



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE QUÍMICA

---

ESTUDIO DE LA REGULACIÓN POR FUENTE DE  
CARBONO EN LA PRODUCCIÓN DE LIPASAS  
DE CEPAS DE *Rhizopus delemar*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A

MARTHA ROCÍO MIRALLES CÁRDENAS



MÉXICO, D.F.

2000

2000



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.

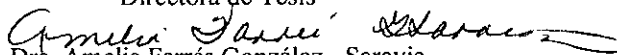
Jurado Asignado

**PROFESORES**

Presidente	Prof. Agustín López- Munguía Canales
Vocal	Prof. (a) María Elena Cañizo Suárez
Secretario	Prof. (a) Amelia Farrés González -Saravia
1er Suplente	Prof. Hugo Rubén Carreño Ortiz
2° Suplente	Prof. Francisco Casillas Gómez

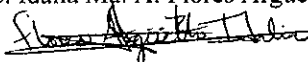
El presente trabajo fue realizado en la Facultad de Química, Conjunto "E",  
Departamento de Alimentos y Biotecnología de la  
Universidad Nacional Autónoma de México

Directora de Tesis

  
Drá. Amelia Farrés González - Saravia

Supervisora Técnica

M. en C. Idalia Ma. A. Flores Argüello



Sustentante

Martha Rocío Miralles Cárdenas



A mis papás Guillermo Miralles y Celia Martha Cárdenas de Miralles porque esta Tesis y lo que significa es un triunfo de los tres.

A mis hermanos Guillermo y Juan Carlos de los que estoy muy orgullosa.

A la época de Universitaria, a los años de estudio, de goyas, de risas y de sueños. Gracias a todos con los que viví y compartí esta etapa y esos sueños porque lo hicieron único y muy especial.

A la UNAM que me ha enseñado que no es sólo una Institución, sino que es parte de todos los que ahí nos formamos.

A Mo mi mejor amigo, mi cómplice y la persona con la que quiero compartir mi vida. Te amo

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Amelia Farrés por su amistad, apoyo y paciencia durante la realización de ésta Tesis.  
¡Gracias!

A la M. en C. Idalia Flores por su amistad y su apoyo incondicional.  
¡Gracias, sin ti no lo hubiera logrado!

A la M. en C. Sandra Pérez por su valiosa ayuda y apoyo en el análisis de Cromatografía de Gases.

A todos mis compañeros del Laboratorio 312 que hicieron divertido mi proyecto de Tesis.

***Esta Tesis formó parte del proyecto de DGAPA IN201094  
y se desarrolló con apoyo económico.***

## ÍNDICE

<b>1. RESUMEN</b>	1
<b>2. INTRODUCCIÓN</b>	3
<b>3. ANTECEDENTES</b>	6
3.1 LIPASAS	6
3.2 PRODUCCIÓN DE SABORES POR MICROORGANISMOS Y ENZIMAS	10
3.3 PRODUCCIÓN DE ENZIMAS	13
4. OBJETIVOS	15
4.1 OBJETIVO GENERAL	15
4.2 OBJETIVO PARTICULAR	16
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	16
5.1 CEPA	16
5.2 MEDIO DE CULTIVO	17
5.3 COSECHA DE ESPORAS	17
5.4 MONTAJE DE LA FERMENTACIÓN	19
5.5 DETERMINACIONES ANALÍTICAS	19
5.5.1 Biomasa	19
5.5.2 pH	19
5.5.3 Actividad Lipolítica Volumétrica	19
5.5.4 Actividad Proteolítica	20
5.5.5 Azúcares Residuales	21
5.5.6 Proteína Extracelular	22
5.6 MODIFICACIÓN DE CREMA	22
5.7 ACIDEZ TITULABLE	22
5.8 EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS GRASOS LIBRES	23
5.9 METILACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS LIBRES	23
5.10 CROMATOGRAFÍA DE GASES	24
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	24
6.1 CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS SILVESTRE Y MUTANTES (M1 Y M2) DE <i>Rhizopus delemar</i>	26
6.2 CINÉTICAS DE ACTIVIDAD LIPOLÍTICA	26
6.2.1 Comportamiento cinético de las cepas silvestre y mutante de <i>Rhizopus delemar</i> con glucosa como fuente de carbono al 1% y 4% y 2% de aceite de olivo como inductor.	31
6.2.2 Comportamiento cinético de las cepas silvestre y mutante de <i>Rhizopus delemar</i> con almidón como fuente de carbono al 1% y 4% y 2% de aceite de olivo como inductor.	35
6.2.3 Comportamiento cinético de las cepas silvestre y mutante de <i>Rhizopus delemar</i> con dextrinas como fuente de carbono al 1% y 4% y 2% de aceite de olivo como inductor.	41
6.2.4 Comparación de productividad y rendimiento de las cepas silvestre y mutante de <i>Rhizopus delemar</i> con diferentes fuentes de carbono y diferentes concentraciones.	44
6.3 EFECTO DE AMPc Y DIBUTIRIL AMPc SOBRE LAS CEPAS SILVESTRE Y MUTANTE DE <i>Rhizopus delemar</i> UTILIZANDO GLUCOSA 4% COMO FUENTE DE CARBONO.	47
6.4 MODIFICACIÓN DE UNA CREMA DE LECHE COMERCIAL CON DIFERENTES LIPASAS DE ORIGEN ANIMAL Y FUNGAL	47
6.4.1 Obtención de los extractos enzimáticos de las cepas silvestre y mutante de <i>Rhizopus delemar</i>	48
6.4.2 Determinación de la actividad lipolítica de las lipasas comerciales	49
6.4.3 Modificación de la grasa	50
6.4.4 Cuantificación de los ácidos grasos libres	54
<b>7. CONCLUSIONES</b>	56
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b>	

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Aplicación de las enzimas comerciales (Adaptada de Novo Nordisk, reporte anual 1994).	8
Figura 2. Degradación de los lípidos durante la maduración de quesos.	12

## ÍNDICE DE TABLAS

### INTRODUCCIÓN

Tabla 1. Peso molecular, punto isoelectrico y glicosilación de lipasas de <i>Rhizopus delemar</i> .	5
---	---

### ANTECEDENTES

Tabla 1. Lipasas de origen microbiano disponibles comercialmente (Jaeger y Manfred, 1998).	9
--	---

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 1. Comparación de la actividad lipolítica específica entre la cepas M1 y M2 de <i>Rhizopus delemar</i> .	24
Tabla 2. Comparación de actividad lipolítica específica y volumétrica entre las cepas silvestre y mutante de <i>Rhizopus delemar</i> con una concentración de 1% de glucosa.	28
Tabla 3. Comparación de actividad lipolítica específica y volumétrica entre las cepas silvestre y mutante de <i>Rhizopus delemar</i> con una concentración de 4% de glucosa.	28
Tabla 4. Comparación entre el pp. y la actividad lipolítica específica de la cepa silvestre de <i>Rhizopus delemar</i> a las 24h de fermentación.	38
Tabla 5. Comparación entre el pH y la actividad lipolítica específica de la cepa mutante de <i>Rhizopus delemar</i> a las 24h de fermentación.	38
Tabla 6. Comparación de productividad para la producción de lipasas de las cepas silvestre y mutante de <i>Rhizopus delemar</i> usando glucosa, almidón y dextrinas como fuentes de carbono en los máximos de actividad lipolítica específica.	42
Tabla 7. Comparación de rendimiento de las cepas silvestre y mutante de <i>Rhizopus delemar</i> usando glucosa, almidón y dextrinas como fuentes de carbono en los máximos de actividad lipolítica específica.	42
Tabla 8. Características del extracto enzimático de las cepas silvestre y mutante de <i>Rhizopus delemar</i> .	47
Tabla 9. Actividad lipolítica volumétrica de las lipasas comerciales	48
Tabla 10. Tiempos de retención y proporción de ácidos grasos libres generados por las enzimas de <i>Rhizopus delemar</i> silvestre y mutante así como de las enzimas comerciales.	53

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Gráfica 1. Cinética de actividad lipolítica específica. Cepa silvestre usando como sustrato 1% de glucosa.	29
Gráfica 2. Cinética de actividad lipolítica específica. Cepa silvestre usando como sustrato 4% de glucosa.	29
Gráfica 3. Cinética de actividad lipolítica específica. Cepa mutante usando como sustrato 1% de glucosa.	30
Gráfica 4. Cinética de actividad lipolítica específica. Cepa mutante usando como sustrato 4% de glucosa.	30
Gráfica 5. Cinética de actividad lipolítica específica. Cepa silvestre usando como sustrato 1% de almidón.	33

Gráfica 6. Cinética de actividad lipolítica específica. Cepa silvestre usando como sustrato 4% de almidón.	33
Gráfica 7. Cinética de actividad lipolítica específica. Cepa mutante usando como sustrato 1% de almidón.	34
Gráfica 8. Cinética de actividad lipolítica específica. Cepa mutante usando como sustrato 4% de almidón.	34
Gráfica 9. Cinética de actividad lipolítica específica. Cepa silvestre usando como sustrato 1% de dextrinas.	36
Gráfica 10. Cinética de actividad lipolítica específica. Cepa silvestre usando como sustrato 4% de dextrinas.	36
Gráfica 11. Cinética de actividad lipolítica específica. Cepa mutante usando como sustrato 1% de dextrinas.	37
Gráfica 12. Cinética de actividad lipolítica específica. Cepa mutante usando como sustrato 4% de dextrinas.	37
Gráfica 13. Comparación de pH y actividad lipolítica específica de la cepa silvestre a las 24h de fermentación.	39
Gráfica 14. Comparación de pH y actividad lipolítica específica de la cepa mutante a las 24h de fermentación.	40
Gráfica 15. Comparación de actividad lipolítica volumétrica entre las cepas silvestre y mutante de <i>Rhizopus delemar</i> con diferentes fuentes de carbono y concentraciones.	43
Gráfica 16. Comparación de la actividad lipolítica volumétrica de la cepa silvestre con 4% de glucosa y adicionando al medio concentraciones de AMPc y dibutiril-AMPc.	46
Gráfica 17. Acidez titulable reportada como porcentaje de ácido oleico liberado por cada lipasa durante la modificación de la crema.	49
Gráfica 18. Composición porcentual de ácidos grasos libres generados durante la modificación de la crema por las diferentes lipasas.	52



## RESUMEN

Las lipasas son enzimas que hidrolizan tri-, di- y monoglicéridos presentes en una interfase agua-aceite. Se utilizan para obtener saborizantes, particularmente en productos lácteos y para la maduración acelerada de quesos (Chen y Chang 1993). El factor limitante para el uso de las enzimas a nivel industrial es el costo y la disponibilidad de las mismas. Por esta razón es importante obtener la mayor cantidad de enzima al menor costo. Las estrategias empleadas hasta ahora incluyen mejorar genéticamente a los microorganismos productores así como la optimización de los medios de cultivo.

En el presente trabajo se caracterizaron dos cepas mutantes de *Rhizopus delemar* (M1 y M2) hiperproductoras, obtenidas previamente con el criterio de resistencia a efecto negativo de la fuente de carbono (Peralta, 1994). Se evaluó el incremento en la producción de enzima en diferentes condiciones de cultivo en comparación con la cepa silvestre de *Rhizopus delemar* así como su aplicación en la modificación de crema comercial para la obtención de saborizantes.

En primera instancia se verificó el fenotipo de las cepas mutantes. Se encontró que la cepa M1 sufrió una reversión, mientras que la M2 mantuvo las características de hiperproducción e insensibilidad al efecto negativo de glucosa, por lo que se utilizó para los experimentos posteriores. En un medio de cultivo con glucosa como fuente de carbono tanto al 1% como al 4% la actividad lipolítica específica de la cepa M2 fue mayor que la de la cepa silvestre, efecto que no se manifestó con fuentes de carbono complejas, como almidón y dextrinas (1%). La cepa silvestre de *Rhizopus delemar* presentó represión por fuente de carbono cuando creció en un medio con 4% de glucosa. Esto corroboró que es la glucosa *per se* la fuente de carbono que reprime la producción de lipasa por la cepa silvestre de *Rhizopus delemar*.

Con el fin de determinar el mecanismo por el que ocurre la regulación de carbono en la cepa silvestre de *Rhizopus delemar* así como verificar si el AMP cíclico puede revertir el efecto negativo de glucosa en dicha cepa, se adicionaron diferentes concentraciones de AMPc y un análogo sintético, dibutiril-AMPc, a un medio de cultivo con 4% de glucosa como sustrato. Se encontró que tanto el AMPc como el dibutiril-AMPc afectan la actividad lipolítica de la cepa silvestre de *Rhizopus delemar*. A mayor concentración de AMPc el efecto en la actividad

lipolítica es positivo, mientras que a una concentración baja la actividad lipolítica disminuye significativamente con respecto al control. El dibutiril- AMPc tanto a altas como bajas concentraciones tiene un efecto positivo en la actividad lipolítica.

Por último se evaluó el uso de la lipasa producida por la cepa mutante de *Rhizopus delemar* para la modificación acelerada de crema y obtención de sabores lácteos tipo quesos, que podrían ser empleados en aderezos para ensaladas, dips, etc. Sin embargo, los perfiles de ácidos grasos que se obtuvieron en crema modificada con las lipasas de las cepas silvestre y mutante fueron muy diferentes. La diferencia principal radica en la proporción de ácidos grasos de cadenas largas (18 carbonos), los que se sabe son los responsables de impartir notas jabonosas en los sabores. Esto indica que la lipasa de la cepa hiperproductora no se recomienda para la maduración acelerada de cremas para obtención de sabores lácteos tipo quesos. De aquí que se concluya que los criterios de selección de cepas mutantes hiperproductoras no son suficientes para garantizar la aplicación de las enzimas en procesos de la industria alimentaria, como el caso de modificación de grasas.

## INTRODUCCIÓN

En el Departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química de la UNAM se ha trabajado en la selección de microorganismos con altas actividades lipolíticas, así como en su mejoramiento tanto genético como de los medios de cultivo. *Rhizopus delemar* es un hongo filamentosos que ha sido empleado como fuente de lipasa para diversas aplicaciones, entre ellas la modificación de grasa láctea para la obtención de sabores. Por trabajos anteriores se sabe que factores como el pH son críticos en la producción de lipasa por *Rhizopus delemar* y hay un incremento en la actividad de 2.5 veces cuando el pH es controlado durante la fermentación (Martínez y Farrés, 1993). Asimismo se demostró que *Rhizopus delemar* presenta represión por fuente de carbono cuando se utiliza glucosa al 4% como fuente de carbono (Kawasaki, 1991).

El fenómeno de represión catabólica ha sido ampliamente estudiado en bacterias. Se piensa que la represión se desencadena con la fosforilación de la glucosa, lo que genera disminución en los niveles de AMPc (monofosfato cíclico de adenosina) que inactiva la CAP (proteína activadora de catabolito). Sin embargo, este fenómeno no ha sido entendido del todo en hongos. Algunos trabajos con levaduras y hongos filamentosos han revelado que el mecanismo de represión en eucariontes es diferente que lo estudiado en bacterias. Genes como *Mig1* en levaduras y *CreaA* en hongos desempeñan un papel importante en la mediación de este tipo de represión. De hecho, en hongos se ha considerado que el AMPc no tiene ningún papel importante en la represión catabólica. Sin embargo, en 1994 Mousumi y Geeta reportaron que para el caso de *Aspergillus sydowii*, un hongo filamentosos que presentaba represión por glucosa para la producción de xilanasa, se pudo revertir el efecto cuando se añadió al medio un análogo no natural de AMPc a una concentración de 100µM de dibutilil-AMPc .

Esto abrió dos preguntas interesantes para el presente trabajo con *Rhizopus delemar*:

- i)* Si el AMPc y/o su análogo entran a la célula, y
- ii)* Si alguno de estos compuestos lograra revertir el efecto de la represión por glucosa.

También se han realizado estudios sobre el mejoramiento genético de la cepa de *Rhizopus delemar* con el fin de obtener mejores rendimientos de enzima y de poder emplear medios complejos. Se buscaron mutantes hiperproductoras y /o insensibles a la represión por glucosa (Peralta 1994). Dado el carácter aleatorio de las mutaciones es importante para el presente trabajo verificar que las mutantes conserven los fenotipos mejorados genéticamente y probar su posible aplicación en la modificación de sabores lácteos.

