martínez *et.al* (1993), mecanizando y triplicando los volúmenes del medio de reacción proporcionalmente para poder adaptarse al titulador automático.

6.7.2. Determinación de biomasa.

6.7.2.1. Determinación de biomasa en fermentación en medio líquido.

Por peso seco.

La biomasa con el sobrenadante se centrifugaron a 5000 r.p.m. durante 5min a 10°C, posteriormente se filtraron en un equipo Millipore, utilizando papel filtro Whatman del número 2 previamente puesto a peso constante, la biomasa retenida en el papel filtro se lavo dos veces con 10ml de agua destilada y se puso a secar durante 24h a 70°C.

6.7.2.2. Determinación de biomasa en la fermentación en estado sólido.

6.7.2.2.1. Separación biomasa - soporte.

Se tomo un gramo de soporte húmedo después de la fermentación y se suspendió en 7 ml de agua destilada, agitándose durante varios minutos con un agitador magnético hasta que la biomasa se separo completamente del soporte. Se agregaron 28ml de glicerol para tener una solución del 80% en volumen de glicerol, se agito nuevamente y se centrifugo a 4500 r.p.m. durante 20 minutos , después de la centrifugación se obtuvieron dos fases, la Amberlita arriba y la biomasa suspendida en glicerol-agua. Se separa la biomasa suspendida en glicerol-agua y se deja precipitar para eliminar por decantación la mayor parte del glicerol, la biomasa se filtro para su cuantificación por peso seco (Corzo, 1993).

6.7.3. Determinación de pH.

6.7.3.1. Determinación de pH en la fermentación en sistema líquido

Se tomo el sobrenadante de la centrifugación, libre de células y directamente se le determino el pH con el electrodo del titulador Mettler DL 21.

6.7.3.2. Determinación de pH en la fermentación en estado sólido

Se tomo 1g de soporte con biomasa y se le adicionaron 25ml de agua, posteriormente se homogenizó en el ultra-turrax a 8000 r.p.m. por 15 segundos, a la solución resultante se le determinó pH con el electrodo del titulador Mettler DL 21.

6.7.4. Determinación de humedad relativa.

La humedad relativa del soporte se midió por gravimetría. Se tomaron 5g de soporte húmedo de las columnas donde se cultivó *Rhizopus delemar* y se secaron a 70°C por 24 h.

6.7.5. Determinación de Actividad de agua (Aw).

Se determinó con un Decagón CX-1, compuesto por un contenedor de plástico para colocar la muestra, un ventilador que permite la circulación de aire sobre la superficie de la muestra acelerando el equilibrio del vapor; un sensor infrarrojo mide la temperatura de la superficie de la muestra, eliminando la necesidad de esperar el equilibrio térmico, un espejo interno enfría hasta llegar a la condensación del vapor de agua mediante la temperatura de la superficie y el punto de rocío; el tiempo de respuesta del aparato es no mayor de 5 min.

6.7.6. Respirimetría.

6.7.6.1. Determinación de CO₂ y O₂.

Para seguir la evolución del crecimiento del hongo se midió la producción de CO₂ y consumo de O₂; Este método es una forma indirecta de seguir el crecimiento del hongo. La medición se llevó a cabo en un cromatógrafo Gow Mac (USA). Este equipo cuenta con un detector de conductividad térmica y una columna doble, tipo CTR-1 (Alltech, USA), el muestreo se realizó con jeringas de 250 microlitros.

Las áreas obtenidas en el integrador del cromatógrafo son relacionadas mediante las siguientes fórmulas para encontrar el porcentaje de oxígeno y bióxido de carbono en las muestras.

$$\%CO_2 = A_{CO_2} / A_{NO_2} \times (A_{N_2} + A_{O_2}) / A_{aire} \times 70.4735$$

$$\% O_2 = A_{O_2} / A_{N_2} \times 79.1 / 0.9953$$

6.7.6.1.1. Determinación de CDPR y OUR.

A partir de los datos obtenidos se calculó el CDPR (taza de producción de bióxido de carbono) y el OUR (taza de consumo de oxígeno) los cuales se definen como:

$$OUR = (\% O_2 \text{ consumido} \times F) / (P \times 100)$$

$$CDPR = (\% CO_2 \text{ producido} \times F) / (P \times 100)$$

Donde:

P= carga de materia seca.

F= Gasto de aire (ml/h)

6.7.6.1.2. Determinación del coeficiente respiratorio (C.R.)

El coeficiente respiratorio refleja el tipo de metabolismo de las células durante el crecimiento y se calculó con la siguiente fórmula.

$$C.R = CDPR/OUR$$

6.7.6.2. Condiciones de trabajo en el cromatógrafo de gases.

Temperatura de detector e inyector 80°C

Gas acarreador : Helio.

Flujo de gas acarreador: 60 ml /min.

Intensidad del detector : 100 mA.

6.7.6.2. Condiciones de trabajo en el cromatógrafo de gases.

Temperatura de detector e inyector 80°C

Gas acarreador : Helio.

Flujo de gas acarreador: 60 ml /min.

Intensidad del detector : 100 mA.

7. Resultados y Discusión.

7.1. Selección de la cepa de trabajo.

La selección se hizo en cajas Petri con tributirina emulsificada en el medio de cultivo. De acuerdo con la técnica establecida por Corzo, (1993) la aparición y tamaño del halo formado por la hidrólisis de tributirina a causa de la actividad lipolítica de la lipasa producida por el microorganismo, fue el criterio de selección. Se tomaron lecturas cada 24h del diámetro de los halos de hidrólisis de 100 colonias por cada caja petri. Las dos cepas de *Rhizopus delemar* empezaron a formar el halo de hidrólisis a las 24h de incubación, tomándose las mediciones finales a las 72 h, tiempo en el cual ya no existía crecimiento aparente del halo de hidrólisis; los diámetros de los halos de hidrólisis obtenidos fueron: 0.1, 0.2, 0.3 y 0.4 cm, obteniéndose la media aritmética de los diámetros del total de los halos, la cual se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 7.1. Tamaño promedio de los halos de hidrólisis.

Cepa.	Tamaño promedio del halo (cm).
<i>Rhizopus delemar</i> CDBB H313	0.275
<i>Rhizopus delemar</i> NRRL 1472	0.228

En la tabla anterior se puede observar que la media del diámetro de los halos producidos por la cepa de *R. delemar* CDBB H313 es un 17% mayor que la media del diámetro de los halos producidos por la cepa de *R. delemar* NRRL 1472. Aunque la diferencia entre las dos cepas no es muy importante, podemos decir que la cepa CDBB H313 produce mayor cantidad de lipasas. Con base en el resultado anterior se consideró a la cepa CDBB H313. Esta cepa fue utilizada previamente por Martínez *et al.* (1993) para la optimización del medio de cultivo que se utilizará a continuación.

7.2. Comparación de la lipasa producida por *Rhizopus delemar* con lipasas comerciales.

El objetivo de este punto del trabajo es ubicar la productividad de lipasas de *Rhizopus delemar* obtenida por fermentación líquida, encontrando la concentración de algunas lipasas comerciales que corresponda con actividad lipolítica alcanzada por este hongo conforme a la tabla 7.2.

Tabla 7.2. Actividad lipolítica de lipasa de *Rhizopus delemar* y preparaciones comerciales.

Cepa.	Origen o Identificación	Concentración (mg/ml)	Actividad lipolítica (U/ml)
<i>R.delemar</i> .*	CDBB H313	1 ml de extracto	14.08
<i>C. cylindracea</i> .	SIGMA	2.85	" "
<i>Rhizopus sp.</i>	SIGMA.	0.26	" "
<i>Rhizopus</i> .	AMANO.	6.28	" "

* Extracto enzimático de enzima producida por fermentación líquida.

En la tabla anterior se puede ver que *Rhizopus delemar* produce cantidades considerables de lipasa, tomando en cuenta las cantidades que se necesitan de las otras lipasas comerciales para igualar su actividad lipolítica. Sin embargo, para obtener una relación más precisa se pueden hacer análisis de cantidad de proteína presente en el preparado comercial, con la finalidad de obtener la actividad específica de la enzima y saber la cantidad real de lipasa presente.

