

29

209



Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Química



CINETICA DE PRODUCCION DE LIPASAS  
CON DIVERSAS FUENTES DE CARBONO EN  
Rhizopus delemar

Tesis Mancomunada que para obtener el titulo de:  
Químico Farmacéutico Biólogo  
(Tecnología en Alimentos)

Presentan:

LUISA DIAZ MONTIEL  
ALICIA RUIZ CORONA



EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUIMICA



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

Jurado Asignado:

Presidente: Dr. Agustín López - Munguía Canales.

Vocal: Dr. Eduardo Bárzana García.

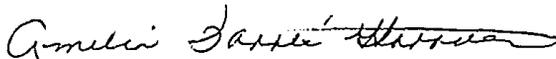
Secretario: Dra. Amelia Maria de Guadalupe Farrés González Saravia.

Suplente: Dr. Hermilo Leal Lara.

Suplente: Q.F.B. Beatriz Luna Millán.

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Alimentos y Biotecnología  
División de Ingeniería, Facultad de Química, U N A M.

Director de Tesis:



Dra. Amelia Maria de Guadalupe Farrés González Saravia.

Supervisor técnico:



M en B. Elvira Espinosa Gutiérrez.

Sustentantes:



Luisa Díaz Montiel



Alicia Ruiz Corona

## Dedicatorias

A Dios:

Por haberme dado la oportunidad de vivir, por haberme ayudado a lograr una meta más en mi vida. por enseñarme a caer y poder levantarme.

A mis padres:

Con mi infinita gratitud por su cariño, sacrificios y apoyo que me alentaron a seguir adelante y a quienes dedico todos mis logros.

A mis hermanos Fernando y Oscar:

Por su cariño, comprensión y apoyo por estar conmigo en los momentos buenos y malos...

A mis sobrinos Oscar Daniel, Maria Fernanda y Delia Paola, por sus travesuras y su alegría de vivir.

A todos mis familiares:

Por sus buenos consejos que de alguna forma han contrubuido al desarrollo de este trabajo.

A mis amigos :

Que no los nombro por temor a omitir a alguno, sin embargo mi más sincero  
agradecimiento por su amistad.

A Luisa:

Por su inagotable paciencia, además de su amistad.

A Héctor:

Con todo mi amor.

Alicia

A mis padres por haberme iniciado en el camino.

A mis hermanos Tere, Martin, Angélica, Bernardo y Cecy.

Muy especialmente a:

Silvia y Enrique que siempre apoyaron mis decisiones y supieron guiarme en todo momento.

A Victor por su paciencia y apoyo.

Luisa.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, nuestra *Alma Mater*,

Por habernos permitido adquirir todos los conocimientos que nos harán llegar a ser personas de bien.

A la Dra. Amelia Farrés González - Saravia, nuestra directora de tesis.

Por ser además de un gran apoyo académico, una verdadera amiga, por la orientación y el tiempo dedicado durante la realización de esta tesis alentándonos a seguir adelante, brindándonos sus conocimientos y experiencia, depositando su apoyo y amistad en nosotras.

Al H. jurado Dr. Agustín López Munguía Canales, Dr. Eduardo Bárzana García, Dra. Amelia Farrés González - Saravia.

Por sus acertados comentarios para una mejor presentación de esta tesis.

A la M en B. Elvira Espinosa Gutiérrez por habernos iniciado en el campo de la investigación, por sus comentarios en el desarrollo de esta tesis, además de su valiosa amistad.

Un especial agradecimiento a la M en B. Rebeca Ramírez Carrillo por sus valiosas aportaciones y conocimientos en la parte de diseño de experimentos para la realización de esta tesis.

Al Dr. Sergio Sánchez Esquivel, por su valiosa colaboración al brindarnos un espacio de trabajo en el Laboratorio de Microbiología Industrial en el Instituto de Investigaciones Biomédicas.

A Lety Kawasaki W, por su colaboración en la parte estética de esta tesis.

A Blanca A. Trejo Mendoza por su apoyo y experiencia para la implementación de las técnicas electroforéticas de actividad "in situ".

Un agradecimiento al CONACYT (Proyecto P22CCOT894677), a IFS 1478/2 y al Programa Universitario de Alimentos por su apoyo financiero para la realización de este proyecto.