Las lipasas obtenidas de las cepas silvestre y mutante de *Rhizopus delemar* fueron caracterizadas en trabajos previos del grupo de investigación. Dicha caracterización concluyó que características como pesos moleculares y puntos isoeléctricos de las lipasas son ligeramente diferentes, como se observa en la tabla 1.

**TABLA 1. PESO MOLECULAR, PUNTO ISOELÉCTRICO Y GLICOSILACIÓN DE LIPASAS DE *Rhizopus delemar*.**

CEPA	PESO MOLECULAR (KDa)	PUNTO ISOELÉCTRICO	GLICOSILACIÓN
S	35.98	6.99	SI
M	34.05	7.14	SI

Por todo esto, la primera fase de esta investigación se enfocó a verificar las características de las cepas mutantes obtenidas. Después se procedió a caracterizar la actividad lipolítica de las cepas mutantes y silvestre de *Rhizopus delemar* en diferentes fuentes de carbono y concentraciones de las mismas. Posteriormente se estudió si el AMPc pudiese jugar un papel importante en la regulación de la represión por fuente de carbono. Finalmente, se evaluó la posibilidad del uso de la cepa mutante de *Rhizopus delemar* para la obtención de sabores lácteos, a través de la modificación de crema comercial, en comparación con la cepa silvestre de *Rhizopus delemar*.

## ANTECEDENTES

### 1. LIPASAS

Las lipasas son enzimas que hidrolizan tri, di y monoglicéridos presentes en la interfase agua-aceite. Esta hidrólisis genera glicerol y ácidos grasos libres. Si la hidrólisis no es completa entonces genera di y monoglicéridos. La característica principal de las lipasas es que su actividad es máxima solamente cuando la enzima actúa en la interfase agua-aceite, propiedad conocida como activación interfacial. La hidrólisis se realiza en un medio de reacción heterogéneo formado por el sustrato insoluble (lípidos) en forma de bicapas o micelas y la fase acuosa que contiene la enzima soluble (Godtfredsen, 1990).

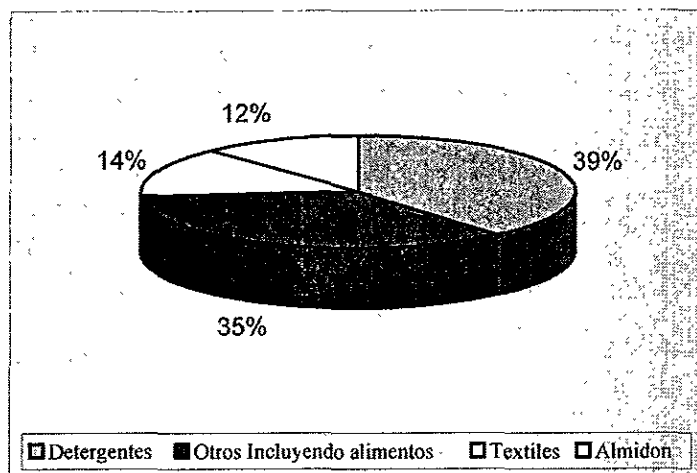
Las lipasas, por su especificidad, se pueden dividir en dos grupos: específicas y no específicas. Las específicas hidrolizan uniones ésteres complejas a la primera o segunda posición. Muchas enzimas provenientes de microorganismos hidrolizan el primer enlace éster (unión  $\alpha$ -éster), por lo que los hidrolizados generados por estas lipasas contienen normalmente ácidos grasos 2-3 y 1-2 diglicéridos y 2 -monoglicéridos. Después de largos períodos de reacción, el residuo de ácido graso en 2-monoglicérido migra a la posición 1 para formar 1-monoglicéridos que son mucho más fáciles de hidrolizar por enzimas específicas a glicerol y ácidos grasos. Este grupo incluye lipasas de *Rhizopus delemar*, *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus microsporus* y *Apergillus niger*. Las lipasas no-específicas no distinguen los enlaces éster de ninguna de las tres posiciones y pueden hidrolizar por completo el sustrato (Davranov, 1994).

Las lipasas son secretadas por hongos, bacterias, plantas, animales y humanos (páncreas), y están involucradas en procesos anabólicos.

- Lipasas de origen microbiano: se ha profundizado en el estudio y desarrollo de este tipo de enzimas que se encuentran en bacterias, hongos y levaduras (Kilara, 1985). En las lipasas de origen microbiano se ha encontrado que la mayoría tienen su máxima actividad en un rango de pH 5.6-8.7 y de temperaturas entre 30°C y 40°C (Malcata *et al.*, 1992).
- Lipasas de origen vegetal: las lipasas son abundantes en los tejidos de reserva. Los estudios se centran en oleaginosas tanto en la planta como en la semilla o la fruta. Las semillas tienen una actividad lipolítica elevada, debido a que deben cubrir los requerimientos energéticos a partir de las reservas de triglicéridos, pero no siempre están presentes en la semilla latente. Se ha detectado actividad en semillas de ricino, nabo, colza, girasol, trigo, maíz y avena (Desnuelle, 1975).
- Lipasas de origen animal: se han hecho estudios en lipasas de mamíferos, principalmente porcinos y rata. Se encuentran en órganos y tejidos como páncreas, corazón, cerebro, arterias, riñón, tejido adiposo, sangre, orina y leche (Desnuelle, 1975).

El campo comercial más amplio en donde se han utilizado las lipasas es en la adición a detergentes para limpieza de ropa y utensilios de cocina. El mercado comercial de las enzimas ascendió a un billón de dólares anuales según un estudio de Lowe en 1992. El 40% de las enzimas comerciales disponibles provienen de hongos filamentosos (Archer & Pederby, 1994). Las aplicaciones de las enzimas son principalmente en detergentes, textiles y otras, incluida la industria de alimentos (Figura 1.).

**FIGURA 1. PRINCIPALES APLICACIONES DE LAS ENZIMAS COMERCIALES.**



Las principales razones del uso de las lipasas de microorganismos en la industria son:

*i)* son estables en solventes orgánicos, *ii)* no requieren de cofactores, *iii)* poseen una amplia especificidad de sustratos, y *iv)* poseen una alta enantioselectividad. La tabla 1 presenta ejemplos de lipasas provenientes de microorganismos disponibles comercialmente (Jaeger y Manfred, 1998).



**TABLA 1. LIPASAS DE ORIGEN MICROBIANO DISPONIBLES COMERCIALMENTE.**

<i>Ejemplos de lipasas producidas por microorganismos disponibles comercialmente</i>			
<b>Origen</b>	<b>Organismo productor</b>	<b>Aplicaciones Biotecnológicas</b>	<b>Comercializado por</b>
<b>Fungal</b>	<i>Candida rugosa</i>	Síntesis Orgánica	Amano, Biocatalysts, Boehringer Mannheim, Fluka, Genzyme, Sigma
	<i>Candida antarctica A/B</i>	Síntesis Orgánica	Boehringer Mannheim, Novo Nordisk
	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Aditivo de detergentes	Novo Nordisk, Boehringer Mannheim
	<i>Rhizomucor miehei</i>	Procesamiento de alimentos	Novo Nordisk, Biocatalysts, Amano
<b>Bacteriano</b>	<i>Burkholderia cepacia</i>	Síntesis Orgánica	Amano, Fluka, Boehringer Mannheim
	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	Aditivo de detergentes	Genencor
	<i>Pseudomonas mendocina</i>	Aditivo de detergentes	Genencor
	<i>Chromobacterium viscosum</i>	Síntesis Orgánica	Asahi, Biocatalysts

Fuente Jaeger y Manfred, 1998.

## **2. PRODUCCIÓN DE SABORES POR MICROORGANISMOS Y ENZIMAS**

Los microorganismos y las enzimas desempeñan un papel muy importante en la producción de sabores de una gran variedad de alimentos. Mucho antes de los que microorganismos o las enzimas fueran conocidos y estudiados, el hombre empíricamente comenzó a provocar y explotar los beneficios de procesos tales como la fermentación de los alimentos. Básicamente, la fermentación era de gran utilidad ya que alarga la vida de anaquel de algunos alimentos. Algunos ejemplos de comida típica fermentada son: tufu, col y quesos como el Roquefort, Azul, Brick y Gorgonzola (Gatfield, 1988) y en México alimentos como el pozol y bebidas como el pulque y tezgüino.

*Por mucho tiempo las plantas han sido la fuente más importante para obtener saborizantes y la mayoría de ellos se han aislado de los aceites esenciales. Sin embargo los principios activos se encuentran en muy bajas cantidades. Actualmente, muchos de los saborizantes que se encuentran disponibles se producen por síntesis química. La creciente tendencia hacia lo “natural” en alimentos, cosméticos e incluso productos para el hogar ha provocado que la mayoría de las grandes industrias enfoquen sus esfuerzos en la investigación y obtención de saborizantes de origen biológico, los llamados bio-saborizantes (Janssens, 1992). Además, también existe una creciente preocupación por la salud y en las dietas bajas en calorías y grasas. Esto también ha provocado que las grandes industrias de alimentos hayan emprendido una fuerte búsqueda de ingredientes que puedan sustituir grasas y carbohidratos principalmente.*

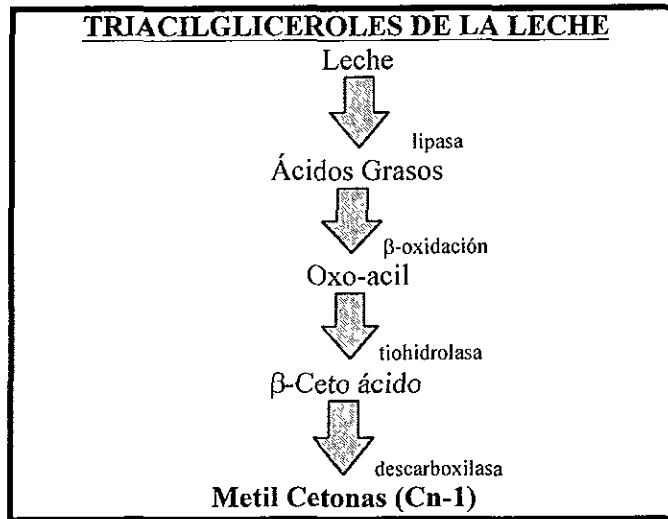
Las lipasas son un ejemplo de enzimas que han encontrado varias aplicaciones en la industria de alimentos, y específicamente en la obtención de saborizantes. Esto se logra partiendo de la transformación de grasas de diversos orígenes, y particularmente en productos lácteos (principalmente leche), además del uso para la maduración acelerada de quesos (Chen y Chang 1993).

La grasa de la leche se distingue de otras grasas por la amplia variedad de ácidos grasos de cadenas cortas, y es la única que contiene cantidades importantes de ácido butírico (Dziezick, 1989). La maduración del queso se puede definir como la transformación lenta y paulatina de las grasas, proteínas y carbohidratos, mediada principalmente por microorganismos iniciadores y flora secundaria que se añade deliberadamente a la leche.

El desarrollo del sabor en los productos lácteos puede ser atribuido a la acción de las enzimas sobre la grasa de la leche. Las lipasas son usadas para incrementar la formación de sustancias que responsables de dar el sabor en los quesos, sustitutos de mantequilla y quesos. Las lipasas refuerzan o aceleran el desarrollo del sabor mediante la hidrólisis de las grasas presentes en estos productos lácteos. Además, permite la producción de sabores únicos, así como acelerar procesos que son costosos, como la maduración de quesos por largos períodos de tiempo. El sabor específico de los quesos depende en parte de la presencia y cantidad de ácidos grasos de cadenas cortas, así como de las modificaciones derivadas de las reacciones que suceden durante la maduración. Por ejemplo, en algunos quesos como los italianos (romano, parmesano y provolone) el sabor depende de la cantidad y tipo de ácidos grasos que sean

liberados por las lipasas. Sin embargo, en otros tipos de quesos como el azul, el sabor depende tanto de los ácidos grasos que sean liberados como de la oxidación de algunos de ellos hasta metil cetonas (Figura 2).

**FIGURA 2. DEGRADACIÓN DE LÍPIDOS DURANTE LA MADURACIÓN DE QUESOS.**



Las proteínas también desempeñan un papel importante en el desarrollo de sabor de los quesos. La proteólisis conduce a la formación de compuestos volátiles y no volátiles cuya interacción contribuye al sabor y al aroma de productos lácteos. Por otro lado, el sabor amargo de los quesos se puede atribuir a los péptidos hidrofóbicos de bajo peso molecular provenientes de cortes inespecíficos de caseína. Entre las diferentes caseínas, hay algunas que dan mas notas amargas que otras, por ejemplo la  $\alpha$ 1-caseína produce más notas amargas que la  $\beta$ -caseína. Esto explica por qué quesos como el de cabra y oveja están exentos de sabores amargos, ya que los porcentajes de  $\alpha$ 1-caseína son muy bajos (Adda, 1986).

La especificidad de las lipasas a ciertos ácidos grasos es la base para el uso particular de las mismas en procesos biotecnológicos.

### **3. PRODUCCIÓN DE ENZIMAS**

El primer aspecto a considerar en el desarrollo de un sistema de producción de enzimas es la selección del microorganismo más adecuado. Es importante tomar en cuenta factores como que el microorganismo no sea patógeno y para su uso en la industria alimentaria debe de ser GRAS (General Recognized as Safe) (Bernard et al., 1985). Si la enzima es extracelular se facilitará su obtención. Los rendimientos deben ser altos y para lograrlo generalmente se recurre a algún tipo de mejoramiento genético. Los costos de producción de enzimas deben de ser razonables, lo que implica que el microorganismo crezca rápido y con los menores requerimientos nutricionales especiales posibles. Se prefieren enzimas constitutivas a aquellas que necesitan de un inductor en el medio de cultivo, para simplificar el proceso y reducir costos (Fellows, 1988).

La biosíntesis de diferentes enzimas hidrolíticas puede ser regulada y direccionada seleccionando el medio de cultivo y las condiciones adecuadas / óptimas, las lipasas pueden ser obtenidas agregando inductores al medio de cultivo (Jaeger y Manfred, 1998). La producción de lipasas en microorganismos responde de manera muy diferente ante la presencia de aceites en el medio de cultivo. En la mayoría de los casos éstos actúan como inductores y provocan un aumento en la producción, pero en otros la disminuyen. Se piensa que muy probablemente el efector es algún producto de la degradación de lípidos como el glicerol, ya que los lípidos son insolubles en agua (Hass y Bailey, 1993).

Los factores que afectan principalmente la producción de enzimas son los factores ambientales, tales como la temperatura, el pH, la transferencia de oxígeno y la agitación. De los factores nutricionales, particularmente en lo que se refiere a la disponibilidad de nutrientes, *dependen el crecimiento y reproducción.*

La mayoría de los hongos pueden crecer sobre medios conteniendo una fuente de carbono simple, nitrógeno fósforo, azufre y elementos traza (Weinberg 1982). Además, la actividad y la producción de enzimas están controladas por diversos patrones de regulación, que finalmente determinan su grado de disponibilidad. Uno de estos patrones de regulación es la represión por fuente de carbono o represión catabólica. Muchos microorganismos apagan un gran número de genes en presencia de glucosa, ya que esto les representa un ahorro energético. El efecto de represión catabólica es generalmente causado por la glucosa, aunque en diferentes organismos pueden provocarlo otras fuentes de carbono fácilmente metabolizables (Ronne et al., 1995). Existen estrategias nutricionales para evitar el efecto, como el utilizar fuentes de carbono que no sean represoras, sin problemas de disponibilidad y con precios competitivos. Asimismo se puede limitar el crecimiento por alimentación controlada de la fuente de carbono represiva e incrementar la producción de la enzima de interés mediante el uso de inductores gratuitos. Estos se llaman así porque inducen la producción y actividad de la enzima pero no pueden ser utilizados como fuente de carbono. Otra forma consiste en transferir el organismo seriadamente de una fuente de carbono represiva a otra no represiva, contando con el hecho de que la síntesis de enzimas normalmente reprimidas ocurre después de un determinado período de tiempo en que el organismo ha sido transferido de una fuente a otra (Rowlands, 1994).

## **OBJETIVOS**

### ***GENERAL***

- Evaluar el comportamiento de lipasas producidas por una cepa silvestre y una mutante de *Rhizopus delemar* hiperproductora e insensible al efecto de la fuente de en la modificación de productos lácteos.