7.3. Fermentación Líquida.

7.3.1. Cinética de crecimiento y producción de lipasas por *Rhizopus delemar* en fermentación sumergida.

Reproducir la cinética de crecimiento y producción de lipasas en fermentación sumergida obtenida por Martinez *et al.* (1993) resulta importante para hacer una comparación con los resultados que se obtendrán en fermentación sólida, además de verificar si se obtienen los mismos resultados que se reportan en la bibliografía. Lo anterior es debido a que aunque se utilice la misma metodología, los resultados pueden variar de un experimentador a otro, a causa de varios factores que intervienen en el desarrollo de la fermentación, que van desde el origen de los reactivos hasta variaciones en la misma cepa. Además es importante encontrar el tiempo de máxima producción de lipasas dentro de la cinética de crecimiento, debido a que en los experimentos posteriores de adsorción y desorción de lipasa en Amberlita, se ocuparán volúmenes grandes de extracto lipolítico.

La **fig. 7.1** muestra la cinética de crecimiento y producción de lipasas. En la cinética de crecimiento, no se observa la fase de adaptación posiblemente debido a

la falta de puntos en la toma de muestra entre las 0 y 10h o a que en el momento del inóculo la cepa se encontraba adaptada, debido a las anteriores resiembras. Tomando en cuenta lo anterior las primeras 24h de la fermentación corresponden a la fase exponencial de crecimiento, a las 24h se encuentra la fase de transición de entre la fase exponencial y la fase estacionaria, que coincide con el comienzo de producción de lipasa. A las 48h se observa la mayor producción de biomasa (10.5 mg/ml) correspondiente a la mayor producción de lipasa (14.08 U/ml); desde las 48h hasta las 72h etapa correspondiente a la fase estacionaria, la producción de lipasa decae lentamente. Al término de esta etapa disminuye la cantidad de lipasa considerablemente, hasta llegar casi a cero a las 120h; la biomasa empieza a decaer pero en forma menos drástica que la actividad lipolítica.

7.3.2. Efecto de la centrifugación en la actividad lipolítica.

Aunque es una práctica común el hacer uso de la centrifugación para separar la biomasa del extracto, en este caso se observó que tiene un efecto en la actividad lipolítica. En la **fig. 7.1** además de observar la cinética de crecimiento y producción de lipasas, también se puede observar el efecto de la centrifugación en la actividad lipolítica cuando el fermentado fue sometido a una centrifugación de 5000 rpm durante 5 minutos, lo que ocasionó la pérdida de 7 U/ml, correspondientes al 50% del total de la lipasa producida a las 48 h de fermentación, punto donde se observa mayor producción de lipasa. Por lo tanto se optó por no centrifugar y separar la biomasa del extracto por decantación lavándola posteriormente con 10 ml de agua destilada, tomando en cuenta la dilución para la determinación de actividad lipolítica.

7.3.3. Efecto del pH en la estabilidad de la lipasa.

Este experimento se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer de 250ml, los cuales contenían 50ml de extracto enzimático. Los extractos fueron puestos a diferentes pH de trabajo, 3.0, 5.0, 6.5, 8.0 y 10. con amortiguadores de tris maleatos, citratos y fosfatos, a concentraciones de 0.2M. Los resultados se muestran en la **figura 7.2**, donde es posible observar, que la lipasa de *Rhizopus delemar* es más estable a pH de 5 aunque el pH de mayor actividad lipolítica es 6.5. Este comportamiento concuerda con lo reportado en la bibliografía (López-Munguía, 1987) donde dice que el pH de máxima actividad de una enzima, no necesariamente es igual al pH de máxima estabilidad de la misma.

**Fig.7.1 Cinética de producción de lipasa por *R. delemar*
Efecto de la centrifugación en la actividad lipolítica.**

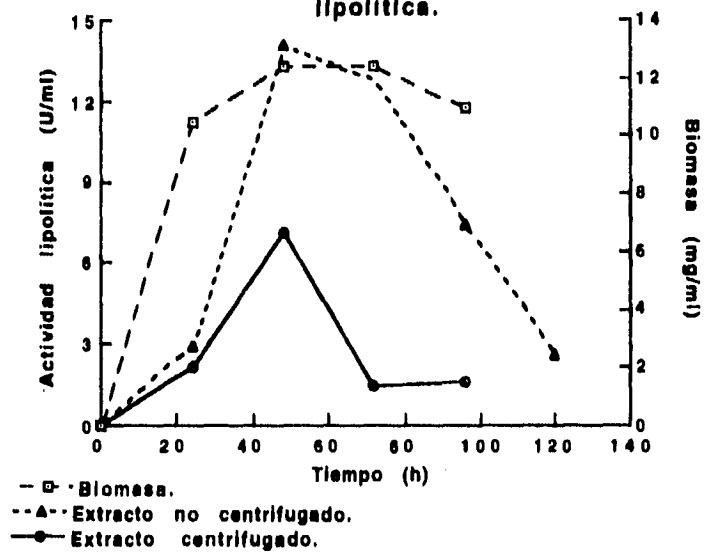
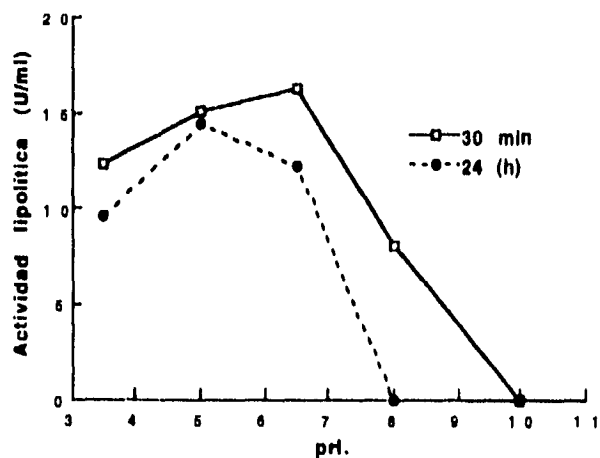


Fig. 7.2 Estabilidad del Extracto a diferentes pH



7.4. Fermentación Sólida.

7.4.1. Pruebas de crecimiento en caja petri.

Para considerar las fuentes de carbono a utilizar en la fermentación sólida, se hicieron pruebas de crecimiento en agar y medio nutritivo con su correspondiente fuente de carbono (glucosa maltosa dextrina y almidón) el tamaño de la colonia formada revela el crecimiento, siendo este el criterio de selección.

Tabla 7.4.1. Crecimiento de *Rhizopus delemar* en caja petri con diferentes fuentes de carbono.

Fte Carbono	24h	48h	72h	96h	120h
Glucosa	x	xx	xx	xx	xx
Maltosa	x	x	xxx	xxx	xxx
Dextrina	x	x	xxx	xxx	xxx
Almidón	-	-	-	x	x

(-) sin crecimiento, (X) poco, (XX) mediano, (XXX) máximo.

En la tabla anterior se puede observar que la fuente de carbono con la cual se obtiene mayor crecimiento es dextrina y maltosa. El crecimiento con glucosa es menor, en comparación con la dextrina, pero mucho mayor en comparación con el almidón; cuando se utiliza almidón el hongo tarda 96h en formar colonias, por lo anterior se consideraron únicamente dextrina, maltosa y glucosa para los experimentos en fermentación sólida.

7.4.2. Crecimiento y producción de lipasas de *Rhizopus delemar* por fermentación sólida.

En la primera fermentación que se realizó, se utilizaron las mismas concentraciones de nutrientes utilizadas en la fermentación líquida, tomando como referencia dextrina a 6 g/l. Sin embargo, no fué suficiente para que se llevara acabo el total de la fermentación. Por lo tanto hubo la necesidad de incrementar en la misma proporción la cantidad de nutrientes, tomando como referencia dextrina a 20g/l.