A nuestros compañeros de Laboratorio:

Fernando Tobalina, Leticia García, Luis Alberto Salcedo, Maria Soledad Córdova, Pablo J. Matute, Angeles Díaz, Laura Kawasaki, Patricia Martínez, Adelfo Escalante, Enrique Martínez, Maria Luisa Aguilar, Alicia Marmolejo, Zenaida Peralta, Jesús Villegas, Rodolfo Cuervo, Ismael Bustos, René de los Rios, Noé Angeles, Agustín Rey, Armando Conca.

Por hacer del trabajo en el laboratorio una experiencia divertida y agradable.

Y gracias al apoyo de Eduardo, Tere, Lulú, Sra. Tere y Don Lorenzo.

# INDICE

	Pág
Objetivo general	1
Objetivos particulares	1
Presentación	2
1. Introducción	5
1.1. Concepto de enzima	5
1.2. Fuentes de enzima	6
1.3. Uso de enzimas en alimentos	9
2. Lipasas	
2.1. Concepto de lipasas	10
2.2. Especificidad	10
2.3. Reacción catalizada	11
2.4. Obtención y factores que afectan su producción	11
2.4.1. Plantas	11
2.4.2. Animales	12
2.4.3. Bacterianas	14
2.4.4. Fungales	15
2.4.4.1. lones	18
2.4.4.2. Temperatura y tiempos de incubación	18
2.4.4.3. pH	19
2.4.4.4. Aereación por agitación	19
2.4.4.5. Inductores y represores	20
2.4.4.6. Efecto de las fuentes de carbono	20
2.5. Aplicaciones de lipasas	24
2.5.1. Embutidos y carnes curadas	24
2.5.2. Detergentes	24

2.5.3. Farmacia y cosmetología	25
2.5.4. Panificación	26
2.5.5. Química clínica	27
2.5.6. Tratamiento de residuos	28
2.5.7. Análisis químico y Síntesis orgánica	28
2.5.8. Confitería	30
2.5.9. Interesterificación	30
2.5.10. Taxonomía y microbiología médica	32
2.5.11. Saborizante en lácteos	32
3. Lipasas de <u>Rhizopus delemar</u>	34
3.1. Análisis de actividad "in situ"	37
4. Materiales y métodos	38
4.1. Ceba	38
4.2. Cosecha de esporas	38
4.3. Medio empleado en las fermentaciones	39
4.4. Montaje de la fermentación	40
4.5. Biomasa (Peso seco)	42
4.6. Actividad lipolítica volumétrica	42
4.7. Proteína extracelular	42
4.8. Consumo de sustrato	43
4.9. Precipitación de la enzima	43
4.10. Electroforesis	44
4.10.1. Técnicas para medir Actividad " in situ "	47
4.10.2. Determinación de Actividad en cajas petri	50
4.11. Análisis estadístico	50
5. Resultados y discusión	52
5.1. Grupo I (carbohidratos como única fuente de carbono)	52

5.2. Grupo II (aceite de oliva suplementado con carbohidratos)	67
5.3. Grupo III (aceite de oliva al 1% y al 3% como única fuente de carbono)	77
5.4 Análisis conjunto de grupos	81
6. Conclusiones	83
7. Recomendaciones	85
8. Bibliografía	86
Anexo I	93
Anexo II	100

Lista de abreviaturas utilizadas en las gráficas.

ALV = Actividad lipolítica volumétrica.

BIOM = Biomasa (peso seco).

SUS = Sustrato consumido.

Lista de abreviaturas utilizadas en los geles.

MPM = Marcadores de peso molecular.

Fuentes de carbono utilizadas:

Glu = Glucosa

Alm = Almidón

Dex = Dextrinas

## OBJETIVO GENERAL

Determinar la influencia de la naturaleza de la fuente de carbono en la producción de lipasa de Rhizopus delemar, destinada a la modificación de un sustrato lácteo.

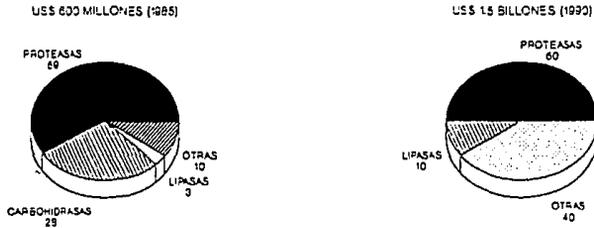
## OBJETIVOS PARTICULARES

- a) Determinar si el aceite de olivo actúa como inductor, efector positivo o como fuente de carbono.
  