### ***PARTICULARES***

- ⇒ Caracterizar la actividad lipolítica de las cepas silvestre y mutantes de *Rhizopus delemar* con diferentes fuentes de carbono y concentraciones de las mismas.
- ⇒ Determinar si el efecto negativo de glucosa a una concentración de 4% presentado por la cepa silvestre de *Rhizopus delemar* puede ser revertido adicionando al medio AMPc.
- ⇒ Evaluar la posibilidad del uso de lipasa de la cepa mutante de *Rhizopus delemar* hiperproductora para la modificación de grasas y la obtención de sabores lácteos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. CEPA

La cepa silvestre de *Rhizopus delemar* CDB H313 que se utilizó en este proyecto se obtuvo del Cepario del Departamento de Biotecnología del CINVESTAV, del Instituto Politécnico Nacional. Las cepas mutantes de *Rhizopus delemar* se obtuvieron y caracterizaron en el Laboratorio 312, de la Facultad de Química de la UNAM (Peralta-Farrés 1994). La conservación de las cepas se hizo en tubos de agar inclinado, con medio de papa-dextrosa-agar (PDA de Oxoid), cubiertos con aceite de parafina estéril, sellados con parafilm y mantenidos a 4°C. Se hicieron resiembras cada seis meses, aproximadamente.

### 2. MEDIO DE CULTIVO

El medio de cultivo utilizado para las fermentaciones fue el medio D (Celerin y Fergus 1971), cuya formulación es la siguiente:

Compuesto	Cantidad g/l
Glucosa (Baker)	10
Casaminoácidos (Difco)	10
Nitrato de potasio ( KNO <sub>3</sub> , Baker)	2
Sulfato de magnesio (MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O, Baker)	0.5
Fosfato dibásico de potasio (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , Baker)	1
Solución de elementos traza*	1 ml/l
Aceite de olivo (comercial)	20 ml/l

\*La composición de la solución de elementos traza es:

Compuesto	Cantidad mg/ml
Sulfato de cinc (ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O)	439.8
Nitrato de hierro (Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> )	723.5
Sulfato de manganeso (MnSO <sub>4</sub> )	203.0



El aceite de olivo comercial y la solución de elementos traza se agregan al medio después de ajustar el pH a 7. Los medios de cultivo se esterilizan a 121°C durante 15 minutos, en autoclave.

### **3. COSECHA DE ESPORAS**

- Se preparan matraces de 250 ml con 50 ml de medio PDA y se inoculan con micelio proveniente de los tubos inclinados mencionados anteriormente. Se incuban a 29°C ± 1°C durante 6 a 7 días, cuando ya se tiene un buen crecimiento del hongo.
- Se esterilizan matraces de 125 ml con 25ml de una solución de glicerol al 50% (v/v) con agua destilada, y bajo condiciones estériles se toma el micelio poco a poco, y se colocan en el matraz con el glicerol. Se agitan en un vortex, de tal modo que las esporas se desprenden y quedan suspendidas en el glicerol.
- Por separado, y con una pipeta estéril, se toma 1ml de la solución de esporas y se le agregan 3ml de agua destilada, se agita suavemente y se lee densidad óptica en el espectrofotómetro (Milton Roy, Spectronic 21D), a una longitud de onda de 540 nm, utilizando como blanco una solución de glicerol al 50% (3 ml) y 1 ml de agua destilada. La absorbancia a la que se estandariza el inóculo es de 0.06 .

### **4. MONTAJE DE LA FERMENTACIÓN**

- En matraces de 250 ml se colocan 50 ml de medio D y se esterilizan.
- Se inocula en la campana de flujo laminar o en condiciones estériles con 1ml de la solución de esporas 0.06 A.

- Los matraces se colocan en la incubadora a  $29^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  con agitación de 150 rpm, por un período de 96h, y se realiza un monitoreo a la fermentación cada 24 h como se explica en el punto 5.

## **5. DETERMINACIONES ANALÍTICAS**

### **5.1 BIOMASA**

Se filtran las muestras en un sistema Millipore con papel filtro Whatman #1, puesto previamente a peso constante. La biomasa se coloca en una estufa a 60° C por 48 h, se pesan y se calcula la diferencia en el peso seco.

### **5.2 pH**

Al filtrado se le mide el pH con un potenciómetro Orion modelo 520 A.

### **5.3 ACTIVIDAD LIPOLÍTICA**

Se colocan los tubos para el ensayo en un baño a temperatura constante de 37°C y con agitación. Se emplea un método potenciométrico, en el cual se detecta la disminución en el valor de pH de una emulsión de tributirina por la liberación de ácidos grasos debida a la hidrólisis enzimática (Unidades Internacionales –UI). Los resultados así obtenidos se comparan contra una curva patrón de ácido butírico al 0.5% y se obtienen valores de actividad en micromoles de ácido butírico liberados por minuto con un mililitro de enzima (Menassa 1982).

### **5.4 ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA**

- En tubos de ensayo se ponen 1 ml de muestra y 2 ml de caseína al 2% en amortiguador de fosfatos a pH 7.0.
- Se incuba durante 30 minutos a 37°C, en agitación constante.
- Se centrifugan las muestras a 8,000 rpm durante 10 minutos.
- Con el sobrenadante se sigue la técnica modificada de Lowry (Perterson, G.L., 1977). En este caso se compara contra una curva patrón de tirosina (100mg/ml).

- La actividad proteolítica se reporta como miligramos de tirosina liberados por mililitro por tiempo (mg/ml t).

## 5.5 AZUCARES RESIDUALES

### Glucosa:

Se cuantifica con el método de DNS (ácido dinitrosalicílico, Kodak) (Summer y Howell, 1935), que consiste en:

- En un tubo de ensaye se coloca 1 ml del filtrado y se agrega 1ml de DNS. Se agita en vortex.
- Los tubos se calientan en baño maría durante 5 minutos. Se dejan enfriar y se agregan 10 ml de agua destilada.
- Se dejan reposar por un período de 30 minutos y finalmente se leen en el espectrofotómetro (Espectronic 21D) a una  $\lambda = 540$  nm. Se prepara un blanco de la misma forma pero con agua destilada.
- Se compara contra una curva patrón de glucosa 2mg/ml.

### Almidón y Dextrinas:

Se utiliza el método de fenol sulfúrico (Dubois 1956), que consiste en:

- A 1 ml del filtrado se le agrega 1 ml de fenol al 5% (v/v) y 5 ml de ácido sulfúrico concentrado, agitando vigorosamente.
- Se dejan reposar por un período de 20 minutos a temperatura ambiente. Se leen en un espectrofotómetro (Spectronic 21D) a una  $\lambda = 490$  nm.
- Se compara contra una curva patrón del azúcar correspondiente, 2mg/ml.

## 5.6 PROTEÍNA EXTRACELULAR

La proteína extracelular se determina por el método modificado de Lowry-SDS (Peterson, 1977).

- Se prepara una curva patrón con albúmina sérica de bovino (Sigma).
  - A 1 ml de muestra problema con agitación constante en vortex se agrega 1 ml de la solución A y se deja reposar a temperatura ambiente por 10 minutos.
  - Se agrega 0.5 ml de solución B con *agitación continua en vortex* y se deja desarrollar la reacción por 30 minutos.
  - Después de los 30 minutos se lee en espectrofotómetro (Spectronic 21D) a una  $\lambda=750$  nm.
- Es importante notar que la reacción es estable durante 120 minutos después de iniciada.

### Reactivos

i) Solución de CTC (carbonato de sodio, tartrato de potasio y sulfato de cobre pentahidratado).

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>                      10%

CuSO<sub>4</sub>                        0.1%

Tartrato de potasio        02%

ii) Solución SDS al 10%.

iii) Solución de NaOH 0.8 N

**REACTIVO A:** Se mezclan volúmenes iguales de las siguientes soluciones manteniendo el orden: CTC, NaOH y SDS. Se prepara momentos antes de comenzar la determinación.

**REACTIVO B:** Reactivo Folin. Hacer dilución 1:6 y se prepara momentos antes de comenzar la determinación.

## **6. MODIFICACIÓN DE CREMA**

Para modificar la crema se utiliza como muestra media crema Nestlé de la siguiente manera:

A 50 g de crema se le agrega 1 ml de una solución enzimática (lipasa) de 25 UI. Se homogeniza (braun multipractic) y se incuba a 29 °C y 150 rpm durante 24 h.

## **7. ACIDEZ TITULABLE**

El porcentaje de acidez se calcula con base en el ácido oleico.

- Se toma 1 g de crema y se disuelve con calor.
- Se agregan 3 gotas de fenolftaleína al 1%.
- Se titula con NaOH 0.1 N.
- Se determina el porcentaje de acidez con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de ácido oleico} = \frac{(\text{ml NaOH gastados}) * (0.1 \text{ miliequivalente de ac. oleico}) * 100}{\text{g de muestra}}$$

## **8. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS GRASOS LIBRES (AGL)**

- Se mezcla 1 gramo de muestra (crema) con dietileter-hexano (1:1), 01 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2N). Se agregan 0.5 g de sulfato de sodio anhidro y se centrifuga para aclarar la muestra durante 5 minutos a 10,000 rpm (Centrifuga J2-MC Beckman).
- El sobrenadante se agrega en una columna de 10 mm de diámetro interno, que contiene alúmina neutra e inactiva con 4% de agua. Se pasa a través de columna a razón de 3ml/min.

- Se remueven los acilglicéridos residuales de la columna con lavados de hexano-dimetileter (1:1). Se seca la columna al vacío.
- Para separar los AGL adsorbidos en la columna se añade 1 ml de una solución de ácido fórmico al 6% en éter disopropílico. Se centrifuga a 2,000 rpm durante 5 minutos y se toma el sobrenadante para la metilación.

## **9. METILACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS LIBRES**

- Se toma una muestra de 0.5 ml y se le agregan 3ml de éter etílico y 3 ml de metóxido de sodio.
- Se calienta en agua en ebullición durante 30 segundos.
- Se enfría de inmediato en un baño de hielo.
- Se adicionan 5 ml de salmuera.

Se agita y una vez separadas las fases se toma una alícuota de 3-5 $\mu$ l de la fase orgánica.

## **10. CROMATOGRAFÍA DE GASES**

- Se inyectan de 3-5 $\mu$ l de alícuota de fase orgánica después de la metilación a un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 6890 Plus Gas Chromatograph System.
- Se usa una columna no polar compuesta por: 5% fenil-95% metilpolisiloxano.
- El gradiente de temperatura que se utiliza es  $T_i= 50^{\circ}\text{C}$  y hasta una  $T_f=250^{\circ}\text{C}$ .

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. Caracterización de las cepas silvestre y mutantes (M1 y M2) de *Rhizopus delemar*.

El trabajo con cepas mutantes incluye el riesgo de la inestabilidad de las mismas, pues los organismos cuentan con mecanismos de reparación de los daños a DNA. Por ello, fue muy importante evaluar el estado de las cepas mutantes (M1 y M2) que habían sido almacenadas desde su tratamiento en 1994. Se determinó la actividad lipolítica y producción de enzima de las cepas mutantes (M1 y M2) de *Rhizopus delemar*, usando glucosa al 1% y 4 % así como aceite de olivo como inductor (2%). Los resultados indicaron que únicamente la cepa M2 resultó útil para el objetivo del estudio, pues el comportamiento de la cepa M1 no correspondió a la descripción original señalada por Peralta (1994). La actividad lipolítica de la cepa M1 a las 96h, punto en el que fue determinada la actividad lipolítica para la selección de mutantes por Peralta, fue muy baja por ello se concluyó que la cepa perdió su característica de hiperproducción. La actividad lipolítica obtenida con la cepa M1 cuando crece en un medio con glucosa 4% es más baja que la de la cepa M2 (Tabla 1.), lo que sugirió que la cepa M1 también perdió la característica de insensibilidad a glucosa.

**TABLA 1. COMPARACIÓN DE ACTIVIDAD LIPOLÍTICA DE LAS CEPAS M1 Y M2 DE *Rhizopus delemar*.**

Cepa Mutante M1			Cepa Mutante M2		
Tiempo	Actividad Lipolítica Específica (UI/g de biomasa)		Tiempo	Actividad Lipolítica Específica (UI/g de biomasa)	
h	Glucosa 1%	Glucosa 4%	h	Glucosa 1%	Glucosa 4%
0	0	0	0	0	0
24	2.32 ± 0.53	1.03 ± 0.67	24	9.16 ± 0.97	5.07 ± 0.43
48	0.94 ± 0.12	0.54 ± 0.39	48	3.13 ± 0.44	0.68 ± 0.76
72	1.07 ± 0.34	0.49 ± 0.26	72	7.48 ± 1.01	0.63 ± 0.33
96	0.76 ± 0.45	0.67 ± 0.28	96	2.17 ± 0.93	1.03 ± 0.52



La actividad lipolítica específica (UI/g biomasa) de la cepa mutante M2 a una concentración de glucosa de 1% y a las 96h de fermentación fue significativamente mayor (5.7 veces) que la obtenida para la cepa silvestre de *Rhizopus delemar*. Esto indica que la cepa M2 conservó su característica de insensibilidad al efecto negativo de la glucosa, como lo señaló Peralta en 1994. Además, a una concentración de 4% de glucosa la actividad lipolítica específica obtenida con la cepa mutante es 2.25 veces mayor que la obtenida con la cepa silvestre de *Rhizopus delemar*, esto sugirió que la cepa mutante también conservó las características de hiperproducción. Por éstas razones la cepa M2 de *Rhizopus delemar* se utilizó para la continuación de éste trabajo experimental.

## **2. Cinéticas de Actividad Lipolítica**

### **2.1 Comportamiento cinético de las cepas Silvestre y Mutante de *Rhizopus delemar* con glucosa como fuente de carbono al 1% y al 4% y aceite de olivo como inductor (2%).**

Los resultados reportados por Peralta refieren valores de actividad lipolítica obtenidos a un tiempo fijo (96h). Por tanto en este trabajo se consideró importante evaluar el comportamiento de la producción de enzima a través del tiempo (24, 48, 72 y 96h). En las gráficas 1 y 2, se presentan las cinéticas de actividad lipolítica específica obtenidas por la cepa silvestre con glucosa como fuente de carbono al 1% y 4%. Se usaron estas concentraciones por ser puntos extremos, es decir, que a una concentración de 4% de glucosa prácticamente no hay producción de lipasa y el nivel de actividad es bajo (muy cercano a cero) y constante (Gráfica 2), mientras que usando 1% de glucosa dicho fenómeno no se presenta (Gráfica 1). Por otro lado, se observa que el máximo de actividad lipolítica para la cepa silvestre es a las 72h de fermentación a una concentración de 1% de glucosa.

Al observar las cinéticas de la cepa mutante con glucosa al 1% y al 4% resaltan diferencias importantes con respecto a la cepa silvestre (Gráficas 3 y 4) que llevaron a considerarla como una mejor opción para la producción a mayor escala de las lipasas para su aplicación en diversas áreas.

Entre las principales diferencias entre ambas cepas destacan:

i) en la cepa mutante el máximo de actividad se presenta a las 24h de fermentación para ambas concentraciones de glucosa, en contraste con la cepa silvestre, que presentó los máximos de actividad lipolítica específica (UI/g biomasa) a las 72h de fermentación.

ii) a una concentración de 4% de glucosa el fenómeno de represión no se presenta en la cepa mutante, lo que sugirió que la cepa conservó la característica de insensibilidad al efecto negativo por glucosa. Como se mencionó anteriormente la actividad lipolítica específica de la cepa mutante usando 4% de glucosa es 5.7 veces mayor que la cepa silvestre de *Rhizopus delemar* a las 96h de fermentación y 4.23 veces a las 24h de fermentación.

iii) la actividad lipolítica específica es mayor en la cepa mutante que en la cepa silvestre usando la misma concentración de sustrato (1% glucosa) y tomando los máximos de actividad de cada cepa (24 y 72 h, respectivamente). Además, como se mencionó anteriormente a las 96h de fermentación la actividad lipolítica específica obtenida con la cepa mutante es 2.25 veces mayor que la obtenida con la cepa silvestre de *Rhizopus delemar*. Esto sugiere que la cepa mutante también conservó su característica de hiperproducción.