7.4.2.1. Fermentación con Glucosa.

En la **figura 7.3** se observan las curvas de tasa de consumo de oxígeno (OUR), tasa de producción de bióxido de carbono (CDPR) y producción de lipasa, utilizando glucosa como fuente de carbono. Se puede decir que la fase de adaptación del microorganismo se encuentra en las primeras 10h de la fermentación. A partir de este punto, empieza la fase de crecimiento o exponencial en la cual los valores de CDPR y OUR son de 3.5 ml./h.g MS. y de 3.7 ml/h.g MS, respectivamente, entrando a la fase de mantenimiento a las 16h, después de este punto la actividad respiratoria del hongo disminuye drásticamente, terminando la fermentación a las 48h; la máxima producción de lipasas se encuentra alrededor de las 24h, es decir en el mismo rango en el cual el microorganismo ha alcanzado su máxima actividad respiratoria. Después de que se ha alcanzado la máxima producción de lipasas, disminuye la actividad lipolítica probablemente porque el hongo empieza a degradar proteína para biosíntesis de otros compuestos o simplemente hay proteólisis de lipasas por algunas proteasas presentes. Por otro lado se observa que el coeficiente respiratorio varía ligeramente a lo largo de la fermentación, encontrando valores de 1.0, en la fase de mantenimiento, lo cual nos indica que hay oxidación completa de dextrosa. Se encontraron valores alrededor de 1.0 y valores de 1.3 donde la respiración del microorganismo es baja, esto puede ser causado por la producción de CO₂ con bajos consumos de O₂. En la **figura 7.4** se observa la evolución del pH, humedad y actividad lipolítica en la fermentación sólida utilizando glucosa, donde nos muestra que la humedad del fermentador permanece prácticamente constante. Eso nos indica que la fermentación no se terminó por disminución de la humedad, que es un factor importante que puede inhibir el crecimiento del microorganismo. Se observa una caída del pH cuando el hongo alcanza su máxima actividad metabólica, posiblemente porque la actividad lipolítica libera ácidos grasos; posteriormente el pH se empieza a incrementar cuando el hongo entra en fase de autólisis, probable causa de este incremento de pH.

7.4.2.2. Fermentación con Maltosa.

En la **figura 7.5** se observa la respirometría de *Rhizopus delemar* utilizando maltosa como fuente de carbono. Es posible observar un comportamiento igual al observado con glucosa con respecto a respirometría, pero con valores más altos en cuanto a producción de lipasa (69 U/g.MS). El coeficiente respiratorio, se encuentra entre valores 1 y 1.3, valores también muy similares a los que se muestran con glucosa. En la **figura 7.6** se observa un comportamiento similar del pH, humedad y actividad lipolítica al observado en la fermentación con glucosa

Fig.7.3 Evolución de la respirometría y producción de lipasas de R. delemar crecido en Amberlita (Glucosa 20g/l)

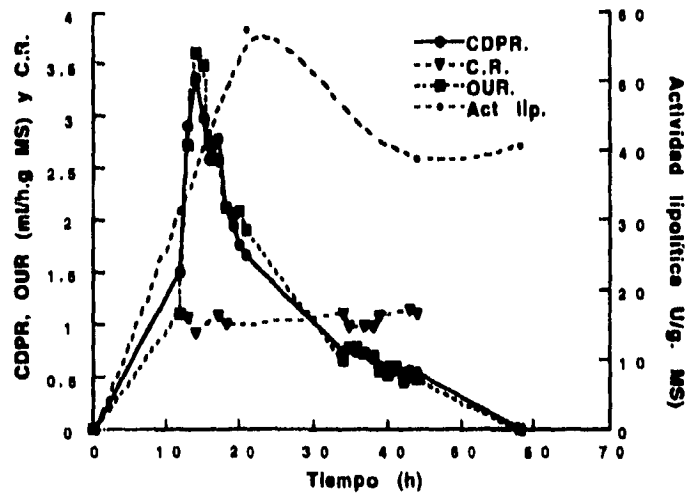


Fig.7.4 Evolución del pH, humedad y Actividad lipolítica, de la fermentación sólida de R. delemar.(Glucosa 20g/l)

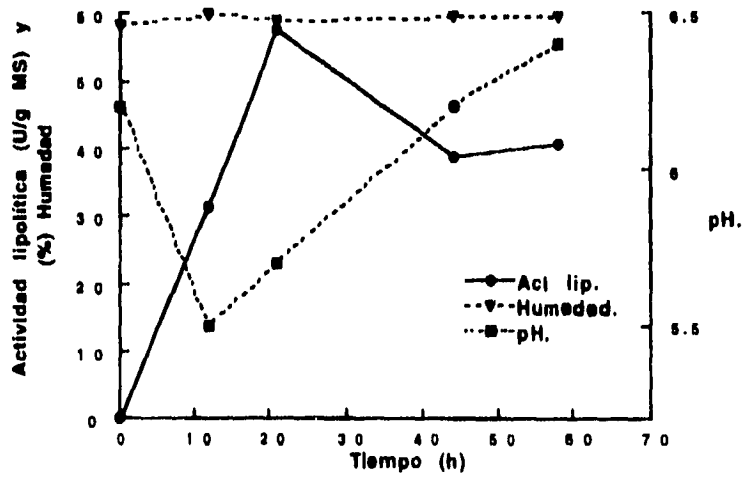


Fig.7.5 Evolución de la respirometría y producción de lipasa de *R. delemar* crecido en Amberlita (Maltosa 20g/l)

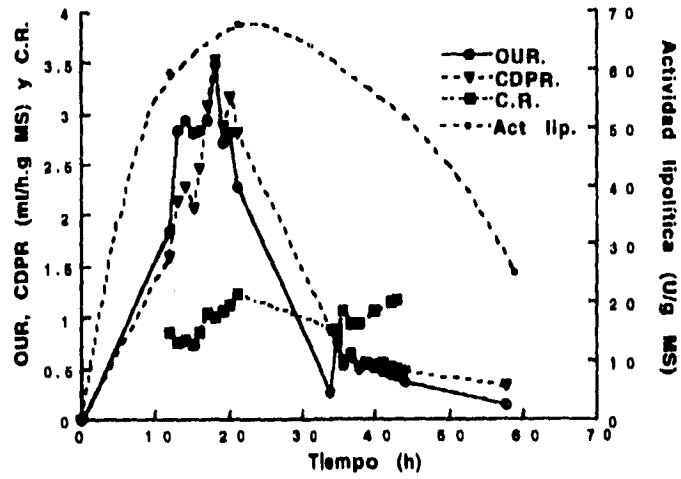
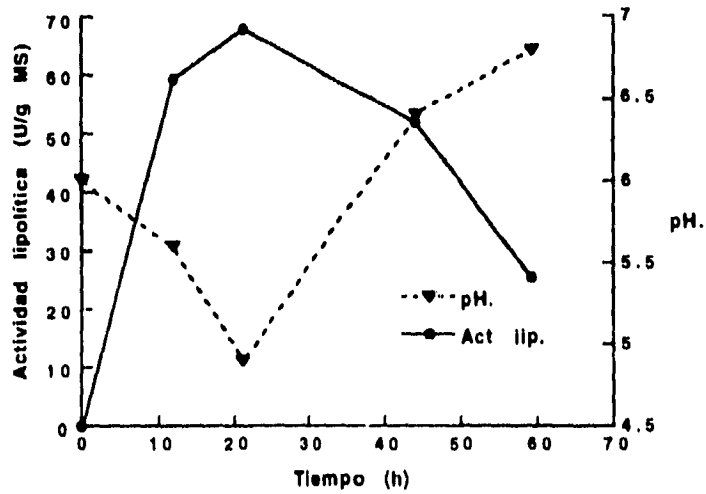


Fig.7.6 Evolución del pH y actividad lipolítica de la fermentación sólida de *R. delemar* (Maltosa 20g/l)



7.4.2.3. Fermentación con Dextrina.

En la **figura 7.7** se puede observar que la fase exponencial empieza a las 10h, terminando alrededor de las 14h donde el CDPR alcanza su máximo (4.5 ml/h.g MS), se puede observar que el máximo de actividad lipolítica se encuentra un poco después del máximo de CDPR, donde la producción de lipasa es de 95.62U/g.MS, el final de la fermentación se observa a las 62h donde la cantidad de lipasas es del 20% del total de lipasas producidas al rededor de las 22h. En lo respectivo al coeficiente respiratorio, se encuentran valores entre 1.0 y 1.5, similares a los mostrados con glucosa, así como el comportamiento de humedad y pH.

Como una hipótesis muy global es probable que *Rhizopus delemar* utilice primero las fuentes de carbono para poder crecer y posteriormente empiece rápidamente a producir lipasa para consumir el inductor (aceite de olivo).