- b) Establecer el efecto de la variación de la naturaleza de la fuente de carbono (carbohidratos) en producción volumétrica, productividad y crecimiento.
  
- c) Determinar mediante estudios electroforéticos si se producen diferentes enzimas lipolíticas en función de las diferentes fuentes de carbono o en el curso de la fermentación.

## PRESENTACION

Las enzimas presentan numerosas aplicaciones en el campo de alimentos, destacando entre ellas amilasas y proteasas. Las enzimas lipolíticas (EC 3.1.1.3) constituyen una pequeña fracción del mercado de enzimas de sólo 3% según algunos autores (Godfrey y Reichelt, 1983), pero que aparentemente tienen un alto potencial de crecimiento, existiendo predicciones de que llegarán a ocupar el 10% (Kilara, 1985, Godfrey, 1983, Cottle 1987) en esta década.

### *DISTRIBUCION DE ENZIMAS INDUSTRIALES EN EL MERCADO MUNDIAL*



*PROPORCION EN EL MERCADO DE LOS DIVERSOS TIPOS DE ENZIMAS DE APLICACION INDUSTRIAL. NOTESE EL SIGNIFICATIVO AUMENTO TANTO EN EL VOLUMEN MUNDIAL DE VENTAS COMO EN LA PROPORCION DE LIPASAS DE 1985 A 1990 GODFREY,1983;KILARA,1985;COTTLE,1987*

En la actualidad el mayor número de aplicaciones de lipasas se encuentra en la generación de sabores en productos lácteos, aspectos sobre el que el grupo de trabajo en el que se desarrolló la presente investigación ha estado laborando.

Las lipasas fungales son las que más se han empleado con este propósito, pues se pretende sustituir a las animales, cuya disponibilidad es limitada, y a las bacterianas a las cuales se les asocia con sabores rancios. Rhizopus delemar puede ser empleado en la generación de sabores lácteos. Esto permite trabajar en un área de investigación y desarrollo de nuevos productos, considerada de gran importancia tanto a nivel nacional como a nivel mundial, ya que los saborizantes enzimáticos son considerados como aditivos naturales, que es lo que buscan o prefieren los consumidores actualmente, lo que ofrece una gran oportunidad de competencia en el mercado.

Es importante considerar que el sabor desarrollado debe ser satisfactorio para el consumidor local, principalmente. Con base en evaluaciones sensoriales realizadas por panelistas locales se ha determinado que el saborizante elaborado con enzimas de Rhizopus delemar ha estado entre los preferidos al evaluar productos modificados por las enzimas de otros microorganismos (Tobalina, 1990).

Las lipasas de Rhizopus delemar pueden ser empleadas en otros procesos, como transesterificación e interesterificación Iwai y Tsujisaka reportan su producción en un medio definido y encuentran que produce 3 enzimas. Sin embargo los factores que regulan y afectan su producción han sido poco estudiados (Fukumoto, 1963, Iwai, 1979, Espinosa, 1990) y no cubren todos los aspectos.

Ante la importancia de obtener un catalizador de bajo costo, una de las metas es incrementar los rendimientos en producción de la enzima. Existen dos estrategias para lograrlo: optimizar el medio de cultivo y obtener cepas alteradas genéticamente.

En este trabajo se analizan dos de los factores de mayor importancia en el diseño de medios de cultivo, como son la fuente de carbono y el inductor o efector positivo. Los resultados pueden servir de base a trabajos futuros de mejoramiento genético y

optimización de medio. Al obtener la máxima producción se debe tomar en cuenta que es crítico el costo final de las materias primas utilizadas así como que no ejerzan fenómenos regulatorios como represión catabólica, inhibición por sustrato, no inducción o inactivación por catabolito (Polnisch, 1989).