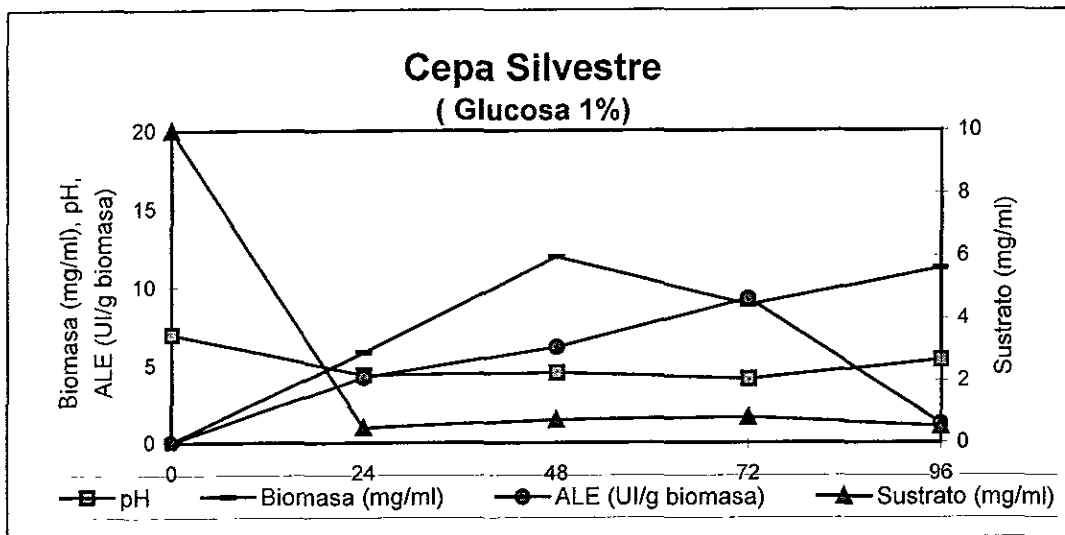
**TABLA 2. COMPARACIÓN DE ACTIVIDAD LIPOLÍTICA ENTRE LA CEPA SILVESTRE Y LA CEPA MUTANTE M2 USANDO 1% DE GLUCOSA.**

Cepa Silvestre (S)				Cepa Mutante (M2)			
Tiempo h	Actividad Lipolítica (UI/ml)	Biomasa (g)	Actividad Lipolítica Específica (UI/g de biomasa)	Tiempo h	Actividad Lipolítica (UI/ml)	Biomasa (g)	Actividad Lipolítica Específica (UI/g de biomasa)
0	0	0	0	0	0	0	0
24	1.237 ± 0.23	0.1755 ± 0.02	4.23 ± 0.72	24	3.18 ± 0.64	0.3468 ± 0.04	9.16 ± 0.97
48	3.69 ± 0.54	0.2565 ± 0.07	6.18 ± 0.56	48	1.67 ± 0.49	0.5331 ± 0.06	3.13 ± 0.44
72	4.12 ± 0.69	0.2815 ± 0.03	9.28 ± 0.62	72	4.18 ± 0.84	0.5595 ± 0.06	7.48 ± 1.01
96	0.381 ± 0.41	0.3129 ± 0.05	1.22 ± 0.59	96	1.09 ± 0.62	0.5039 ± 0.13	2.17 ± 0.93

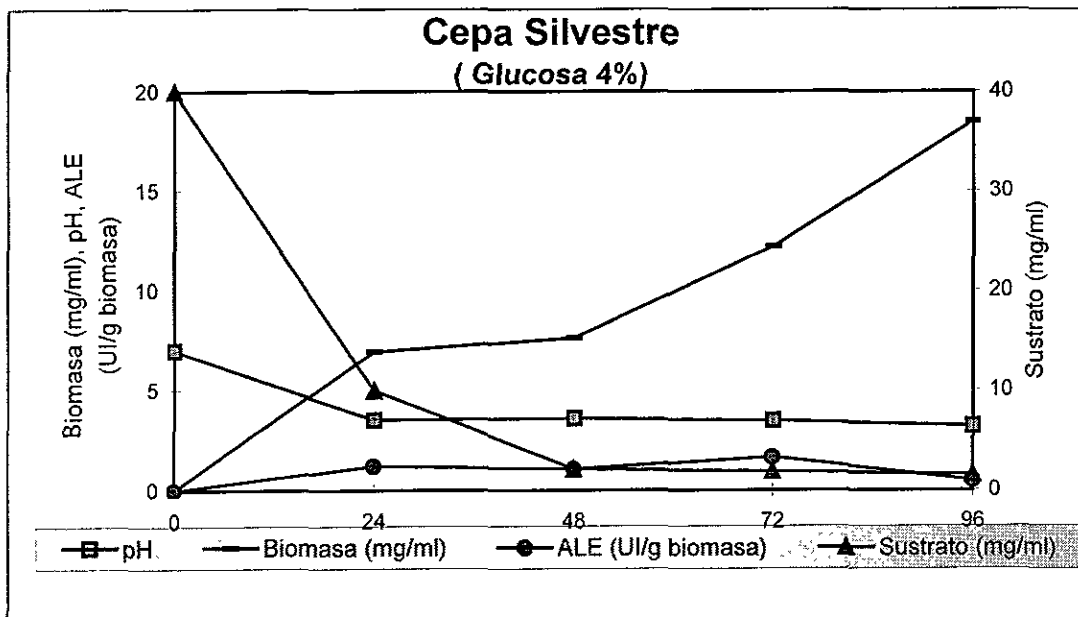
**TABLA 3. COMPARACIÓN DE ACTIVIDAD LIPOLÍTICA ENTRE LA CEPA SILVESTRE Y LA CEPA MUTANTE M2 USANDO 4% DE GLUCOSA.**

Cepa Silvestre (S)				Cepa Mutante (M2)			
Tiempo gh	Actividad Lipolítica (UI/ml)	Biomasa (g)	Actividad Lipolítica Específica (UI/g de biomasa)	Tiempo h	Actividad Lipolítica (UI/ml)	Biomasa (g)	Actividad Lipolítica Específica (UI/g de biomasa)
0	0	0	0	0	0	0	0
24	0.437 ± 0.23	0.3646 ± 0.04	1.2 ± 0.64	24	1.857 ± 0.56	0.3663 ± 0.03	5.07 ± 0.43
48	0.402 ± 0.39	0.3800 ± 0.06	1.06 ± 0.49	48	0.513 ± 0.31	0.7479 ± 0.05	0.68 ± 0.76
72	1.006 ± 0.31	0.6103 ± 0.03	1.65 ± 0.56	72	0.510 ± 0.44	0.8041 ± 0.07	0.63 ± 0.33
96	0.456 ± 0.43	0.9251 ± 0.02	0.49 ± 0.84	96	0.833 ± 0.29	0.8089 ± 0.02	1.03 ± 0.52

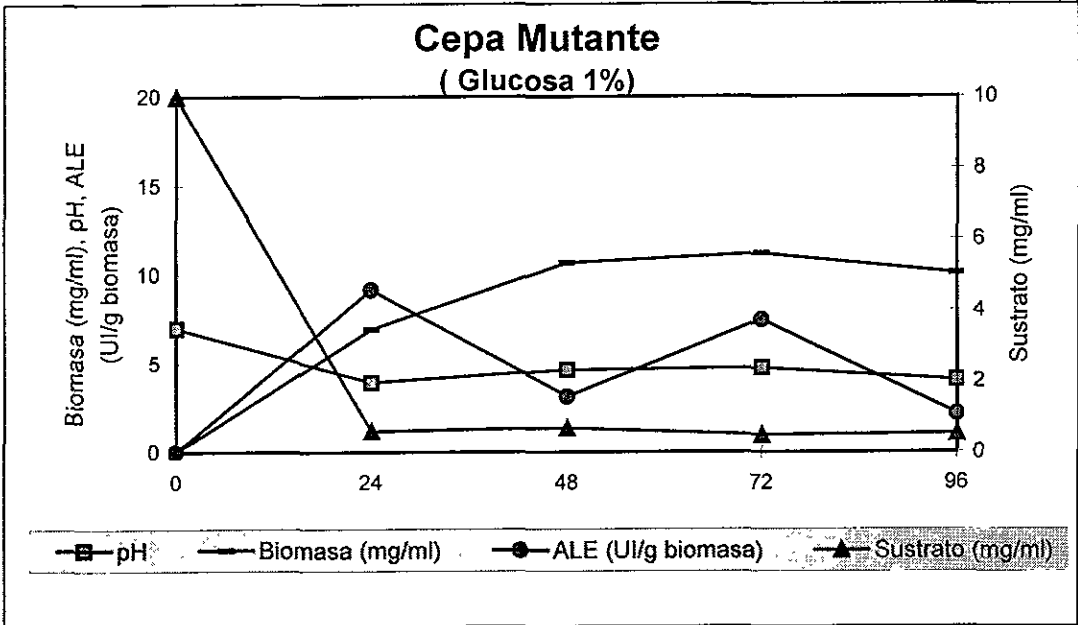
**GRAFICA 1. CINÉTICA DE ACTIVIDAD LIPOLÍTICA ESPECÍFICA. CEPA SILVESTRE USANDO COMO SUSTRATO 1% DE GLUCOSA**



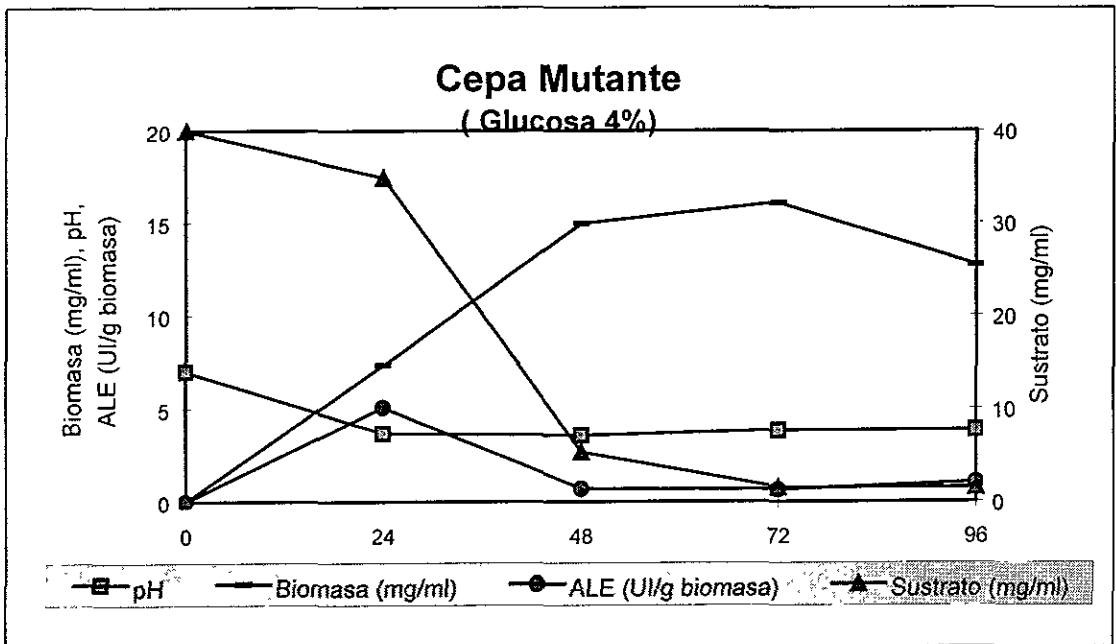
**GRAFICA 2. CINÉTICA DE ACTIVIDAD LIPOLÍTICA ESPECÍFICA. CEPA SILVESTRE USANDO COMO SUSTRATO 4% DE GLUCOSA**



**GRAFICA 3. CINÉTICA DE ACTIVIDAD LIPOLÍTICA ESPECÍFICA. CEPA MUTANTE USANDO COMO SUSTRATO 1% DE GLUCOSA**



**GRAFICA 4. CINÉTICA DE ACTIVIDAD LIPOLÍTICA ESPECÍFICA. CEPA MUTANTE USANDO COMO SUSTRATO 4% DE GLUCOSA**



**2.2. Cinéticas obtenidas de las cepas Silvestre y Mutante de *Rhizopus delemar* con almidón como fuente de carbono al 1% y al 4% y aceite de olivo como inductor (2%).**

A diferencia de lo que ocurrió con la glucosa como fuente de carbono (1% y 4%), usando almidón como fuente de carbono la cepa silvestre presentó los máximos de actividad lipolítica a las 24h. Mientras que la cepa mutante de *Rhizopus delemar* presentó los máximos de actividad lipolítica a las 24h de fermentación similar a la tendencia observada cuando se usó glucosa como fuente de carbono. Los máximos de actividad para ambas cepas se presentan justamente cuando hay en el medio las más altas concentraciones de almidón y un pH más alcalino ( $\approx 6.20$ ) comparado contra el pH de las fermentaciones con glucosa como fuente de carbono que es más ácido ( $\approx 3.70$ ). Se sabe por experimentos anteriores que en la producción de lipasa por *Rhizopus delemar* hay un incremento en la actividad de 2.5 veces cuando el pH es controlado durante la fermentación contra aquellas en las que sólo se ajusta el pH al inicio (Martínez y Farrés, 1993). Después de las 24h donde se presenta la mayor actividad lipolítica, la biomasa incrementa de manera significativa mientras que la actividad lipolítica disminuye, lo que sugiere que después de 24 h el microorganismo usa la fuente de carbono para crecer, mas que para la producción de lipasas.

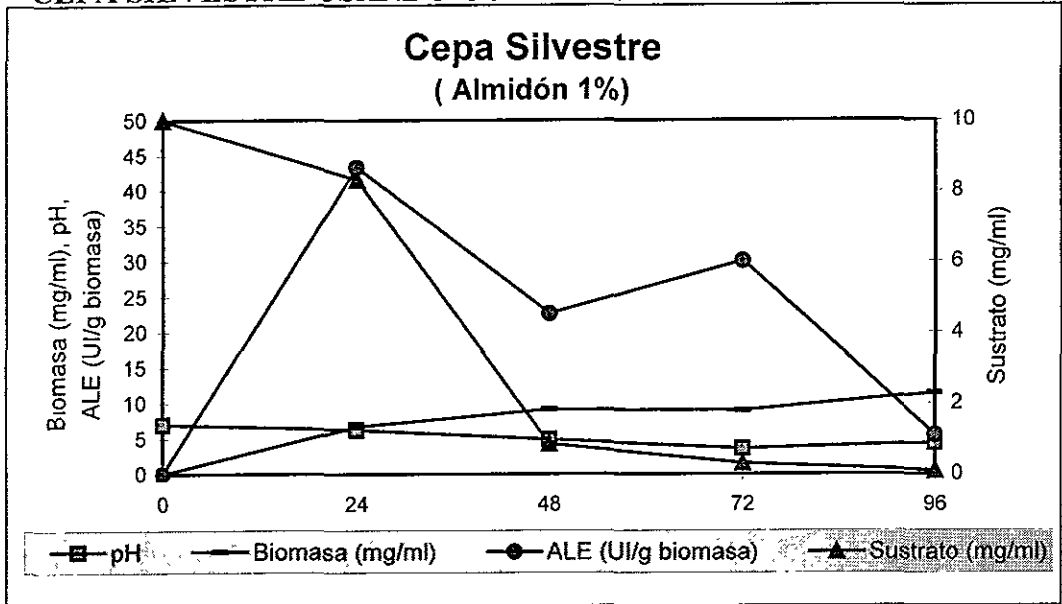
Cuando se usa almidón como fuente de carbono la cepa mutante no se comporta como cepa hiperproductora de lipasa en contraste a lo que sucede con la glucosa al 1% y 4% (Gráfica5.). Esto sugiere que el circuito de regulación es más complejo de lo pensado en *Rhizopus delemar*. Para ambas cepas los máximos de actividad lipolítica fueron mayores

cuando se utilizó como fuente de carbono un azúcar complejo (almidón) que cuando se utilizó un azúcar simple (glucosa) al 1% y al 4%.