7.4.3. Comparación de la producción de lipasas con las diferentes fuentes de carbono.

La **figura 7.8** nos muestra las curvas de producción de lipasas de *Rhizopus delemar* en fermentación sólida, donde observamos que la máxima producción de lipasas para las tres fuentes de carbono se encuentra entre las 12 y 20h de fermentación. Sin embargo la fuente de carbono con la cual se obtuvo mayor producción de lipasas fue dextrina. Aunque la producción de lipasas utilizando glucosa fue baja, no es considerablemente menor que las producidas utilizando maltosa. La caída de la actividad lipolítica al termino de la fermentación con glucosa es más drástica que cuando se utiliza dextrina o maltosa, probablemente es debido al efecto de autólisis del microorganismo o hay una mayor producción de proteasas que degradan a las lipasas del medio.

Cabe resaltar que la máxima producción de lipasas en fermentación sumergida se encuentra a las 48h de la fermentación y en fermentación en estado sólido la máxima producción de lipasas se da alrededor de las 20h de la fermentación, es decir casi 28h antes, lo que representa una ventaja si la producción se hace a nivel industrial.

Fig.7.7 Evolución de la respirometría y producción de lipasa de *R. delemar* crecido en Amberlita (Dextrina 20g/l)

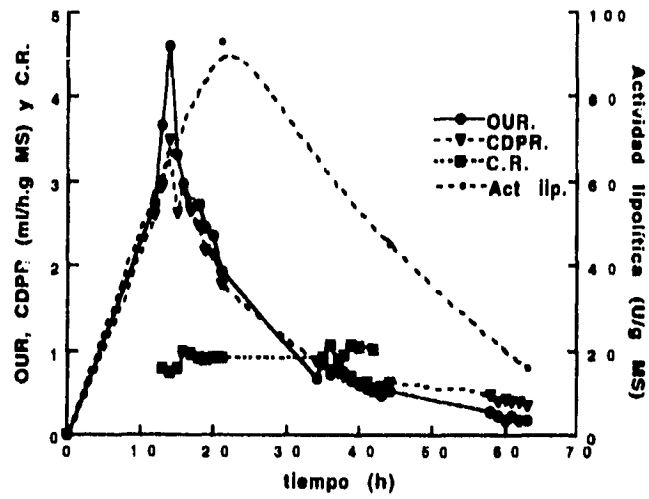


Fig.7.8 Cinética de producción de lipasa por *R. delemar* crecido en Amberlita (sustrato 20g/l)

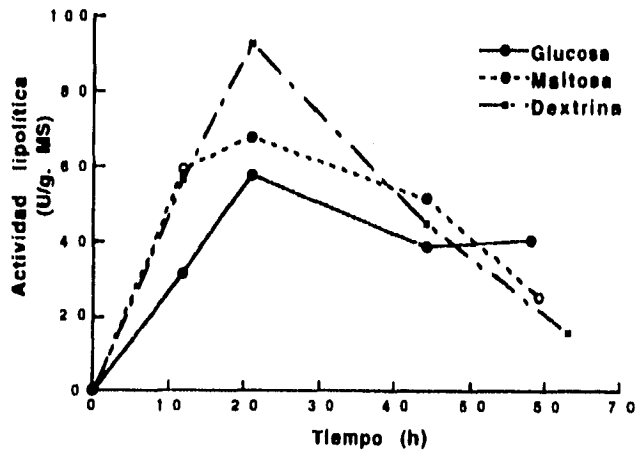


Tabla 7.4.3. Comparación de la productividad de lipasas en fermentación sólida y líquida.

Fermentación	Líquida	Sólida		
	Dextrina	Dex	Mal	Glu
T. Prod. max. (h)	48	15	18	18
CDPRmax. (ml/h.g MS)	-----	3.48	3.5	2.8
C.R. (Rango)	-----	1-1.4	1-1.3	1-1.3
pH Prod. max.	6.24	5.6	4.9	5.7
Humedad (%)	-----	0.9	4.2	1.7
Aw	-----	.994	.999	.998
Act. Lip. vol. (U/ml)*	14.08	15.7	11.3	10.2
Act. Lip. mas. (U/gMS)	-----	95.6	68.2	57.7

* Actividad lipolítica por unidad de volumen de medio de cultivo.

En la **tabla 7.4.3.** se trata de hacer una comparación de la producción de lipasas en fermentación sólida y líquida. En la fermentación líquida, se obtiene una actividad lipolítica de 14.07 U/ml utilizando dextrina como fuente de carbono, en lo respectivo a la producción de lipasas en fermentación sólida, utilizando dextrina, maltosa y glucosa se obtienen 15.7, 11.3 y 10.2 U/ml respectivamente, la diferencia entre las actividades volumétricas en fermentación sólida y líquida, utilizando dextrina como fuente de carbono, no es muy grande. Sin embargo, si tomamos en cuenta la actividad lipolítica másica obtenida en fermentación sólida (95.6% U/g.MS.), es considerablemente mayor que la actividad lipolítica obtenida en fermentación líquida.

Tabla 7.4.3.1. Comparación de los resultados experimentales con los de la literatura.

Fermentación Líquida.

Cepas.	Tiempo de max. actividad (h)	Actividad Lipolítica (U/ml)	Referencia bibliográfica
<i>P. candidum</i>	120	5	Rivera <i>et al.</i> (1991.)
<i>Y. lipolytica</i>	-----	3.45	Corzo (1993)
<i>R. delemar</i>	48	14.4	Martinez <i>et al.</i> (1993)
<i>R. delemar</i>	48	14.08	Este trabajo

Fermentación Sólida

<i>P. candidum</i>	120	10	Rivera <i>et al.</i> (1991)
<i>M. miehei</i>	144	25.1	Rivera <i>et al.</i> (1991)
<i>Y. lipolytica</i>	48	3.29	Corzo (1993)
<i>R. delemar</i>	20	15.66	Este trabajo.

Debido a que existen diferentes formas de determinar o caracterizar la actividad lipolítica, en la **tabla 7.4.3.1** se hace una recopilación de algunos trabajos donde se utilizaron técnicas de determinación de actividad lipolítica derivadas de las planteada por Nahas (1988) y donde se hacen comparaciones de la producción de lipasas entre fermentación sólida y líquida, con lo anterior se puede comparar el presente trabajo con lo reportado en la bibliografía. Es posible observar que con *P. candidum* se obtiene el doble de actividad lipolítica cuando se produce lipasa por fermentación sólida de la que se obtiene en fermentación líquida; en el caso de *Y. lipolytica*, es menor la actividad lipolítica obtenida en medio sólido que en medio líquido. En este trabajo la actividad lipolítica es igual en los dos tipos de fermentaciones, sin embargo en fermentación en medio sólido el tiempo de máxima producción de lipasas es alrededor de 28h menor que en fermentación en medio líquido.

7.5. Relación Soporte- Enzima.

El crecimiento de *R. delemar* sobre una resina de intercambio iónico, podría ocasionar que algunos de los metabolitos que se están produciendo por el hongo se adsorban en la resina, entre estos, se encuentran las lipasas. Por lo anterior es posible que los valores que se obtuvieron de actividad lipolítica en la fermentación sólida, no correspondan al total de la lipasa producida. Por lo tanto es importante conocer los porcentajes de lipasa que se pueden adsorber en Amberlita y cuanto se expresa de ese porcentaje adsorbido, para poder inferir en los resultados de la fermentación sólida. Por otra parte también es importante encontrar un método que nos permita recuperar la lipasa que está adsorbida en el soporte.

7.5.1. Experimentos de adsorción.

7.5.1.1. Adsorción de lipasa comercial de *Mucor miehei* y *Rhizopus delemar* en Amberlita IRA-900.

La finalidad de adsorber una lipasa comercial de *M. miehei* es observar si existe alguna diferencia en la adsorción con la lipasa de *R. delemar*.