# 1. INTRODUCCION

## 1.1. Concepto de enzima

Las enzimas son catalizadores biológicos que promueven una amplia variedad de reacciones bioquímicas. Las enzimas son moléculas proteicas que, como otros catalizadores, sólo tienen que estar presentes en cantidades diminutas a fin de ser efectivas. Tienen la capacidad de disminuir la energía de activación de determinadas reacciones, logrando ésto al combinarse provisionalmente con el sustrato, para formar un complejo enzima-sustrato, que es menos estable que el sustrato en sí; la disminución de la energía de activación vence la resistencia a la reacción.

Entre las características de manejo de las enzimas que permiten su utilización en diversas industrias se encuentran :

- 1).- No son tóxicas, ni generan subproductos tóxicos
- 2).- Son específicas a determinados sustratos
- 3).- Se pueden activar en condiciones de reacción suaves de temperatura y pH y por lo tanto desactivarlas fácilmente en el momento deseado por los mismos efectos.

La edición ordinaria de la <<International Union of Biochemistry Handbook of Enzyme Nomenclature>> compendia casi 2500 reacciones diferentes catalizadas por enzimas. Esta cifra subestima el número total de enzimas descubiertas. De estas 2500 enzimas, alrededor del 15% están disponibles a través de los proveedores de productos bioquímicos, en cantidades que oscilan entre  $\mu\text{g}$  y Kg; son suministrados, esencialmente, para propósitos de investigación. Sin embargo, sólo unas 40-50 enzimas son fabricadas a escala industrial, es decir, en cantidades que van de Kg a Ton anuales. Estas 50 enzimas son producidas a partir de microorganismos, plantas o

animales y catalizan, en general, reacciones hidrolíticas simples (Godfrey y Reichelt, 1983).

## 1.2. Fuentes de enzimas

Tradicionalmente se han producido pocas enzimas de origen animal (lipasa pancreática y tripsina, por ejemplo) debido a que éstas pueden ser reemplazadas por otras similares derivadas de microorganismos. Sin embargo, los sustitutos microbianos, aunque catalíticamente eficaces, presentan diferencias sutiles en sus propiedades que pueden ser cruciales en el proceso de su aplicación.

Por otra parte, se han llevado a cabo estudios sobre la producción de enzimas a partir de cultivos de células animales o vegetales. El problema esencial que se presenta es que el crecimiento de estas células es lento y por ello es difícil mantener su esterilidad.

La consecuencia principal derivada de la problemática que plantea el uso de productos de origen vegetal o animal, es que los microorganismos se han convertido en la fuente primaria de las enzimas industriales, pues estos últimos tienen la ventaja de que producen una enorme gama de enzimas potencialmente útiles, muchas de las cuales son segregadas al exterior celular. Por otra parte, son capaces de desarrollarse fácil y rápidamente en su medio de cultivo y la tecnología al respecto, a gran escala, se encuentra hoy bien establecida. Los microorganismos -particularmente los que secretan enzimas- son la materia prima preferente del enzímólogo industrial. Los recientes avances en la tecnología del DNA recombinante ofrecen muchas ventajas potenciales. Por ejemplo, es posible la incorporación de un gen animal o vegetal a un microorganismo. En consecuencia las enzimas difíciles de producir por métodos convencionales pueden cosecharse con éxito aplicando la tecnología tradicional de la fermentación a los microorganismos recombinantes. De modo similar los genes de enzimas procedentes de microorganismos patógenos, pueden ser transferidos a huéspedes aprobados como seguros (P. Gacesa y J. Hubble, 1990).

Algunos ejemplos de microorganismos productores de enzimas de uso comercial se mencionan en la Tabla 1 (Kawasaki L., 1991).