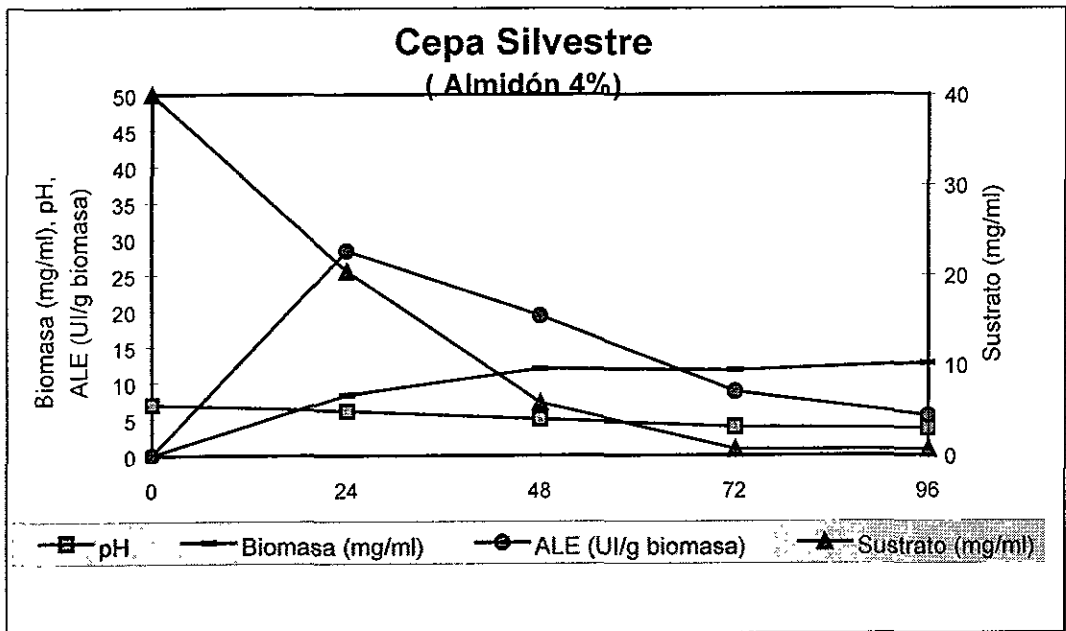
Se observa claramente que a una concentración de 4% de almidón los niveles de actividad lipolítica específica obtenidos con la cepa silvestre son mucho mayores que los niveles de actividad lipolítica específica con glucosa al 4%, es decir el fenómeno de represión por fuente de carbono no se presentó con almidón (Tabla 4.). Al ser el almidón un azúcar complejo, la glucosa no se encuentra libre en el medio de cultivo, si no que se va liberando poco a poco y por ello no alcanza la concentración necesaria (4%) para reprimir la síntesis de la lipasa. Esto va en línea con lo reportado por Kawasaki (1991), donde la autora sugiere que la glucosa *per se* provoca un efecto negativo (represión) en la producción de lipasa por *Rhizopus delemar*. Dicho efecto, es generalmente causado por la glucosa, aunque en diferentes organismos puede provocarlo otras fuentes de carbono fácilmente metabolizables (Ronne et al., 1995).



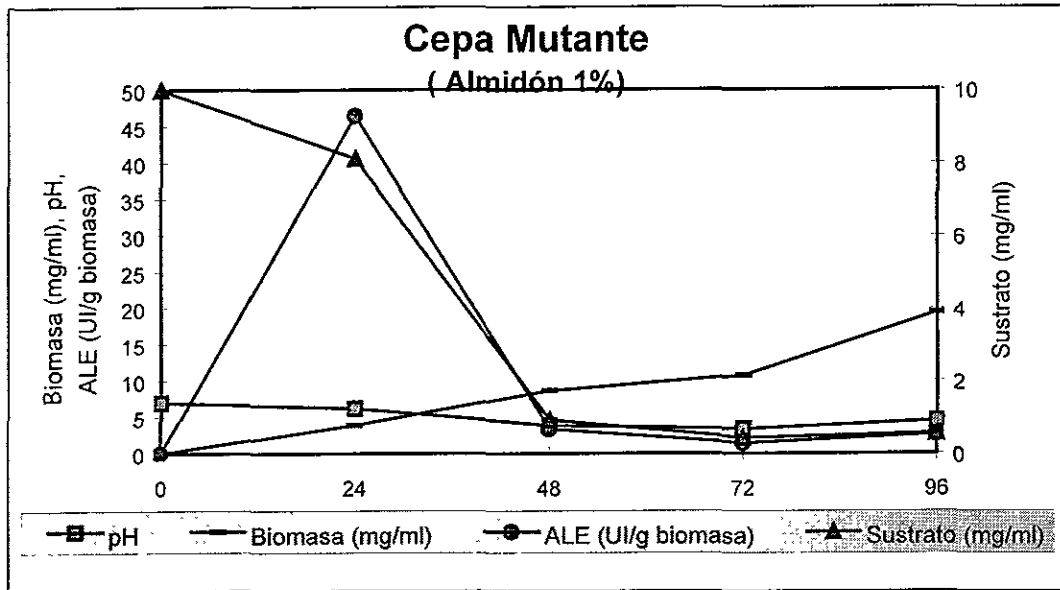
**GRAFICA 5. CINÉTICA DE ACTIVIDAD LIPOLÍTICA ESPECÍFICA. CEPA SILVESTRE USANDO COMO SUSTRATO 1% DE ALMIDÓN.**



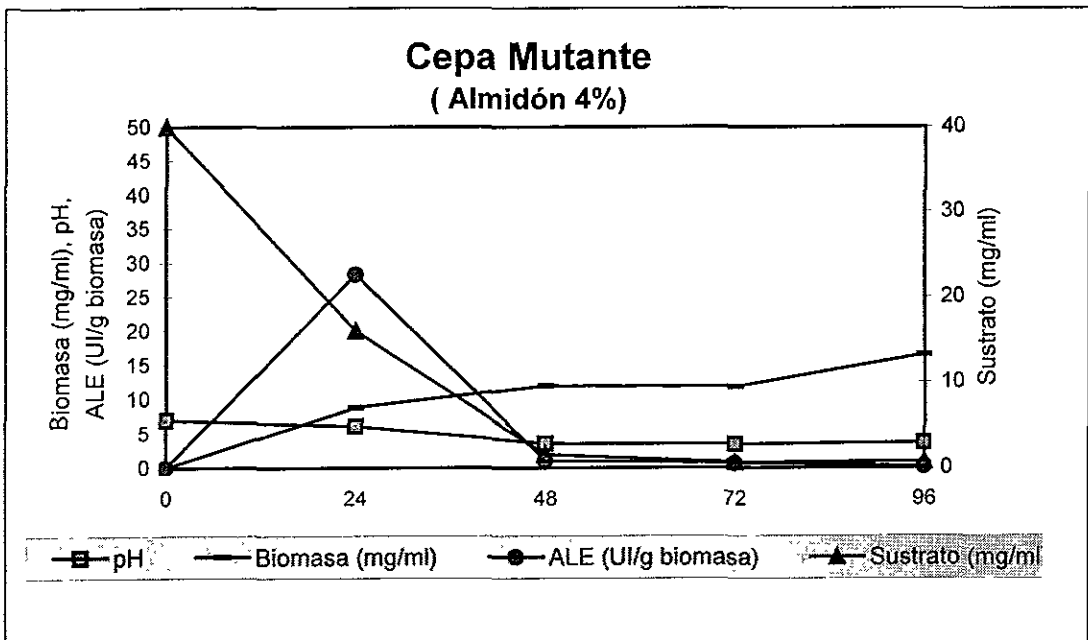
**GRAFICA 6. CINÉTICA DE ACTIVIDAD LIPOLÍTICA ESPECÍFICA. CEPA SILVESTRE USANDO COMO SUSTRATO 4% DE ALMIDÓN.**



**GRAFICA 7. CINÉTICA DE ACTIVIDAD LIPOLÍTICA ESPECÍFICA. CEPA MUTANTE USANDO COMO SUSTRATO 1% DE ALMIDÓN.**



**GRAFICA 8. CINÉTICA DE ACTIVIDAD LIPOLÍTICA ESPECÍFICA. CEPA MUTANTE USANDO COMO SUSTRATO 4% DE ALMIDÓN.**



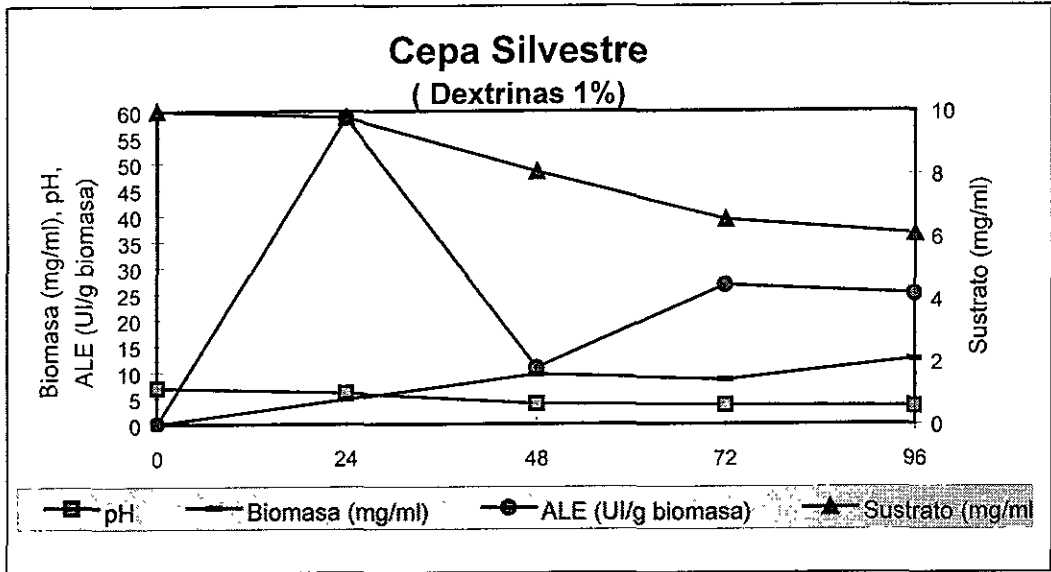
### **2.3. Comportamiento cinético de las cepas Silvestre y Mutante de *Rhizopus delemar* con dextrinas como fuente de carbono al 1% y al 4% y aceite de olivo como inductor.**

El comportamiento con dextrinas como fuente de carbono al 1% y al 4% es similar en ambas cepas (Gráficas 9, 10, 11 y 12). Se encontraron los máximos de producción a las 24h, igual que con el almidón, sin embargo la actividad lipolítica es mayor cuando se usa dextrinas como fuente de carbono que almidón. Una explicación a esto es que en el medio con dextrinas hay una mayor cantidad de azúcares sencillos solubles que el medio con almidón, lo que permite que el hongo arranque la producción de lipasa más rápido que cuando se usa almidón. Además, esto podría sugerir que durante las primeras 24h el organismo sintetiza lipasas para utilizar el aceite de olivo (inductor) como fuente de carbono mientras sintetiza enzimas *de novo* para hidrolizar estos dos polisacáridos. Esto no se puede asegurar ya que tendríamos que cuantificar el aceite de olivo residual al finalizar la fermentación para saber exactamente en qué medida lo usa como fuente de carbono.

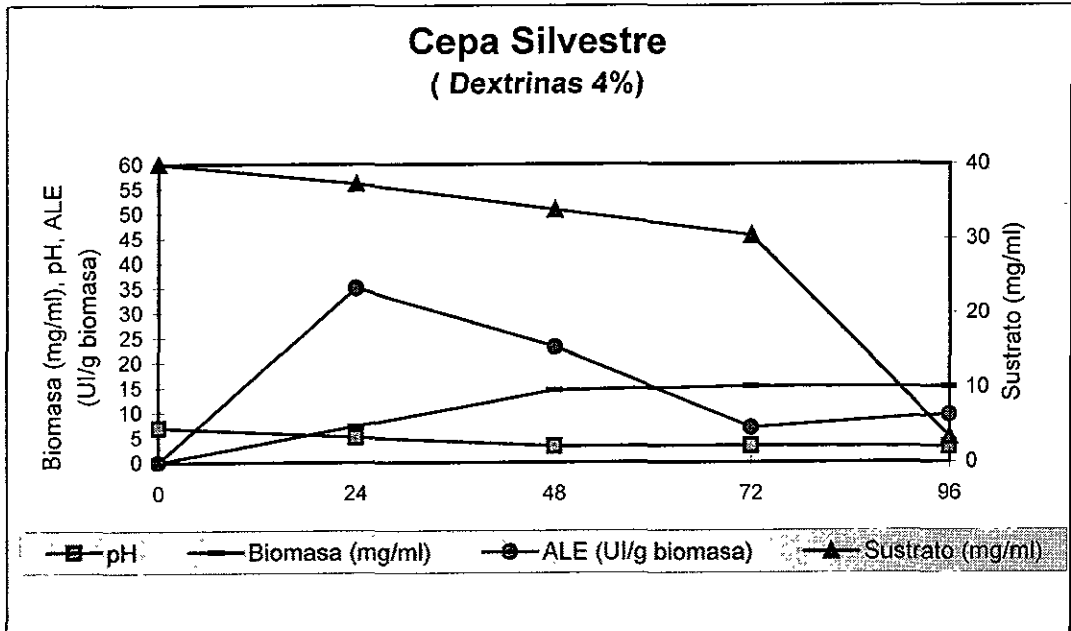
Al igual que con el almidón después de las 24h, donde se presenta la mayor actividad lipolítica, la biomasa incrementa de manera significativa mientras que la actividad lipolítica disminuye, lo que sugiere que después de 24 h el microorganismo usa la fuente de carbono para crecer más que para la producción de lipasas.

Con las dextrinas al 4% como fuente de carbono tampoco se presenta el fenómeno de represión en ninguna de las dos cepas. Tampoco se presentan características de hiperproducción en la cepa mutante de *Rhizopus delemar*, contrario a lo que sucede cuando se usó glucosa como fuente de carbono.

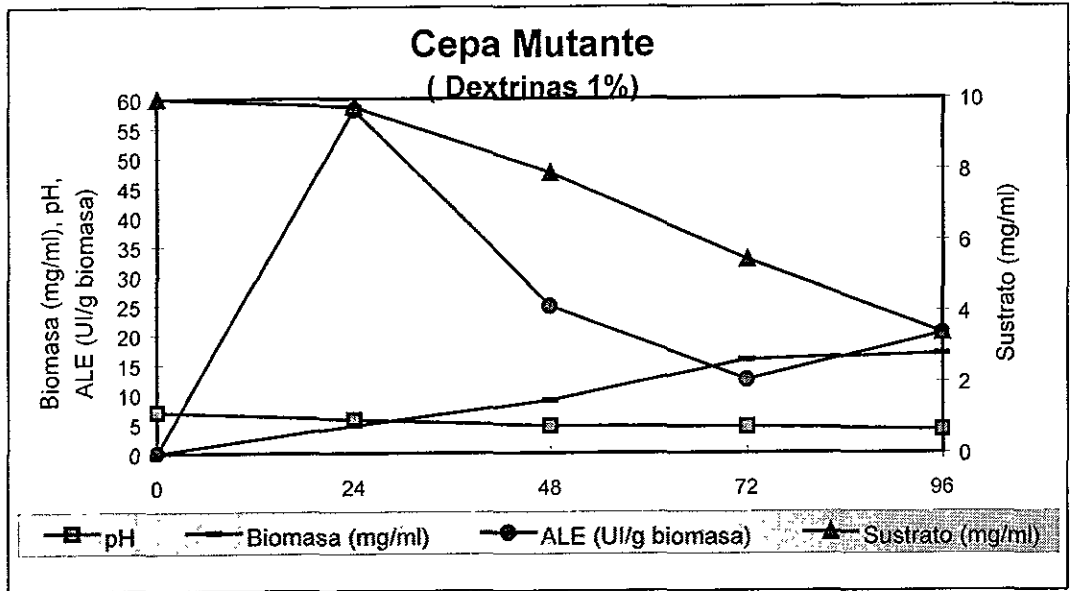
**GRAFICA 9. CINÉTICA DE ACTIVIDAD LIPOLÍTICA ESPECÍFICA. CEPA SILVESTRE USANDO COMO SUSTRATO 1% DE DEXTRINAS.**