La **fig. 7.9** muestra que un gramo de Amberlita seca es capaz de adsorber 257.15 U/g MS. lo que corresponde al 94% del total de la enzima puesta en contacto con la Amberlita. Sin embargo en la **figura 7.10** se observa que de este 94% adsorbido, únicamente se expresa el 5%. En la **figura 7.11** se muestra que la lipasa de *Rhizopus delemar* puede adsorber 159.5 U/g M.S lo que corresponde al 10% de la enzima total puesta en contacto con la resina. También nos muestra que a medida que se incrementa la cantidad de resina en el medio, se adsorbe menor cantidad de lipasa por gramo de resina, posiblemente debido a que aumenta la superficie de contacto y se mantiene la concentración de lipasa constante. Por lo tanto ésta podría distribuirse en menor proporción por gramo de resina; podría suponerse que si hay mayor cantidad de lipasa adsorbida en la Amberlita, se debe obtener mayor actividad lipolítica por gramo de ésta. Sin embargo la actividad lipolítica por gramo de Amberlita se expresa en mayor proporción cuando los porcentajes de adsorción son bajos; lo anterior posiblemente se debió a alguno de los fenómenos que se presentan cuando se inmoviliza una enzima por el método de adsorción, donde a mayor cantidad de lipasa adsorbida en bajas cantidades de Amberlita puede haber adsorción de lipasa en multicapas, lo que limita el acceso de sustrato a las capas alternas, impedimento estérico y gradientes de concentración intraparticular; como consecuencia de esto, la actividad expresada no corresponde al total de la actividad

adsorbida. Este comportamiento se refleja también en la **figura 7.12** donde se grafica el porcentaje de lipasa adsorbida y lipasa expresada, observándose que del 10% de lipasa adsorbida, solo se expresa el 5%. Cabe mencionar que la lipasa que no se expresa podría estar desnaturalizada, debido a que la resina esta cargada negativamente. Por otra parte, del total de la lipasa que se adsorbe solamente se recupera un cierto porcentaje, al que se le llamó **lipasa expresada**.

Fig.7.9 Adsorción de lipasa comercial de M. miehei en Amberlita.

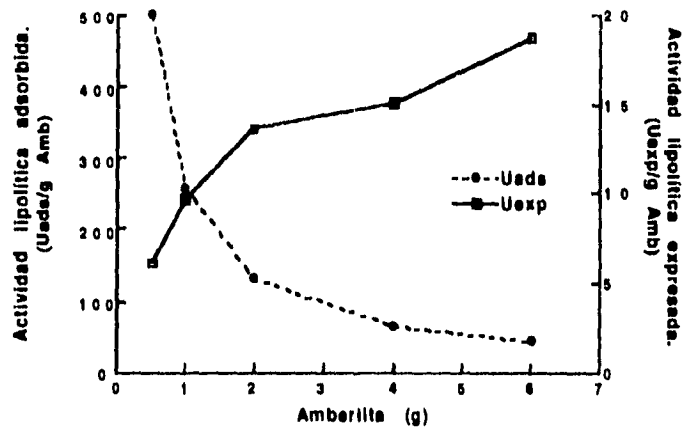


Fig. 7.10 Actividad lipolítica adsorbida y expresada de lipasa comercial de M.miehei en Amberlita.

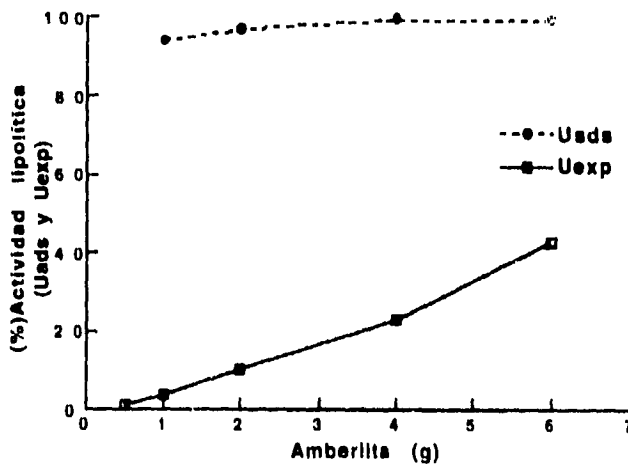


Fig.7.11 Adsorción de lipasa de *R. delemar* en Amberlita.

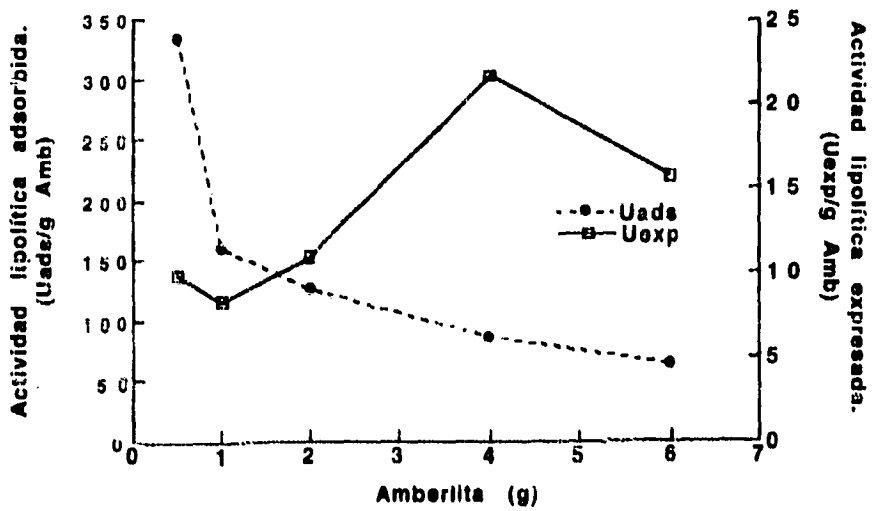
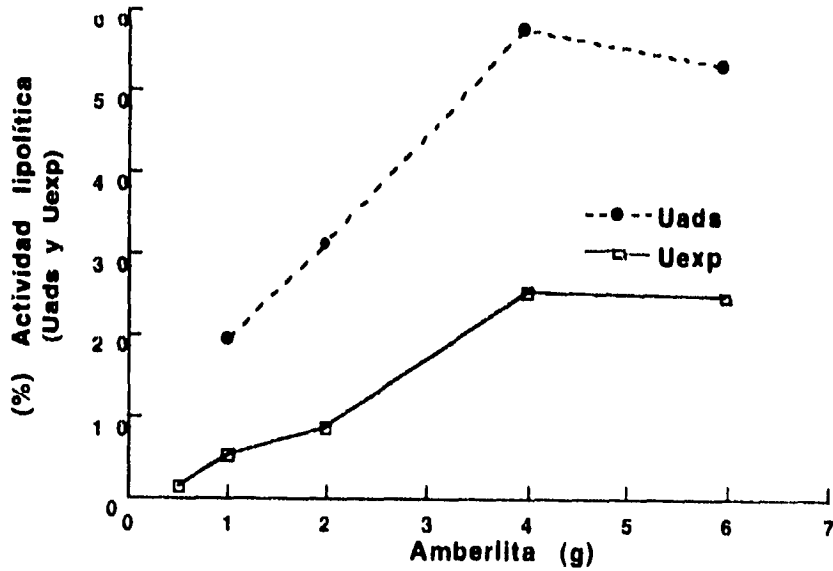


Fig. 7.12 Actividad lipolítica adsorbida y expresada de lipasa de *R. delemar* en Amberlita



7.5.1.2. Adsorción de lipasa de *Rhizopus delemar* en Amberlita triturada

Tal como lo menciona Monsan (1987), los posibles fenómenos de impedimento estérico, así como los gradientes de concentración intraparticular, pueden disminuir la actividad enzimática observada, a pesar de adsorber una cantidad considerable de enzima, por lo tanto el área específica del soporte juega un papel importante en la adsorción. Por lo anterior se optó por aumentar el área de contacto disminuyendo el tamaño de partícula del soporte a un diámetro de 0.10mm triturando la Amberlita.

En la **fig. 7.13** se muestra que se adsorben 807.9 U/g M.S, lo que corresponde al 98.7% del total de la lipasa puesta en contacto con la Amberlita en el medio de reacción. También se observa que desde que hay 0.5g de Amberlita en el medio de reacción, se adsorbe casi el total de la lipasa, esto nos muestra que al aumentar la superficie de contacto triturando la resina, trae como consecuencia el incremento de adsorción de lipasa. Por otra parte, nos muestra que donde hay mayor cantidad de lipasa adsorbida por gramo de Amberlita, la lipasa se expresa en mayor proporción, que cuando hay menor cantidad de lipasa adsorbida por gramo de Amberlita. Esta tendencia es opuesta a la observada en los experimentos de adsorción de lipasa en Amberlita entera. Lo anterior posiblemente se debe a que al disminuir el tamaño de partícula y como consecuencia aumentar la superficie volumétrica de contacto se ocasiona una distribución mas homogénea en Amberlita y los fenómenos de adsorción se ven disminuidos, en caso de que cualquiera de estos exista. Por otra parte, en la **figura 7.14** se muestra que únicamente el 20% del 98.7% de lipasa adsorbida se expresa. Por lo anterior podemos decir, que aunque la tendencia marcada en la **figura 7.13** indique que los fenómenos de adsorción disminuyen cuando se aumenta la superficie de contacto, su disminución es mínima, esto nos podría indicar que se debe trabajar en cantidades muy bajas de lipasa y cantidades altas de Amberlita para evitar los posibles fenómenos de adsorción y se pierdan o no se expresen altas cantidades de lipasa.