Tabla No. 1  
Microorganismos productores de enzimas importantes

MICROORGANISMO	ENZIMAS	* CLASIFICACION
<u>Aspergillus niger</u>	Glucosamiasa	E.C.3.2.1.3.
	Proteasa	E.C.3.4.21.14 E.C.1.4.4.4.3.
	Glucosa oxidasa	F.C.1.1.3.4.
	Peclinasa	E.C.3.1.1.11.
<u>Aspergillus oryzae</u>	Proteasa	E.C.3.4.21.14. E.C.3.4.24.4
	Peclinasa	E.C.3.1.1.11.
<u>Bacillus cereus</u>	Penicilinasa	E.C.3.5.2.6.
<u>Bacillus coagulans</u>	Glucosa isomerasa	E.C.5.3.1.18.
<u>B. stearothermophilus</u>	α - amilasa	E.C.3.2.1.1.
<u>B. subtilis</u>	α - amilasa	E.C.3.2.1.1.
	Proteasa	E.C.3.4.24.4.
	Penicilinasa	E.C.3.5.2.6.
	5-fosfodiesterasa	E.C.3.1.4.1.
<u>Coniothyrium diploidella</u>	Peclinasa	E.C.3.1.1.11.
<u>Endomycopsis fibuliger</u>	Amiloglucosidasa	E.C.3.2.1.3.
<u>Geotrichum candidum</u>	Lipasa	E.C.3.1.1.3.
<u>Klebsiella aerogenes</u>	Histidasa	E.C.4.3.1.3.
<u>Lactobacillus brevis</u>	Glucosa isomerasa	E.C.5.3.1.18.
<u>Penicillium sp.</u>	Dextranasa	E.C.3.2.1.11.
<u>P. chrysogenum</u>	Glucosa oxidasa	E.C.1.1.3.4.
<u>P. citrium</u>	5 <sup>-</sup> -fosfodiesterasa	E.C.3.1.4.1.
<u>Pseudomonas sp.</u>	Origenasa de triptofano	E.C.1.13.11.11.
<u>Rhizopus sp.</u>	Lipasa	E.C.3.1.1.3.
<u>R. niveus</u>	Amiloglucosidasa	E.C.3.2.1.3.
<u>Saccharomyces cerevisiae</u>	Invertasa	E.C.3.2.1.26.
<u>Sclerotinia liberlina</u>	Peclinasa	E.C.3.1.1.11.
<u>Streptococcus sp.</u>	Estreptoquinasas	E.C.3.4.22.10.
<u>Streptomyces fradiae</u>	Querulinasas	E.C.3.4.99.11.
<u>Streptomyces griseus</u>	Proteasa	E.C.3.4.24.4
	5 <sup>-</sup> -fosfodiesterasa	E.C.3.1.4.1.
<u>Trichoderma reesei</u>	Proteasa	E.C.3.4.21.14. E.C.3.4.24.4
	5 <sup>-</sup> -fosfodiesterasa	E.C.3.1.4.1
	Celulasa	E.C.3.2.1.4

\* Tomada de Enzyme Nomenclature, Academic Press, 1979; (Kawasaki L., 1991)

Las enzimas han sido utilizadas desde varias décadas atrás en la industria de alimentos, refiriéndonos especialmente a enzimas de origen vegetal y animal. En las últimas décadas se han sustituido éstas por enzimas de origen microbiano por las razones antes mencionadas y además por poder encontrar entre dichas enzimas algunas con mayor resistencia a fluctuaciones de pH y por su termoestabilidad. Algunas enzimas termoestables se mencionan en la Tabla 2 (Wasserman, 1990).

Tabla No. 2

Algunas enzimas Termoestables reportadas recientemente.

ENZIMA	FUENTE	RANGO,	TEMPERATURA OPTIMA <sub>2</sub>	ESTABILIDAD ° (°C)	REFERENCIA
Proteasa	<u>Desulfurococcus mucosus</u>	5-10	85	95	Cowan, et-al (1987)
	<u>Bacillus thermoruber</u>	6-11	45	70	Manachini, et-al (1988)
	<u>Bacillus stearotherophilus</u>	5-9	70	<70	Kubo, et-al (1983)
	<u>Termomonospora fusca YX</u>	8-11	80	75 (pH4.5) 70 (pH>8)	Gusek y Kinsella (1987)
α- Amilasa	<u>Thermoanaerobacter finnii</u>	3-7	90	80	Kochetal (1937)
	<u>Clostridium thermosulphurigenes</u>	3-7	75	80	Hsyun y Zeikus (1985a)
		3-8	75	70 (-Ca <sup>2+</sup> ) 80 (+Ca <sup>2+</sup> )	Shen, et-al (1988)
Glucoamilasa	<u>Clostridium thermohydrosulphuricum</u>	4-6.5	80	85(+almidon)	Hyun y Zeikus (1985b)
Pululanasa	<u>Thermus aquaticus YT-1</u>	5-7	>70	95	Plant, et-al (1986)
	<u>Clostridium thermohydrosulphuricum</u>	4-6.5	85	80(-almidon) 85(+almidon)	Hyun y Zeikus (1985b)
	<u>Thermoanaerobacter finnii</u>				
Exo-(1-6) glucosidasa	<u>Bacillus sp KP 1228</u>	4.3-7.8	85	75	Susuki, et-al(1987)
Xilanasas	<u>Bacillus stearotherophilus sp.</u>	5-9	78	74	Gruninger y Flechter (1986)
	<u>Thermoascus aurantiacus</u>	4.5-6.5	75	70	Yu, et-al (1987)

1) Rango de pH sobre el cual es observado aproximadamente un 50% de su actividad maxima.