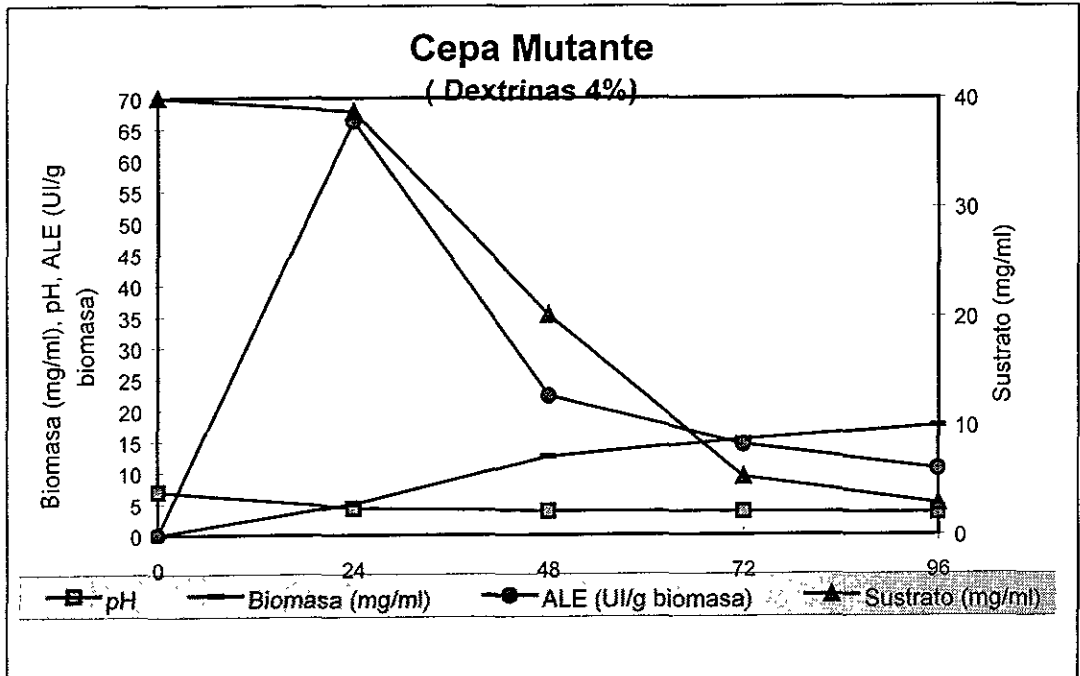
**GRAFICA 10. CINÉTICA DE ACTIVIDAD LIPOLÍTICA ESPECÍFICA. CEPA SILVESTRE USANDO COMO SUSTRATO 4% DE DEXTRINAS.**



**GRAFICA 11. CINÉTICA DE ACTIVIDAD LIPOLÍTICA ESPECÍFICA. CEPA MUTANTE USANDO COMO SUSTRATO 1% DE DEXTRINAS.**



**GRAFICA 12. CINÉTICA DE ACTIVIDAD LIPOLÍTICA ESPECÍFICA. CEPA MUTANTE USANDO COMO SUSTRATO 4% DE DEXTRINAS.**



El pH es un factor que juega un papel muy importante y está directamente relacionado con la actividad de una enzima. Usando almidón y dextrinas como sustrato el pH de la fermentación es más alcalino que con glucosa (Tablas 4 y 5.). Esto también afecta a la actividad lipolítica ya que se sabe que la mayoría de las lipasas de origen microbiano tienen su máxima actividad en un rango de pH 5.6-8.7 y específicamente la lipasa de *Rhizopus delemar* presenta su máxima actividad a un pH de 8.

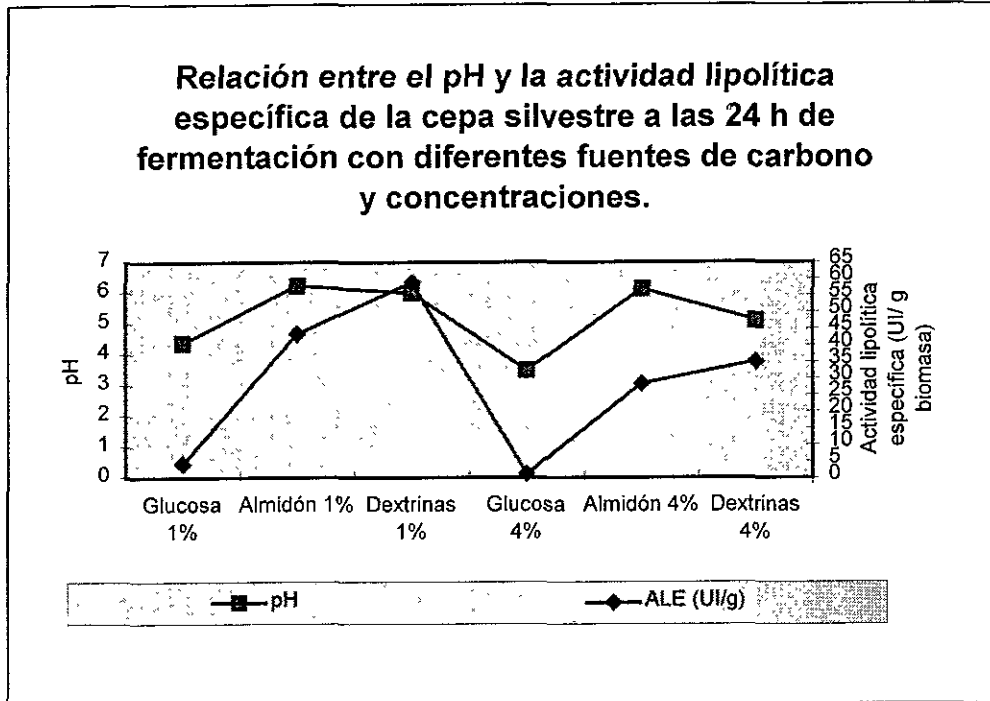
**TABLA 4. COMPARACIÓN DE pH Y LA ACTIVIDAD LIPOLÍTICA ESPECÍFICA DE LA CEPA SILVESTRE A LAS 24 h DE FERMENTACIÓN.**

Cepa Silvestre Diferentes fuentes de carbono 1%			Cepa Silvestre Diferentes fuentes de carbono 4%		
	<i>PH</i>	<i>ALE (UI/g)</i>		<i>pH</i>	<i>ALE (UI/g)</i>
<i>Glucosa 1%</i>	4.38 ± 0.11	4.23 ± 0.72	<i>Glucosa 4%</i>	3.5 ± 0.05	1.2 ± 0.64
<i>Almidón 1%</i>	6.23 ± 0.06	43.35 ± 1.34	<i>Almidón 4%</i>	6.13 ± 0.3	28.37 ± 1.06
<i>Dextrinas 1%</i>	5.99 ± 0.6	58.79 ± 1.53	<i>Dextrinas 4%</i>	5.10 ± 0.1	35.08 ± 0.97

**TABLA 5. COMPARACIÓN DE pH Y LA ACTIVIDAD LIPOLÍTICA ESPECÍFICA DE LA CEPA MUTANTE A LAS 24 h DE FERMENTACIÓN.**

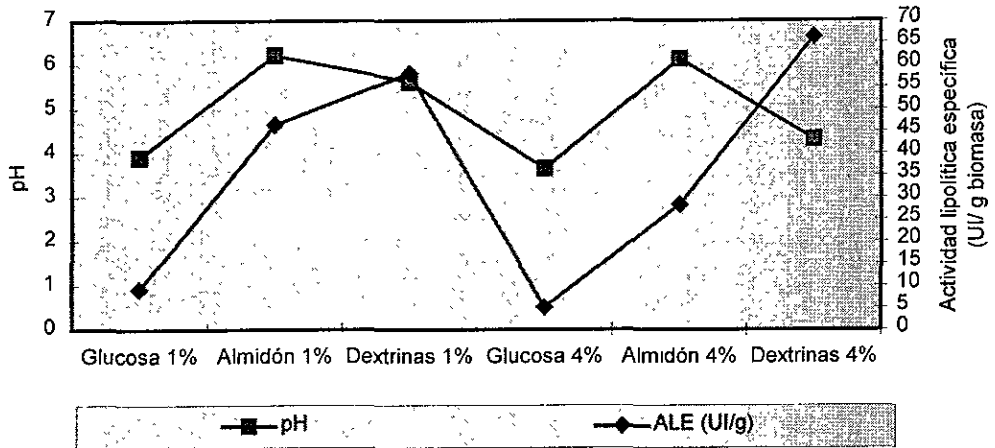
Cepa Mutante Diferentes fuentes de carbono 1%			Cepa Mutante Diferentes fuentes de carbono 4%		
	<i>PH</i>	<i>ALE (UI/g)</i>		<i>pH</i>	<i>ALE (UI/g)</i>
<i>Glucosa 1%</i>	3.92 ± 0.05	9.16 ± 0.97	<i>Glucosa 4%</i>	3.66 ± 0.21	5.07 ± 0.43
<i>Almidón 1%</i>	6.22 ± 0.1	46.49 ± 0.76	<i>Almidón 4%</i>	6.13 ± 0.07	28.32 ± 0.56
<i>Dextrinas 1%</i>	5.62 ± 0.02	58.13 ± 0.2	<i>Dextrinas 4%</i>	4.32 ± 0.03	66.29 ± 0.9

**GRAFICA 13. COMPARACIÓN DE pH Y LA ACTIVIDAD LIPOLÍTICA ESPECÍFICA DE LA CEPA SILVESTRE A LAS 24 H DE FERMENTACIÓN.**



**GRAFICA 14. COMPARACIÓN DE pH Y LA ACTIVIDAD LIPOLÍTICA ESPECÍFICA DE LA CEPA MUTANTE A LAS 24 H DE FERMENTACIÓN.**

**Relación entre el pH y la actividad lipolítica específica de la cepa mutante a las 24 h de fermentación con diferentes fuentes de carbono y concentraciones.**





**2.4. Comparación de productividad (UI/ml/h) y rendimiento (Y=UI/g) de las cepas silvestre y mutante de *Rhizopus delemar* con diferentes fuentes de carbono y diferentes concentraciones.**

Cuando se produce una enzima extracelular a nivel industrial es importante tomar en cuenta la productividad (UI/ml/h) y el rendimiento (UI/g de sustrato), ya que los costos dependen directamente de los tiempos de fermentación, del costo del sustrato que se usará y de la concentración de dicho sustrato. Como se observa en las tablas 6 y 7 las dextrinas fueron la fuente de carbono donde se obtuvo la mayor productividad UI/ml/h comparando las actividades máximas y los tiempos de fermentación para los tres sustratos. Específicamente, la mayor productividad es para la cepa mutante con una concentración de 4% de dextrinas (0.685UI/ml/h). Sin embargo, los mayores rendimientos se obtuvieron con dextrinas al 1% tanto para la cepa silvestre como para la cepa mutante de *Rhizopus delemar*. Usar dextrinas a nivel industrial podría resultar interesante en términos económicos ya que es una fuente de carbono más barata que el almidón o la glucosa. Aunque la desventaja es que las dextrinas presentan gran variabilidad en cuanto a calidad y grado de hidrólisis. Las dextrinas son producto de la hidrólisis parcial de la amilopectina, al hidrolizar las dextrinas se obtienen como productos los disacáridos maltosa e isomaltosa y finalmente al hidrolizarse estos se obtiene la glucosa. Por todo esto, la fuente de carbono sugerida para el uso industrial son las dextrinas y la concentración es 1% ya que se obtuvieron los más altos rendimientos y productividades. La concentración sería 1% porque la diferencia entre 1% y 4% no amerita el incremento en costo de la fuente de carbono (4 veces).

**TABLA 6. COMPARACIÓN DE PRODUCTIVIDAD PARA LA PRODUCCIÓN DE LIPASAS DE LAS CEPAS SILVESTRE Y MUTANTE DE *Rhizopus delemar* USANDO GLUCOSA, ALMIDÓN Y DEXTRINAS COMO FUENTE DE CARBONO EN LOS MÁXIMOS DE ACTIVIDAD LIPOLÍTICA.**

Cepa Silvestre			
Diferentes fuentes de carbono 1% y 4%			
	Productividad (UI/ml/h)		Productividad (UI/ml/h)
<i>Glucosa 1%</i>	0.057 (72h)	<i>Glucosa 4%</i>	0.014 (72h)
<i>Almidón 1%</i>	0.604 (24h)	<i>Almidón 4%</i>	0.569 (24h)
<i>Dextrinas 1%</i>	0.583 (24h)	<i>Dextrinas 4%</i>	0.533 (24h)
Cepa Mutante			
Diferentes fuentes de carbono 1% y 4%			
	Productividad (UI/ml/h)		Productividad (UI/ml/h)
<i>Glucosa 1%</i>	0.044 (24h)	<i>Glucosa 4%</i>	0.026 (24h)
<i>Almidón 1%</i>	0.128 (24h)	<i>Almidón 4%</i>	0.518 (24h)
<i>Dextrinas 1%</i>	0.569 (24h)	<i>Dextrinas 4%</i>	0.685 (24h)

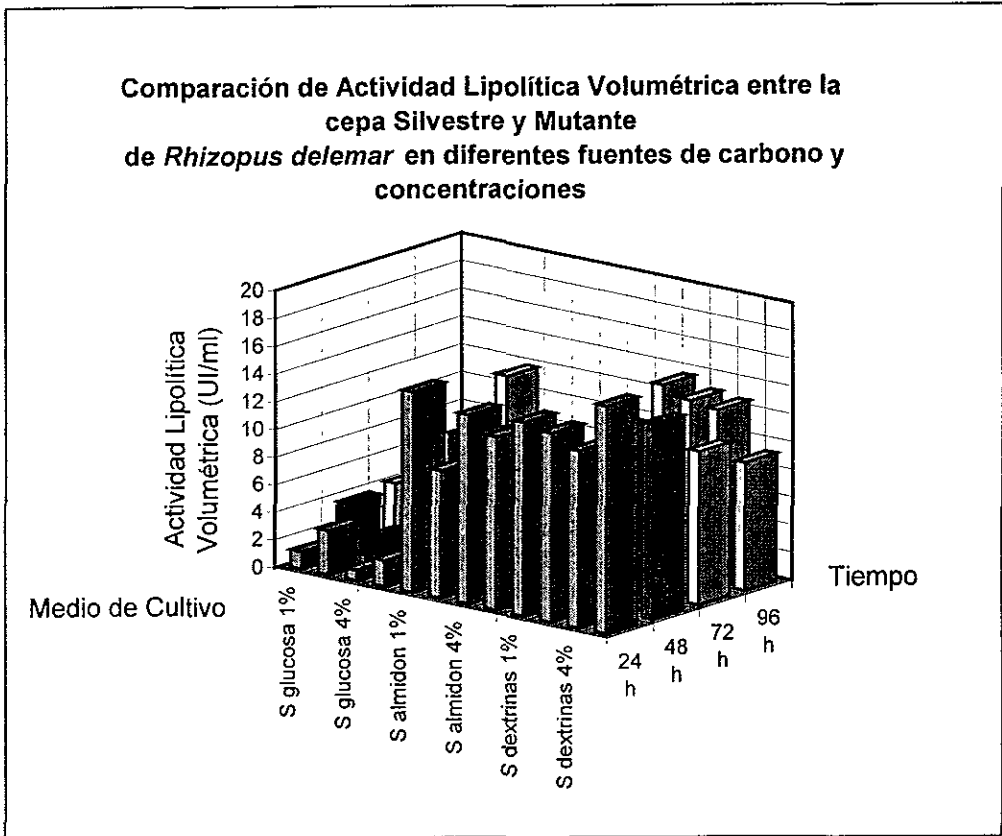
**TABLA 7. COMPARACIÓN DEL RENDIMIENTO DE LAS CEPAS SILVESTRE Y MUTANTE DE *Rhizopus delemar* USANDO GLUCOSA, ALMIDÓN Y DEXTRINAS COMO FUENTE DE CARBONO EN LOS MÁXIMOS DE ACTIVIDAD LIPOLÍTICA.**

Cepa Silvestre			
Diferentes fuentes de carbono 1% y 4%			
	Y (UI/g)		Y (UI/g)
<i>Glucosa 1%</i>	412 (72h)	<i>Glucosa 4%</i>	25.2 (72h)
<i>Almidón 1%</i>	1449 (24h)	<i>Almidón 4%</i>	341.5 (24h)
<i>Dextrinas 1%</i>	1399 (24h)	<i>Dextrinas 4%</i>	319.5 (24h)
Cepa Mutante			
Diferentes fuentes de carbono 1% y 4%			
	Y (UI/g)		Y (UI/g)
<i>Glucosa 1%</i>	318 (24h)	<i>Glucosa 4%</i>	46.5 (24h)
<i>Almidón 1%</i>	921 (24h)	<i>Almidón 4%</i>	311 (24h)
<i>Dextrinas 1%</i>	1365 (24h)	<i>Dextrinas 4%</i>	411 (24h)

Del análisis anterior podemos concluir que:

- La cepa silvestre de *Rhizopus delemar* presentó represión por glucosa usando una concentración de 4%, mientras que la cepa mutante no lo presentó conservando la característica de insensibilidad a glucosa.
- Cuando se usan como fuentes de carbono azúcares complejos como el almidón y las dextrinas al 4%, el fenómeno de represión no se presenta en la cepa silvestre de *Rhizopus delemar*. Esto sugiere que el fenómeno de regulación es más complejo de lo pensado.
- La mejor fuente de carbono para uso a nivel industrial son las dextrinas al 1%, ya que se obtienen el rendimiento y la productividad más alta.