7.5.1.3. Porcentajes de lipasa adsorbida no expresada.

En la **figura 7.15** podemos observar que el porcentaje de unidades no expresadas cuando se adsorbe lipasa de *Rhizopus delemar* en Amberlita triturada, es mayor que cuando se adsorbe esta misma lipasa en Amberlita normal. Por otro lado, utilizando Amberlita normal, el porcentaje de lipasa no expresada de *Mucor miehei*, es similar al porcentaje de lipasa no expresada de *Rhizopus delemar*, cuando es adsorbida en Amberlita triturada (0.10mm de diámetro), lo anterior

Fig 7.13 Adsorción de lipasa de *R. delemar* en Amberlita triturada.

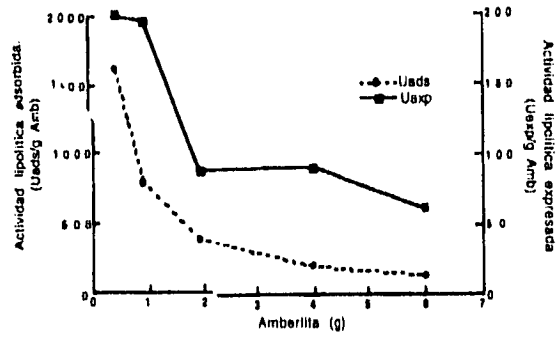


Fig 7.14 Actividad lipolítica adsorbida y expresada de lipasa de *R. delemar* en Amberlita triturada.

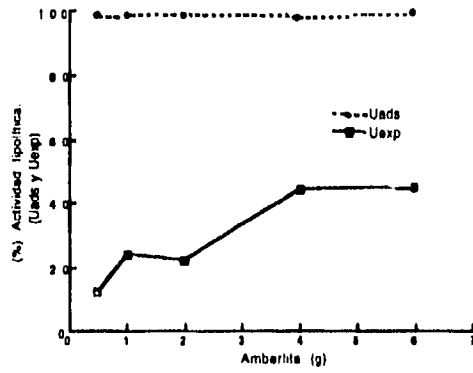
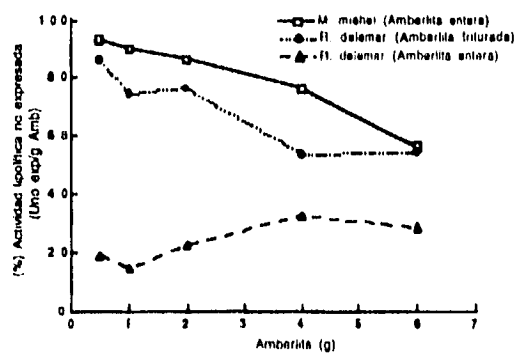


Fig 7.15 Porcentaje de actividad lipolítica no expresada en Amberlita entera y triturada



posiblemente se debe a que los porcentajes de adsorción son similares. Sin embargo, en las figuras 7.9 y 7.11 se muestra que utilizando Amberlita normal, la adsorción de lipasa de *Mucor miehei* es mayor que la adsorción de lipasa de *Rhizopus delemar*, posiblemente por la existencia de iones o metabolitos presentes en el extracto enzimático, que no se encuentran en la solución enzimática de lipasa comercial de *Mucor miehei* y que pueden competir con la lipasa en la adsorción. Lo anterior nos podría indicar que la resina tiene mayor prioridad por otros iones o metabolitos presentes en el extracto que para la lipasa.

7.5.1.4. Estabilidad de la lipasa de *Rhizopus delemar* con Amberlita.

En la **fig. 7.16** se muestra que la actividad lipolítica del extracto de *Rhizopus delemar* en ausencia de Amberlita pierde 7.5 U/ml después de 120h de incubación a 29°C. Esta disminución de actividad puede deberse a la inestabilidad de la lipasa o a la proteólisis por alguna proteasa presente en el medio. Sin embargo, una vez que se ha llevado a cabo la adsorción, la actividad lipolítica de la lipasa presente en el extracto se mantiene constante. Lo anterior nos indica que posiblemente la Amberlita, adsorbe compuestos desestabilizantes para la lipasa.

7.5.1.5. Cinética de adsorción de lipasa en Amberlita.

El objetivo de este experimento es encontrar el tiempo que tarda en adsorberse la lipasa en Amberlita normal y triturada, con la finalidad de optimizar los tiempos de adsorción para los experimentos de desorción. En la **figura 7.17** se muestra que el 99% del total de la lipasa puesta en contacto con Amberlita triturada se adsorbe en las primeras 2 horas. Sin embargo, cuando la lipasa es adsorbida en Amberlita normal se alcanza el máximo de adsorción de 13% entre las 4 y 8h de estar en contacto y después de este tiempo la cantidad adsorbida se mantiene constante.

Fig 7.16 Evolución de la Actividad lipolítica vs tiempo
Influencia de la presencia de Amberlita.

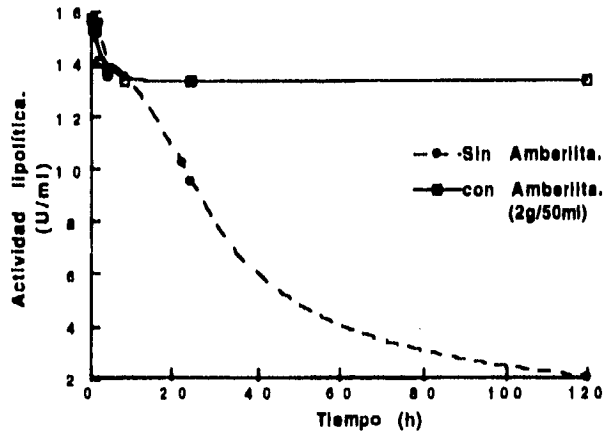
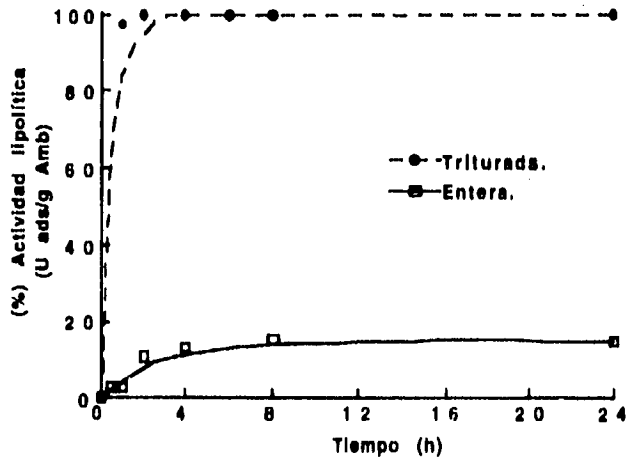


Fig 7.17 Cinética de adsorción de lipasa de *R. delemar* en
Amberlita entera y triturada.



7.5.2. Experimentos de desorción.

7.5.2.1 Desorción de lipasa con cloruro de sodio.

La Amberlita es una resina de intercambio iónico, que tiene la capacidad de adsorber la lipasa de *Rhizopus delemar* y por su carácter de intercambio iónico se pretende hacer la separación de Amberlita-lipasa utilizando un ion que pueda desplazar a la lipasa. Por esta razón se utilizaron diferentes concentraciones de cloruros, en forma de cloruro de sodio. En la **figura 7.18** se observa que el mayor porcentaje de desorción de lipasa se obtiene utilizando 5g de NaCl/g.MS. Eso corresponde al 37.7% del total de la lipasa que se expresa. Por otro lado con la misma cantidad de cloruro de sodio se desorbe el 5% del total de la lipasa adsorbida; Debido a que la cantidad de lipasa que se adsorbe no corresponde a la cantidad de lipasa que se expresa, se calcula la el porcentaje de desorción con respecto a la lipasa adsorbida y a la lipasa que se expresa, lo cual nos da una idea más real de la desorción. Aunque la tendencia de la gráfica indica que la desorción podría aumentar si se aumenta la concentración de clouro de sodio, se consideró que esta cantidad ya es muy alta.