2) T<sup>o</sup> de maxima actividad bajo condiciones de ensayo normal

3) T<sup>o</sup> Alta aproximada a la cual la enzima puede ser calentada por 30 min. con una retencion de actividad del 90%

(Wasserman, 1990)

### 1.3. Usos de enzimas en alimentos

Las principales aplicaciones de las enzimas en la industria de alimentos se muestran en la Tabla 3 (Neideman, 1991).

Tabla No. 3  
Aplicación de enzimas en la industria de alimentos

ALIMENTO	ENZIMA	FUENTE *	APLICACION
Panadería	Amilasa y proteasa	M,P.	Pan y horneado de galletas
Cerveza	Amilasa	M,P.	Malteado
	Proteasa	A,M,P.	Pruebas de frío
Bebidas carbonatadas	Glucosa-oxidasa	M.	Remoción de oxígeno
	Glucosa-oxidasa	M.	Remoción de oxígeno
Cereales	Amilasa	M,P.	Alimentos precocidos para bebe
	Amilasa	M,P.	Alimento para desayuno
Chocolate	Amilasa	M.	Jarabe
Cafe	Pectinasa	M.	Concentración
	Hemicelulasa	M.	
	Pectinasa	M.	Fermentación del grano
Condimentos	Proteasas	A,M,P.	Ingredientes de sabor
Confitería	Invertasa	M.	Centros suaves, foundants
Lacteos	Renina	A.	Queso
	Lipasa	A.	Sabor a queso
	Catalasa	A,M.	Esterilización de leche con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
	Proteasa	A.	Prevención de sabores en leche
	Proteasa	A,M,P.	Hidrolisis de proteína en leche
	Lactasa	M.	Concentración de suero, hejados, postres hejados, leches concentradas
	Glucosa-oxidasa	M.	Remoción de oxígeno de leches en polvo
Bebidas destiladas	Amilasa	M,P.	Malteado
Huevo	Glucosa-oxidasa	M.	Remoción de glucosa
Jugos de fruta	Pectinasa	M.	Clarificación, filtración, concentración
Carne	Proteasa	M,P.	Ablandamiento de carne, ablandamiento de fundas, pescado condensado soluble
Mejaza	Invertasa	M.	Pruebas de mejaza alta
Almidón	Amilasa y amiloglucosidasa	M.	Jarabes de maíz
Vino	Pectinasa	M.	Pressado, clarificación, filtración.

\* A= Animal, M= Microbiana, P= Planta

(Neideman, L.S.,1991)

## 2. Lipasas

### 2.1 Concepto de lipasas

Las glicerol éster hidrolasas (EC 3.1.1.3.) o lipasas, son enzimas que hidrolizan, tri, di y monoglicéridos presentes en la interfase aceite-agua. Aunque la reacción rara vez es completa, la hidrólisis de un triglicérido por lipasas puede producir di y monoglicéridos así como ácidos grasos libres. Los sustratos insolubles son un requisito para las lipasas y tales sustratos presentan el único problema en la evaluación tradicional de los parámetros cinéticos (Kilara, 1985).

Estas reacciones pueden ser reversibles así que las enzimas también catalizan la formación de acilgliceroles a partir de glicerina y ácidos grasos libres.

### 2.2. Especificidad

Las lipasas pueden clasificarse en dos grupos de acuerdo a su especificidad:

i).-Lipasas no específicas: éstas catalizan la ruptura completa del triglicérido en glicerina y ácidos grasos libres teniendo como intermediarios mono y di glicéridos.

Ejemplo de estas enzimas son las producidas por Candida cylindracea, Corynebacterium acnes y Staphylococcus aureus.