**GRAFICA 15. COMPARACIÓN DE ACTIVIDAD LIPOLÍTICA VOLUMÉTRICA ENTRE LA CEPA SILVESTRE Y MUTANTE DE *Rhizopus delemar* CON DIFERENTES FUENTES DE CARBONO Y CONCENTRACIONES**



### **3. Efecto de AMPc y dibutilil AMPc sobre las cepas Silvestre y Mutante de *Rhizopus delemar* utilizando glucosa al 4% como fuente de carbono.**

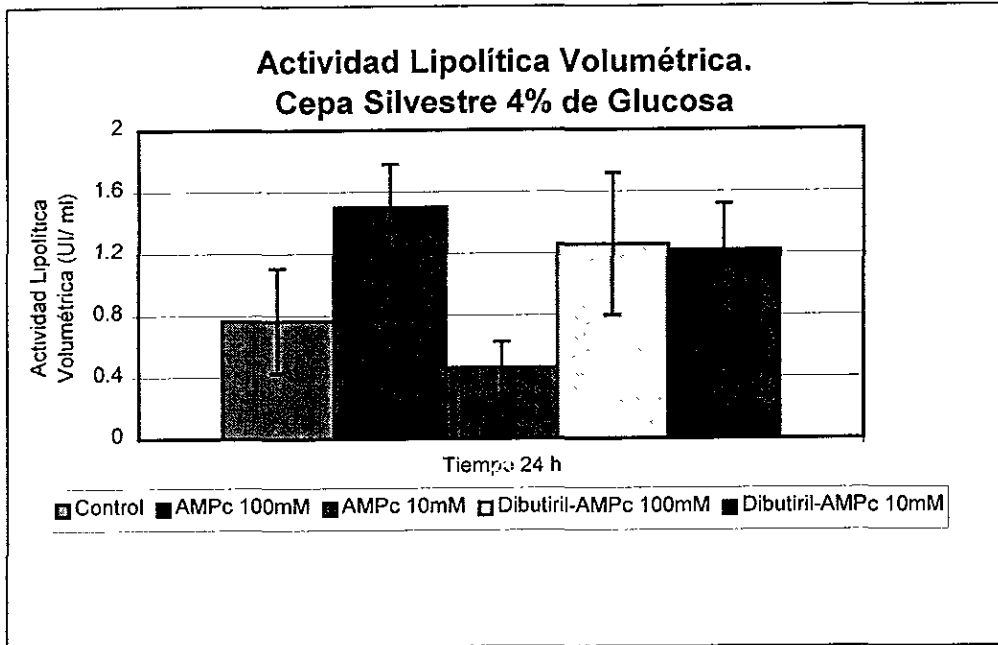
Este trabajo pretende aportar elementos para esclarecer la naturaleza del efecto negativo de la glucosa. Se evaluó si la adición de AMPc y su análogo no natural (dibutilil-AMPc) al medio de cultivo pudiesen revertir el efecto de represión catabólica que presenta la cepa silvestre de *Rhizopus delemar*, cuando crece en un medio con una concentración de 4% de glucosa. El fenómeno de represión catabólica ha sido ampliamente estudiado en bacterias. Se piensa que la represión se desencadena con la fosforilación de la glucosa, lo que genera *disminución en los niveles de AMPc* (monofosfato cíclico de adenosina), que inactiva la CAP (proteína activadora de catabolito). Sin embargo, este fenómeno no ha sido entendido del todo en hongos. Algunos trabajos con levaduras y hongos filamentosos han revelado que el mecanismo de represión en eucariontes es diferente que lo estudiado en bacterias. Genes como *Mig1* en levaduras y *CreA* en hongos desempeñan un papel muy importante mediando este tipo de represión. De hecho en hongos se ha considerado que el AMPc no tiene ningún papel importante en la represión catabólica. Sin embargo, en 1994 Mousumi y Geeta reportaron que para el caso de *Aspergillus sydowii*, un hongo filamentosos que presentaba represión por glucosa para la producción de xilanasas, se pudo revertir el efecto cuando se añadió al medio un análogo sintético de AMPc. Específicamente este efecto fue regulado cuando se añadió al medio una concentración de 100 $\mu$ M de dibutilil-AMPc, que fue hidrolizado dentro de la célula a AMPc. Esto abrió dos preguntas interesantes para el caso de *Rhizopus delemar*, *i*) Si el AMPc y/o su análogo entran a la célula, y *ii*) Si alguno de estos compuestos lograra revertir el efecto de la represión por glucosa. Para evaluar estas hipótesis se probaron dos concentraciones de AMPc y análogo (10 $\mu$ M y 100 $\mu$ M), siguiendo la metodología reportada por Mousumi y Geeta, 1994. Se

tomaron muestras del filtrado de fermentación, con pipetas estériles, cada 24 h y se realizaban las lecturas de actividad lipolítica. En estos experimentos la actividad está reportada como actividad lipolítica volumétrica (UI/ml), ya que la biomasa sólo se cuantificó al parar la fermentación a las 96 h.

Se usó el AMPc y el análogo no natural (dibutiril-AMPc) pensando en que el AMPc no entraría a la célula y que el análogo sí, tal como sucedió en el caso de *Aspergillus sydowii*. Sin embargo los resultados mostraron que ambos reactivos provocaron cambios en la cinética de la actividad lipolítica de la cepa silvestre en medio con glucosa al 4% comparado contra el control. Esto sugirió que tanto el AMPc como el dibutiril-AMPc entraron a la célula. Esto se puede deber a diferencias en la composición de la pared celular de *Aspergillus sydowii* y *Rhizopus delemar*.

Los valores de actividad lipolítica volumétrica obtenidos con la adición AMPc y su análogo son mayores que los valores obtenidos con la cepa control como se presenta en la gráfica 16. El AMPc en concentraciones altas, 100 $\mu$ M, parece tener un efecto positivo en la actividad lipolítica, mientras que a bajas concentraciones, 10 $\mu$ M parece reprimir aún más la actividad de la lipasa. En cambio, con ambas concentraciones de dibutiril-AMPc se observa un efecto positivo en la cinética de actividad. Este experimento no es suficiente para concluir sobre la naturaleza del efecto negativo de glucosa, ya que ninguno de los dos compuestos logra aumentar significativamente la actividad lipolítica de la cepa silvestre reprimida, lo que podría indicar que la adición al medio de AMPc por sí solo no revierte la represión por glucosa sobre la lipasa de la cepa silvestre de *Rhizopus delemar*.

**GRAFICA 16. COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD LIPOLÍTICA VOLUMÉTRICA (UI/ml) DE LA CEPA SILVESTRE CON 4% DE GLUCOSA Y ADICIONANDO AL MEDIO CONCENTRACIONES DE 10 $\mu$ M Y 100 $\mu$ M DE AMPc y Dibutiril -AMPc**



#### **4. Modificación de una crema de leche comercial con diferentes lipasas de origen animal y fungal.**

Este trabajo tiene como objetivo aportar elementos para la recomendación del uso de la lipasa de la cepa mutante de *Rhizopus delemar* para la obtención de sabores a través de la modificación de leche o grasa láctea. Estos sabores a su vez, pueden ser aplicados en productos alimenticios tales como aderezos para ensaladas, dips, etc. Se decidió evaluar si la lipasa de la cepa hiperproductora funcionaba de la misma manera que la generada por la silvestre, que había sido aceptada en diversas pruebas de modificación enzimática de productos lácteos. Se optó por hacer una comparación con los sabores y perfiles de ácidos grasos generados por algunas de las enzimas disponibles en el mercado mexicano.

##### **4.1 Obtención de los extractos enzimáticos de las cepas Silvestre y Mutante de *Rhizopus delemar***

*Rhizopus delemar* se cultivó en fermentación sumergida en medio D, usando como fuente de carbono dextrinas al 1% debido a que se encontró en la primera parte de este trabajo experimental que es el mejor medio de cultivo para la obtención de lipasas por dicho microorganismo. La fermentación se detuvo a las 24 h, se tomó una muestra del filtrado y se midió actividad por caída de pH. El extracto enzimático obtenido tuvo las siguientes características (Tabla 8.)



**TABLA 8. CARACTERÍSTICAS DEL EXTRACTO ENZIMÁTICO DE LAS CEPAS SILVESTRE Y MUTANTE DE *Rhizopus delemar***

Cepa	pH extracto	Actividad Lipolítica (UI/g biomasa)
Silvestre (S)	5.83	58.79
Mutante (M2)	5.25	58.13

#### 4.2 Determinación de la actividad lipolítica de las lipasas comerciales.

Se determinó la actividad lipolítica de cada una de las enzimas comerciales por caída de pH, ajustando inicialmente el pH a 7.00. Los resultados se muestran en la tabla 9.

**TABLA 9. ACTIVIDAD LIPOLÍTICA DE LAS LIPASAS COMERCIALES**

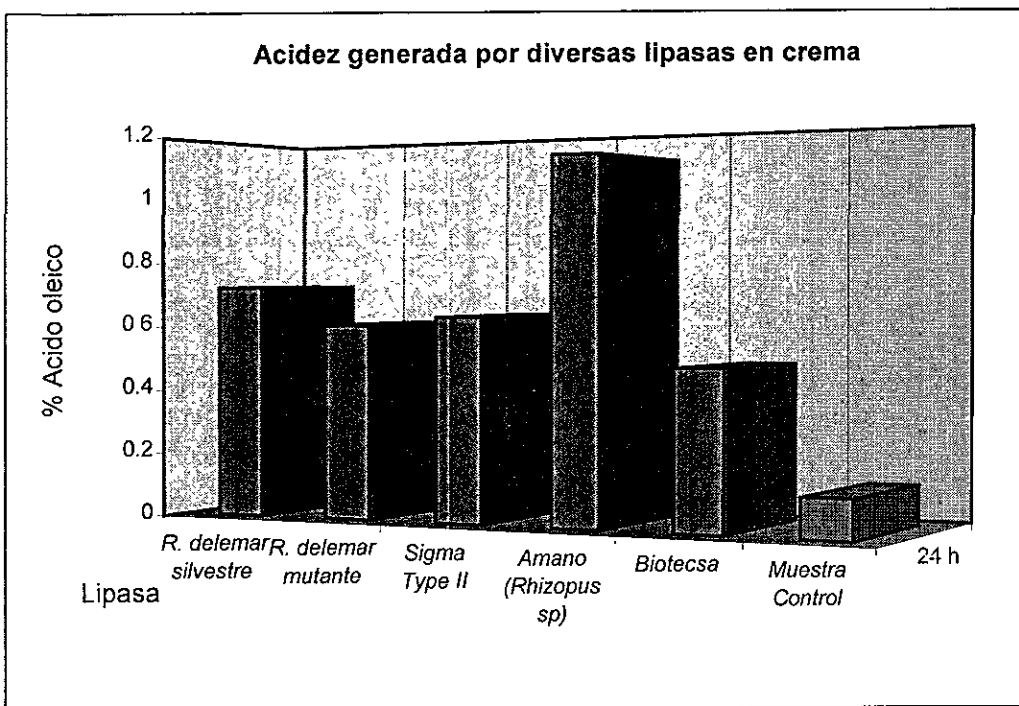
Lipasa	pH	Actividad Lipolítica ( $\mu\text{mol}$ de sustrato liberado/ min)
Sigma Type II (páncreas porcino)	7.00	47.97 (UI)
Amano ( <i>Rhizopus sp</i> )	6.98	67.92 (UI)
Biotecsa (origen fungal)	7.01	27.84 (UI)
Christian Hansen (Cabrito)	7.00	11.57 (UI)

Como se observa en la tabla 10 la actividad lipolítica de la enzima de Christian Hansen es baja comparada con el resto de las enzimas. Esto probablemente se deba al uso de gran cantidad de extendedores dentro de la formulación de la enzima, por lo que se decidió no continuar la modificación de la crema con dicha enzima. Por otro lado, la mayor actividad lipolítica se obtuvo con la lipasa de Amano (*Rhizopus sp*) y después las lipasas de *R. delemar* mutante y silvestre, respectivamente.

### 4.3 Modificación de la grasa

Se agregó 1 ml de cada extracto enzimático a las muestras de media crema Nestlé. Se homogeneizó para asegurar la formación de la interfase agua-aceite donde actúa la lipasa. Los matraces se incubaron con agitación orbital durante 24 h y se detuvo la fermentación calentando durante 1 minuto en baño maría las muestras. Después se midió la acidez titulable, que se reportó como porcentaje de ácido oleico, por ser el ácido graso más abundante en la leche. La muestra modificada con lipasa Amano fue la que presentó el mayor porcentaje de acidez reportado como porcentaje de ácido oleico, como se muestra en la gráfica 17.

**GRAFICA 17. ACIDEZ TITULABLE REPORTADA COMO PORCENTAJE DE ÁCIDO OLEICO PRODUCIDO POR CADA LIPASA DURANTE LA MODIFICACIÓN DE LA CREMA.**



#### **4.4 Cuantificación de ácidos grasos libres (AGL)**

Como se ha mencionado, los ácidos grasos libres juegan un papel muy importante en el sabor de productos lácteos como los quesos. La liberación de ácidos grasos es un proceso paulatino que podría llevar algunos días en incluso meses. El uso de las lipasas pretende que dicho proceso de maduración y liberación de ácidos grasos sea mucho más rápido. Con el fin de determinar el perfil de ácidos grasos liberados por cada una de las lipasas se realizó un estudio de cromatografía de gases.