7.5.2.2. Desorción de lipasa a diferentes pH.

Este experimento se realizó en un rango de pH en el cual se encuentra el pH de 5 que es el optimo de estabilidad del extracto y con 2g de NaCl por gramo de Amberlita. En la **figura 7.19** se observa que a pH=5, el 34% del total de la lipasa que se expresa se separa, correspondiente a 13.5 unidades de 39.8 unidades expresadas totales y el 17% del total de la lipasa adsorbida se desorbe, correspondiente a 54.6 unidades de 321.0 unidades adsorbidas.

Fig 7.18 Porcentaje de desorción de lipasa de *R. delemar* a diferentes concentraciones de NaCl (pH=6)

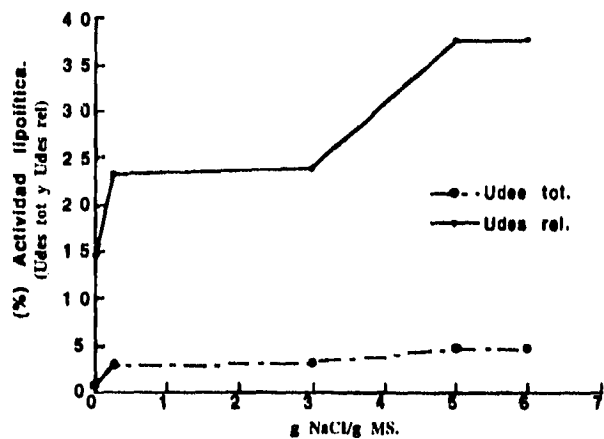


Fig 7.19 Porcentaje de desorción de lipasa de *R. delemar* a diferentes pH.

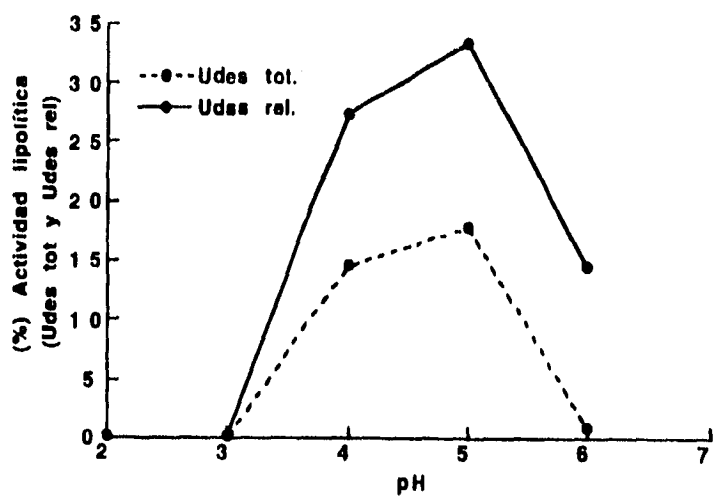


Tabla 7.5. Relación soporte - enzima en ambos tamaños de Amberlita y relación con la fermentación en estado sólido.

Act de la lipasa de <i>Rhizopus delemar</i> en:	% Unidades Adsorbidas.	% Unidades expresadas	% Unidades desorbidas. (5g NaCl/g.MS)
Amberlita entera	10.0	5.0	-
Amberlita triturada	98.7	20.0	37.7
Amberlita entera (producción en FMS.)	-	15.7	-

En la tabla 7.5 se observa que el porcentaje de adsorción de lipasa de *R. delemar* en Amberlita triturada es 80% superior al porcentaje de adsorción en Amberlita entera. Sin embargo, el porcentaje de unidades expresadas de lipasa adsorbida en Amberlita entera representa el 50% del total de unidades adsorbidas. Por otra parte del 20% de unidades que se expresan cuando la lipasa esta adsorbida en Amberlita triturada, solamente es posible desorber o recuperar el 37.7% con 5g de NaCl/g.MS. Extrapolando este dato a la fermentación sólida podemos decir que no resultaría conveniente desorber la lipasa, debido a que se consiguen porcentajes de desorción muy bajos. Además otra opción sería utilizar esta lipasa adsorbida en la Amberlita, es decir utilizarla inmovilizada en la resina. En lo que respecta a la lipasa producida en fermentación sólida, observamos que se expresan 15.66U/ml de volumen útil de reactor; si tomamos en cuenta que este valor representa el 50% del total de la lipasa adsorbida, podemos decir que las cantidades de lipasa que se producen en fermentación sólida, son superiores a las producidas en fermentación líquida.

7.6. Termorresistencia de la lipasa adsorbida en Amberlita.

Cuando una enzima se adsorbe por cargas a un soporte, puede estar sujeta a cambios en su estructura, lo cual podría modificar algunas de sus propiedades o conferirle alguna otra (López-Munguía, 1987), por ejemplo termoeestabilidad, según se muestra en el siguiente experimento.

Se puso a secar a 80°C, durante 24h, 4g de Amberlita triturada, con una actividad de 39.4 U/g M.S, después de este tiempo se le determinó actividad lipolítica a un gramo de esta Amberlita y la actividad fue de 39.35 U/g M.S, lo cual nos indica que prácticamente la lipasa no se desnaturaliza cuando se somete a un

tratamiento de secado, estando adsorbida en Amberlita. Sería conveniente repetir este experimento a diferentes temperaturas de secado para encontrar la máxima resistencia al calor por la lipasa adsorbida en la Amberlita.

8. Conclusiones.

8.1. Caracterización del crecimiento y producción de lipasas de *Rhizopus delemar* en fermentación líquida y sólida.

1. Al reproducir los experimentos de crecimiento y producción de lipasas por *Rhizopus delemar* en fermentación líquida hechos por Martínez *et.al.*(1993), se obtuvieron resultados similares. La máxima producción de lipasas fue de 14.07U/ml a las 48h de la fermentación.

2. Hacer uso de la centrifugación (5000 r.p.m. por 5 min) para separar la biomasa del extracto, disminuye la actividad lipolítica en un 50%.

3. Se observó que el pH de máxima estabilidad del extracto lipolítico no corresponde al pH de máxima actividad de la lipasa (Mayor estabilidad pH=5, mayor actividad pH= 6.5).

4. No obstante que el crecimiento de *Rhizopus delemar* en Amberlita, reflejado por las tasas de consumo de oxígeno y producción de bióxido de carbono (OUR Y CDPR), es similar cuando se utiliza dextrina, maltosa y glucosa como fuente de carbono, la actividad lipolítica varía considerablemente entre estas tres fuentes; siendo dextrina la fuente de carbono con la cual se obtiene la mayor producción de lipasas, precedida de maltosa y glucosa. Se hace la hipótesis global de que primero el hongo consume la fuente de carbono, reflejado en la mayor actividad respiratoria y posteriormente empieza a producir la lipasa de manera inmediata, para consumir el aceite de olivo.

2. Comparación de la producción de lipasas entre fermentación líquida y sólida.

1. El tiempo de máxima producción de lipasas en fermentación sólida es más corto que el tiempo de máxima producción de lipasas en fermentación líquida.(fermentación sólida 20h y fermentación líquida 48h.)

2. La productividad másica es mayor en medio sólido que en medio líquido (95.62 U/gMS y 14.07 U/ml). Sin embargo, esta diferencia se reduce hasta dar valores muy cercanos si se toma en cuenta las unidades por volumen útil de reactor (15.66U/ml).

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA 49

3. Relación soporte-lipasa.

1. Al adsorber lipasa en Amberlita entera, fue posible observar que una considerable cantidad de esta, no se expresa, es decir se pierde lipasa posiblemente por los fenómenos de adsorción en multicapas, impedimento estérico o gradientes de concentración intraparticular que se presentan cuando se inmoviliza una enzima por el método de adsorción. Por otra parte, cuando se disminuye el tamaño de la Amberlita estos fenómenos de adsorción disminuyen ligeramente. Sin embargo los porcentajes de adsorción son superiores a los de expresión de la lipasa inmovilizada. Tomando en cuenta que no toda la lipasa presente se expresa, podríamos decir que posiblemente el valor de la actividad lipolítica obtenido en la fermentación sólida es mayor a lo demostrado.