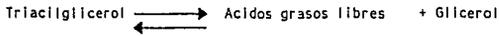
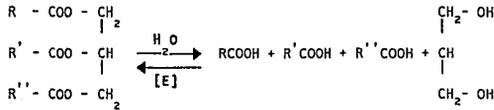
ii).-Lipasas 1,3 específicas: catalizan la liberación de ácidos grasos atacando específicamente las posiciones 1 y 3 de los triglicéridos obteniéndose como productos de reacción, ácidos grasos libres, 1,2-diglicéridos, 2,3-diglicéridos y 2-monoglicéridos.

Entre los microorganismos productores de este tipo de enzimas podemos citar Aspergillus niger, Mucor javanicus y varias especies de Rhizopus (Macrae<sup>a</sup>, 1983).

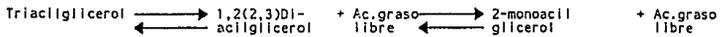
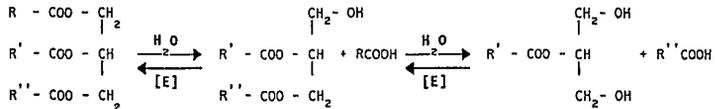
## 2.3. Reacción catalizada

I) Lipasa no específica

(Macrae<sup>A</sup>, 1983)



II) Lipasa 1,3- específica



## 2.4. Obtención y factores que afectan la producción

Las lipasas son producidas por plantas, animales y microorganismos (bacterias y hongos)

### 2.4.1. Plantas

Las lipasas son producidas por plantas como semillas de ricino, germen de trigo, avena, maíz, frutos de palma, cacahuete, semillas de jojoba y arroz. Entre éstas la mejor caracterizada es la de semillas de ricino que se encuentra presente aún en semillas inactivas. Con pocas excepciones la actividad de lipasa está ausente en semillas sin germinar y se incrementa rápidamente en el período posterior a la germinación.

Generalmente, las lipasas de semillas oleaginosas son más activas sobre triglicéridos que contengan ácidos grasos de cadena corta, como acético y butírico, mientras que no se encuentra especificidad sobre ácidos grasos saturados o insaturados.

Una de las lipasas obtenidas de arroz, con peso molecular de 40,000 daltons, se activa en presencia de iones calcio, mientras que la obtenida de Vernonica anthelmintica se activa en presencia de calcio y magnesio especialmente en combinación con potasio.

Los pH óptimos de actividad se muestran en la Tabla 4 (Huang, 1984).

**Tabla No. 4**  
**pH optimos de actividad para lipasas**  
**provenientes de algunas semillas.**

Semillas		pH optimo
Oleaginosas > 10% de lipidos	Ricino	4.1
	Jojoba	8.5
	<u>Vernonica anthelmintica</u>	7.5-8.0
	Cacahuate	4.5
Cereales y Granos. 2-10% de lipidos	Arroz	7.5-8.0
	Trigo	8.0
	Avena	7.4

(Huang, 1984)

#### 2.4.2. Animales

Los animales contienen esterasas pregástricas, lipasas linguales y lipasas pancreáticas, siendo estas últimas las estudiadas más extensivamente (Kilara, 1985).

Las lipasas también están presentes en un número de membranas y órganos de mamíferos como son corazón, cerebro, músculo, arterias, riñón, membranas adiposas y suero. Estas también han sido identificadas en leche, pescado e invertebrados. La lipasa de leche tiene un peso molecular aproximado de 20,000 daltons (Desnuelle,

1972), y se descubrió por la actividad que se presentaba en la leche, provocando rancidez.

Muchas lipasas de origen animal muestran un pH óptimo de actividad en el rango alcalino (pH = 8 - 9) aunque éste depende del sustrato empleado (Kilara, 1985). Sin embargo se reporta que en general las lipasas manifiestan un alto grado de actividad en un pH entre 5 y 9 con un máximo entre 6 y 8. Una enzima que trabaja fuera de este rango es la lipasa de leche, que trabaja a un pH de 9 (Macrae y Hammond, 1985). Las lipasas gástricas son recobradas de pastas de cuajo derivadas del revestimiento del estómago de crías de mamíferos (Arnold, 1975).

Algunas características de lipasas obtenidas de mamíferos se resumen en la Tabla 5 (Hamosh, 1984).