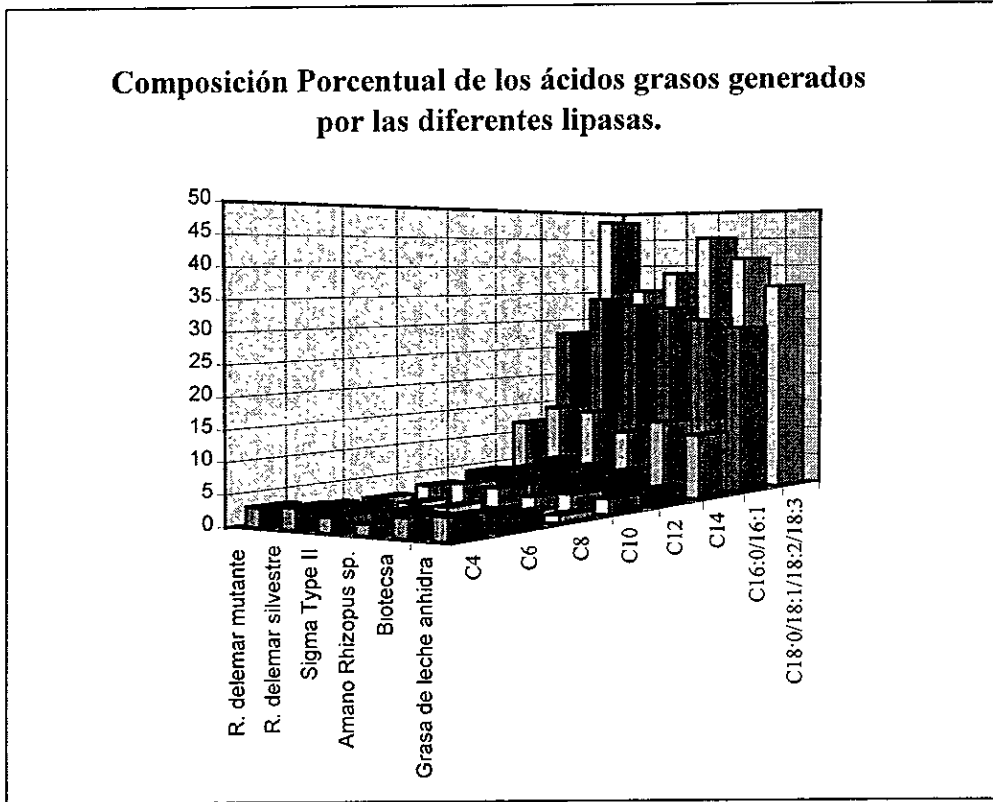
El perfil de ácidos grasos libres que se obtuvo con las lipasas de *Rhizopus delemar* varió sobre todo en la proporción de ácidos grasos de cadenas de 18 carbonos como se presenta en la gráfica 18. La lipasa producida por la cepa mutante de *Rhizopus delemar* fue la que presentó mayor afinidad / especificidad hacia los ácidos grasos de cadenas largas. Algunas hipótesis que podrían explicar estas diferencias son:

- i) Debido a que la mutación a la que fue sometido *Rhizopus delemar* no fue puntual, entonces la luz ultra violeta pudo haber afectado alguna (s) proteasas, que a su vez puedan modificar a la lipasa, provocando una alteración en la especificidad por ciertos ácidos grasos.
- ii) Como se mencionó en el capítulo de antecedentes de este trabajo, las lipasas de la cepa silvestre y de la cepa mutante presentan características ligeramente distintas. Los pesos moleculares y los puntos isoelectricos son diferentes. Esto también podría provocar que la especificidad de las lipasas por ciertos ácidos grasos sea diferente.

El porcentaje de ácidos grasos de cadenas largas (18) obtenido con la cepa mutante es el más alto, seguido por la lipasa de Amano *Rhizopus sp.* Los ácidos grasos de cadenas largas son los responsables de impartir notas jabonosas a los sabores obtenidos y estos no son agradables al paladar humano. Esto sugiere que la cepa mutante no se puede utilizar para la modificación acelerada de grasa.

Por trabajos anteriores sobre maduración acelerada de quesos por *Penicillium caseicolum* (Arenas, D., 1998), sabemos que a través del tiempo los ácidos grasos de cadenas largas van sufriendo otras reacciones, como la oxidación, y son más susceptibles a la degradación que los ácidos grasos de cadenas cortas. Esto provoca que en las primeras etapas de la maduración la concentración de ácidos grasos de cadenas largas sea muy alta y con el paso del tiempo, ésta llega a ser una tercera parte. Mientras que las concentraciones de ácidos grasos de cadenas cortas (ácido butírico) permanecen sin cambios significativos. Sería recomendable, por tanto, comparar los perfiles a tiempos mayores de modificación.

**GRAFICA 18. COMPOSICIÓN PORCENTUAL DE ÁCIDOS GRASOS LIBRES GENERADOS DURANTE LA MODIFICACIÓN DE LA CREMA POR LAS DIFERENTES LIPASAS**



**TABLA 10. TIEMPOS DE RETENCIÓN Y PROPORCIÓN DE ÁCIDOS GRASOS GENERADOS POR LAS ENZIMAS DE ESTUDIO Y COMERCIALES**

Número de Carbonos	Nombre del ácido	Tiempo de retención (s)	Grasa de leche anhidra (%)	R. delemar silvestre (%)	R. delemar mutante (%)	Sigma Type II (%)	Amano Rhizopus sp (%)	Biotecsa (%)
C4	Butírico	2.91	3.6	3.41	3.05	2.33	1.75	3.122
C6	Capríco	5.19	2.2	2.43	2.06	1.90	1.03	2.168
C8	Capríco	7.58	1.2	1.59	2.0	1.35	0.87	1.222
C10	Capríco	10.21	2.5	3.58	2.90	3.14	2.06	2.85
C12	Láurico	13.87	2.9	4.93	4.26	6.78	5.96	5.40
C14	Mirístico	18.63/18.28	10.8/0.1	14.8	11.95	14.20	10.96	12.87
C16 0/16 1	Palmitico/Palmitoleico	23.46/22.94	26.9/2.0	33.9	27.60	32.77	32.34	30.22
C18's*	Esteárico/Oleico/Linoleico/Linolénico	28.30-29.54	12.1/20.5/3.2/0.4=36.2	35.33	48.18	38.50	45.02	41.24

Tabla 10. Tiempos de retención y proporción de ácidos grasos generados por las enzimas de estudio y comerciales

\* Con las condiciones utilizadas en la cromatografía de gases, no es posible diferenciar los ácidos grasos de 18 carbonos, por eso es que se reportan como 18's en total, los ácidos que incluye son: esteárico, oleico, linoleico y linolénico (18:0/18:1/18:2 y 18:3, respectivamente).

## CONCLUSIONES

- La cepa mutante M1 de *Rhizopus delemar* perdió sus características de hiperproducción de lipasa así como de insensibilidad al efecto negativo de glucosa.
- La cepa M2 presentó un fenotipo más estable de insensibilidad a glucosa e hiperproducción de lipasa.
- La cepa silvestre de *Rhizopus delemar* presentó represión catabólica cuando crece en un medio con glucosa al 4%, mientras que la cepa mutante no presenta dicho fenómeno.
- Las cepas silvestre y mutante de *Rhizopus delemar* presentaron actividades lipolíticas altas cuando crecen en un medio con un azúcar complejo (almidón o dextrinas).
- El pH ácido afecta negativamente a la actividad lipolítica de *Rhizopus delemar*.
- La productividad y rendimiento más altas se obtuvieron usando dextrinas 1% como fuente de carbono con la cepa silvestre.
- El AMPc y el dibutiril-AMPc afectan la actividad lipolítica de la cepa silvestre de *Rhizopus delemar* en un medio con glucosa al 4%.

## Conclusiones

- A mayor concentración de AMPc el efecto en la actividad lipolítica es positivo, mientras que a una concentración baja la actividad lipolítica disminuye significativamente, con respecto al control.
- El dibutiril- AMPc tanto a altas como bajas concentraciones tiene un efecto positivo en la actividad lipolítica. Sin embargo, ni el AMPc ni su análogo por sí solos podrían explicar la naturaleza de la represión por glucosa en *Rhizopus delemar*.
- Entre las preparaciones enzimáticas probadas, la actividad lipolítica más alta se obtuvo con la enzima de Amano (*Rhizopus sp.*) seguida por la enzima de la cepa mutante de *Rhizopus delemar*.
- La cepa mutante de *Rhizopus delemar* presentó una mayor proporción de ácidos grasos de cadenas largas que la cepa silvestre.
- No se recomienda el uso de la cepa mutante de *Rhizopus delemar* en la obtención de sabores lácteos, ya que los ácidos grasos de cadenas largas son los responsables de impartir en los alimentos notas jabonosas desagradables al paladar humano.
- Los criterios de selección de cepas mutantes hiperproductoras no son suficientes para garantizar la aplicación de las enzimas en procesos de la industria alimentaria, como el caso de modificación de grasas.



**BIBLIOGRAFÍA**

1. Archer D. y Pederby J.; 1997; "The molecular biology of secreted enzyme production by fungi"; *Critical reviews in Biotechnology* 17 (4), 273-306.
2. Bati, N., Hammond, E.G. y Glatz, B.Á.; 1984; "Biomodification of fats and oils: trials with *Candida lipolytica*"; *JAACS*: 61 (11), 1743-1746.
3. Bernard, L.O; Weil, C.S; Woods, L.A. y Brenard, B.K.; 1985; "GRAS substances. Special report. Institute of Food Technologists". Chicago.
4. Berger M. y Schmeider M.P. (1991). "Lipases in organic solvent: The fatty acid chain length profile". *Biotechnol. Let.* 13 (9), 641-645.
5. Birck, G.G. y Lindley, M.G.; 1986; "Developments in food flavours": en Elsevier Applied Science; Adda, J., "Flavour of diary products"; pp 151-172.
6. Boquel, R., Veillet-Poncet, L.; 1984; "Factors contributing to production of microbial lipases"; *Microbiol. Food Nutr*; 12,179-185.
7. Celerin, E.M. y Fergus, C.L.; 1973; "Effects of nutrients, temperature and relative humidity on germination and longevity of the ascospores of *Chaetomiium thermophile* var. *Coprofile*". *Mycología*. 63, 1030-1045

8. Chen, J. y Chang K.; 1993; "Lipase-catalyzed hydrolysis of milk fat in lecithin reverse micelles". J. Ferment. Bioeng. 76 (2), 98-104.
9. Desnuelle, P.; 1975; "The lipases". en Boyer Academic Press; The enzymes VII; pp 575-617.
10. Downey, W.; 1980; " Review of the progress of dairy science: Flavour impairment from pre- and post- manufacture lipolysis in milk and dairy products"; J. Dairy Res.; 47, 237-252.
11. Dubois, M. Gilles, K.A. Hamilton, J.A. Rebers, P.A. and Smith; 1956; "Colorimetric method for determination of sugars and related substances"; Analyt. Chem. 28,350-356.
12. Dziezack, D.J.; 1986; "Enzyme modification of dairy products"; Food Technol.; 40 (4), 114-120.
13. Dziezack, D.J.; 1989; "Fats, oils and fat substitutes"; Food Technol.; 66-74.
14. Ergan, F. y Trani, M.; 1991; "Effect of lipase specificity on triglyceride synthesis"; Biotechnology Letters; 13 (1), 19-24.
15. Espinosa, E., Sánchez, S. y Farrés, A.; 1990; "Nutritional factors affecting lipase production by *Rhizopus delemar* CDBB H313"; Biotech. Let. 12(3), 209-214.
16. Espinosa, E.; 1990; "Mejoramiento de las condiciones de producción de lipasa de *Rhizopus delemar*, destinada a la modificación de un sustrato lácteo". Tesis para obtener el grado de

Maestría en Biotecnología UACP y P, CCH, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. México.

17. Estell, A.D.; 1993; "Engineering enzymes for improved performance in industrial applications"; J. Biotechnol. 28, 25-30.
18. Fellows, P. "Food processing technology. Principle and practice"; 1988; VCH. Publishers. Horwood. 172-184.
19. Fox, P.F.; 1993; "Exogenous enzymes in dairy technology. A review" J. Food Biochem.; 17, 173-199.
20. Fukumoto, J., Tsuru, D., Y Tamoto, T.; "Studies on lipase I. Purification and crystallization of al lipase secreted by *Aspergillus niger*" . J. Gen Appl Microbiol. 9(3), 353-361(1963).
21. Gacesa, P., Hubble, J.; 1990; "Tecnología de las enzimas"; en "Procedencia comercial de las enzimas"; Acribia; Zaragoza, España; pp. 15-24.
22. Gatfield, I.L.; 1988; "Production of flavor and aroma compounds by biotechnology"; Food Technol.; 42 (10), 111-122.
23. Gerhartz, W.; 1990; "Enzymes in industry. Productions and applications"; VCH Publishers, Federal Republic of Germany 33-90.

24. Godtfredsen, S.E. 1990; "En microbial lipases", en Fogarty M. W. y Kelly (Eds.) "Microbial enzymes and biotechnology"; Elsevier Applied Science. pp. 255-274.
25. Griffin, H.D.; 1994; Fungal Physiology; Ed. Wiley-Liss; "Regulation of metabolism"; pp. 275-290.
26. Haas, M.J. y Bailey, D.G.; 1993; "Glycerol as carbon source for lipase production by the fungus *Rhizopus delemar*"; Food Biotechnol. 7(1), 49-73.
27. Janssens, L., De Pooter, H.L., Schamp, N.M. & Vandamme, E.J.; 1992; "Production of flavours by microorganisms"; Process Biochem. 27, 195-215.
28. Joerger, R. D. y Haas M.J.; 1993; "Overexpression of *Rhizopus delemar* lipase in *Escherichia coli*"; Lipids; 28(2), 81-89.
29. Kawasaki, L.; 1991; "Efecto de la glucosa sobre la producción de lipasas por *Rhizopus delemar* en fermentación sumergida"; Tesis para obtener título de Biólogo, Facultad de Ciencias, UNAM. México D.F.
30. Kilara, A. 1985. "Enzyme modified lipid food ingredients"; Process Biochem. (April), 35-44.
31. Koritala, S., Hesseltine, C.W., Pryde, E.H. and Mounts, T.L.; 1987; "Biochemical Modification of Fats by Microorganisms: A preliminary Survey"; JAOCS; 64 (4), 509-513

32. Kwakman, J.H.J.M. y Postma, P. W.; 1994; "Glucose kinase has a regulatory role in carbon catabolite repression in *Streptomyces coelicolor*"; J. Bacteriol. 176(9), 2694-2698.
33. Law, B.A.; "Flavour development in cheeses"; National Institute for research in dairying. Shinfield, Reading, UK; pp 187-203.
34. Macrae, A.R.; 1983; "Microbial enzymes and biotechnology"; en Forgarty, M.W; (Ed) "Extracelular Microbial Lipases"; Applied Science Publishers. London and New York; pp 225-249.
35. Malcata, F., Reyes, R., García, H.S., Hill, C.G. y Amudson C.H.; 1992; "Kinetics and mechanism of rections catalyzed by immobilized lipases"; Enzyme Microbiol. Technol. 14,426-445.
36. Martínez, P., Christen P. Y Farrés, A.; 1993; "Medium optimization by a fractional design for lipase production by *Rhizopus delemar*"; J. Ferment. and Bioeng. 76(2), 94-97.
37. Mousumi G. y Geeta N.; 1994; "Physiological studies on xylose induction and glucose repression of xylanolytic enzymes in *Aspergillus sydiiwii* MG49"; Microbiol.Let. 117, 151-156.
38. Nagodawithana, T. y Reed, G.; 1996; "Enzymes in food processing"; en Brown, R.J.; "Dairy Products"; Academic Press; pp 347-351.

39. Nahas, E.; 1988; "Control of lipase production by *Rhizopus oligosporus* under various growth conditions"; J. Gen. Microbiol.; 134, 227-233.
40. O'connor, K.C. y Bailey, J.E.; 1988; "Hydrolysis of emulsified tributyltin by porcine pancreatic lipase"; Enzyme Microbiol. Technol.; 10, 352-356.
41. Peralta Z.; 1994; "Mejoramiento genético de *Rhizopus delemar* para la producción de lipasa"; Tesis para obtener el título de Maestría en Química (Química de Alimentos); UNAM. México.
42. Peterson, G.L., et al; 1977; "A Simplification of the protein assay method of Lowry which is more generally applicable"; Analyt. Biochem. 83, 346.
43. Polnisch, E. y Hofman, K.; 1989; "Cyclic AMP, fructose-2,6-biophosphate and catabolite inactivation of enzymes in the hydrocarbon assimilating yeast *Candida maltosa*." Arch Microbiol. 152, 269-272.
44. Rattray, J.B.; 1984; "Biotechnology and the fats and oils industry: An overview"; JAOCS; 61 (11), 1701-1712.
45. Ronne, H.; 1995; "Glucose repression in fungi"; TIG 11(1), 12-17.
46. Rowlands, R.T.; 1984; "Industrial strain improvement mutagenesis and random screening procedures". Enzyme Microb. Technol. 6 (1), 3-10.

47. Segel, I.H.; 1982; "Cálculos de Bioquímica"; Ed. Acribia; pp. 356-360.
  
48. Summer, S.B. y Howell, S.F.; 1935; "A method for determination of saccharase activity."; J. Biol. Chem. 108, 51-53.
  
49. Warner, M., Linfield, R., Barauskas, L. Y Silvieri, S.; 1984; "Enzymatic fat hydrolysis and synthesis"; JAOCS: 61 (2), 191-195.
  
50. Weinberg, E.D.; 1982; "Biosynthesis of microbial metabolites- regulation by mineral elements and temperature". Overproduction of Microbial Product ; Academic Press. London; pp182-193.
  
51. Woo, A. y Lindsay, R.; 1984; "Concentration of major free fatty acids and flavor in Italian cheese varieties"; J. Dairy Sci. 67,960-968.