2. Se observó que aumenta la estabilidad de la lipasa frente al tiempo y a la temperatura cuando se encuentra adsorbida en Amberlita.

3. Se desorbió la lipasa de *R. delemar* de la Amberlita, cambiando el pH del medio y adicionando varias concentraciones de NaCl para favorecer el intercambio iónico, logrando desorber solamente un 37.7% de lipasa con 5g de NaCl, por otra parte a pH de 5 se desorbió el 34.0%. Estos valores de desorción son bajos debido a que estas técnicas no están optimizadas. Por lo anterior sería conveniente que la lipasa producida en la fermentación sólida se utilice adsorbida en la resina, de otra manera los rendimientos pueden disminuir.

9. Bibliografía.

- Aidoo, K., Hendry, R. & Wood, B.J.B., Solid Substrate Fermentation. **Adv. Appl. Microbiol.** 28: 201, 1982.
- Alford, J.A., Pierce, D.A. Production of Lipase by *Pseudomonas fragi* in a Synthetic Medium. **J. Bacteriol.** 86: 24, 1963.
- Alhir, S., Markakis, P., Chandan, R.C. Lipase of *Penicillium caseicolum*. **J. Agric. Food Chem.** 38(3): 598, 1990.
- Anónimo. Applications of Biotechnology. **Food. Market. Technol.** 3(2): 31, 1989.
- Arnold, R.G., Shahani, K.M. and Dwivedi, B.K. Application of Lipolytic Enzymes to Flavor Development in Dairy Products. **J. Dairy Sci.** 58: 1127, 1975.
- Arnold, R.G., Shahani, K.M., Dwivedi, B.K. Application of Lipolytic Enzymes to Flavor Development in Dairy Products. **J. Dairy Sci.** 58(8): 1127, 1974.
- Auria, R., Hernandez, S., Raimbault, M., Revah, S. Ion exchange Resin: A Model Support for Solid State Growth Fermentation of *Aspergillus niger*. **Biotechnol. Technol.** 4: 391, 1990.
- Bailey, J.E. and Ollis, D. **Biochem. Engineering Fundamentals**, Ed., Mc Graw-Hill Book Co, 1987.
- Corzo-Burgete, G.A., **Estudio Comparativo de la Producción de Lipasas por *Yarrowia lipolytica* en Sistemas Líquido y Sólido.** Tesis de Maestro en Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, U.N.A.M., México D.F., 1993, 95 pp.
- Chen, J-P., McGill, D.S. Enzymatic Hydrolysis of Triglycerides by *Rhizopus delemar* Immobilized on Biomass Support Particles. **Food. Biotechnol.** 6(1): 1, 1992.
- Christen, P., and López-Munguía, A. Enzymes and Food Flavor - a Review. **Food. Biotechnol.** 8(2&3), 167, 1994.
- Christen, P., Auria, R., Vega, C., Villegas, E., and Revah, S. Growth of *Candida utilis* in Solid state Fermentation. **Biotech. Adv.** 11: 549, 1993.
- Christen, P., Villegas, E. and Revah, S. Growth and Aroma Production by *Ceratocystis fimbriata* in various Fermentation Media. **Biotech. Lett.** 16(11), 1183, 1992.
- Dole, V.P., Mienertz, H. Microdetermination of Long- Chain Fatty Acids in Plasma and Tissues. **J. Biol. Chem.** 235: 2595, 1960.
- Geraats, S.M., Scaling- Up of a Lipase Fermentation Process: A Practical Approach. **Adv. Bioprocess. Engin.** 41, 1994.

Haas, M.J. and Bailey, D.G. Glycerol as a Carbon source for Lipase Production by The Fungus *Rhizopus delemar*. **Food. Biotechnol.** 7(1): 49, 1993.

Harlander, A. Food Biotechnology: Yesterday, Today, and Tomorrow. **Food. Tecnol.** 43(9): 196, 1989.

Langrand, G., Triantaphylides, C., and Baratti, J. Lipase catalyzed formation of flavour esters. **Biotechnol. Lett.**, 10: 549, 1988.

López-Munguía C. (1993). Producción de enzimas microbianas. En A. López-Munguía, M. García y R. Quintero (comps.), **Biotecnología Alimentaria**, Ed. Limusa, S.A. d. C.V., 1993, pp.612.

López-Munguía, C. (1987). Cinética enzimática básica. En A. López-Munguía, R. Quintero (Comps.), **Tecnología Enzimática: Aplicaciones en Alimentos y Medicina**. Universidad Nacional Autónoma de México, México, 1987. 30 pp.

Martinez, P., Christen, P., and Farrés, A. Medium Optimization by a Fractional Factorial Design for Lipase Production by *Rhizopus delemar*. **J. Ferment. Bioeng.** 76: 1, 1993.

Menassa, A., Lamberet, G. Contribution a l'etude du Systeme Lipolytique de *Penicillium roqueforti*. **Le Lait** 62: 32, 1982.

Mohsen, S., Alian, A., Attia, R., and El Azhary, T.: Specificity of lipase produced by *Rhizopus delemar* and its utilization in bread making. **Egypt. J. Food. Sci.** 14: 175, 1986.

Monsan, P. (1987). Métodos de inmovilización de enzimas. En A. López-Munguía, R. Quintero (Comps.), **Tecnología Enzimática: Aplicaciones en Alimentos y Medicina**. Universidad Nacional Autónoma de México, México, 1987. 79 pp.

Moo-Young M.A., Moreira R. and Tengerdy R.P. Principles of Solid Substrate in the Filamentous Fungi. **Fungal Technol.** Vol. IV. S.E. Smith, D.R. Berry and B. Vristiensen, Editors. Arnold, London, pp.117-144, 1983.

Mudgett, R.E., Solid-State Fermentations. **Handbook of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Eds American Society for Microbiology 7: 66, 1986.

Nagao, A. and Quito, M.: Synthesis of O-Acyl-L-Homoserine by lipase. **JAOCS.** 66, 710, 1989.

Nahas, E. Control of Lipase Production by *Rhizopus oligosporus* under Various Growth Conditions. **J. Gen. Microbiol.** 134: 227, 1988.

Novotny, C., Dolezalova, L., Musil, P. and Novak, M. The production of Lipases by some *Candida* and *Yarrowia* Yeasts. **J. Basic. Microbiol.** 28: 221, 1988.

- Oriol, E., Schettino, B., Viniestra-González, G. and Raimbault, M. Solid State Culture of *Aspergillus niger* on Support. **J. Ferment. Technol.** 66(1),57, 1988.
- Osterberg, E., Blomstrom, A., and Holmberg, K. Lipase catalyzed transesterification of unsaturated lipids in a microemulsion. **JAACS.** 66, 1330, 1989.
- Pandey,A. Aspects of Fermenter Design for Solid-State Fermentations. **Process Biochem.** 26: 355,1991.
- Priest , F.G. Extracellular Enzymes in Comprehensive Biotechnology. Edit by Murray and Moo-Young. Vol. 2, Section 2. Pargamon Press, USA, 1985.
- Raimbault, M and Alazard, D. Culture Method to Study Fungal Growth in solid Fermentation. **European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.** 9: 199,1988.
- Raimbault,M. **Fermentation en Milieu Solide: Croissance des Champignons Filamenteux sur Sustrate Amilace.** Tesis Doctoral, U. Paul Sabatier, Francia., 1980.
- Rhom and Haas Company. Amberlita IRA-900 **Engineering notes.** 1984.
- Rivera-Muños,G., Tinoco-Valencia, J.R., Sánchez, S. and Farrés, A. Production of Microbial Lipases in Solid State Fermentation System. **Biotechnol. Lett.** 13: 277, 1991.
- Viniestra, G. **Perspectives and Limitations of Solid Fermentation in México,** Symposium Montpellier 25-27 July (France), **Solid State Fermentation in Bioconversion on Agroindustrial raw Materials** , Ed. Maurice Raimbault, Pub. ORSTOM, 67-69, 1988.
- Wasserman,B.P. Evolution of Enzyme Technology: Progress and Prospects. **Food. Technol.** 44(4): 118,1990.