Tabla No. 5  
Características de algunas lipasas  
obtenidas de mamíferos

Lipasas de...	Tipo	Mamífero	Peso molecular	pH óptimo	Localización
Mamíferos	Lingual	Rata	500,000	4.5-5.4	Glandulas serosas Glandulas linguales Mucosas Glandulas faringea- les.
		Hombre	44,000-48,000	3.5-5.5	Glandulas linguales Aspiraciones gas- tricas en fetos de 26-40 semanas de - gestacion. Estomago en recién nacidos. Jugos gastricos en adultos.
	Pancreatica	Bovino	48,500	8.8	Pancreas
		Ovino	48,500	8.8	Pancreas
		Caballo	48,500	8.8	Pancreas
		Porcino	49,859	7.5	Jugos pancreaticos
		Hombre	46,000	7.5	Jugos pancreaticos
	Rata	43,000	7.5	Jugos pancreaticos	

(Hamosh, 1984)

### 2.4.3. Bacterianas

Las lipasas producidas por bacterias del género Pseudomonas, Achromobacter y Staphylococcus se muestran como productoras de lipasa (Kilara, 1985).

Las lipasas bacterianas son generalmente más estables que las obtenidas de animales y plantas. La cantidad de lipasa producida por cada cepa es dependiente de la temperatura del cultivo y de la composición de éste en cuanto a nitrógeno, carbono, fuentes lipídicas, la concentración de sales inorgánicas y la disponibilidad de oxígeno.

Reportes publicados acerca de Chromobacterium sp., Bacillus sp. y Streptococcus sp. mencionan que la producción de enzima es estimulada por lípidos como mantequilla, manteca de cerdo, aceite de oliva y ácidos grasos. Sin embargo las condiciones óptimas para la producción de lipasa no han sido bien identificadas. Se probó el efecto de polisacáridos sobre la producción de lipasa por Serratia marcescens; de 21 polisacáridos probados, 4 incrementaron grandemente la producción (glicógeno, hialuronato, pectina B y goma arábica).

Algunos autores reportan que algunas fuentes de carbono inhiben la producción de lipasa teniendo como posible explicación que ciertas enzimas, principalmente las de tipo inducible, son marcadamente reprimidas cuando hay un crecimiento rápido o cuando la fuente de carbono se utiliza en seguida. Esto es debido a una disminución en la concentración intracelular de cAMP, el cual es destinado al promotor del gen para la proteína especial. El cAMP incrementa la afinidad de la RNA polimerasa para el gen, por eso se incrementa la frecuencia de transcripción en ausencia de suficiente cAMP, el gen estructural puede ser apagado y la síntesis de la enzima se detiene (Chopra y Chander, 1983).

Los iones inorgánicos como sodio, fosfato y calcio son esenciales para el crecimiento de bacterias. Se encontró que la adición de cloruro de sodio a un medio de cultivo para Bacillus natto provoca una buena producción de lipasa en un tiempo corto.

Las lipasas bacterianas son inhibidas por iones metálicos. Por ejemplo la lipasa de Chromobacterium es inhibida por  $Fe^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$  y  $Zn^{2+}$ . La lipasa de Streptococcus es estimulada por  $Ca^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  y  $Mn^{2+}$ , pero es inhibida por  $Fe^{3+}$ ,  $Li^+$ ,  $Zn^{2+}$  y  $Cu^{2+}$ .

Muchas lipasas microbianas exhiben una estabilidad máxima en un rango de pH neutral. Si los organismos son cultivados a pH alcalino, la lipasa producida tendrá un pH óptimo alcalino.

Los pesos moleculares determinados para Pseudomonas, Chromobacterium (lipasa A), Chromobacterium (lipasa B) y Streptococcus son 33,000, 120,000, 26,000 y 21,000 daltons respectivamente (Sugiura, 1984).

Algunas temperaturas de inactivación, así como el tiempo requerido para lograrla se presenta en la Tabla 6 (Kilara, 1985).

Tabla No. 6  
Temperatura de inactivación de algunas lipasas bacterianas

FUENTE DE LIPASA	INACTIVACION	
	TIEMPO (min)	TEMPERATURA (°C)
<u>Pseudomonas fragi</u>	15	72
<u>Staphylococcus aureus</u>	30	70
<u>Achromobacter lipolyticum</u>	40	99

(Kilara, 1985)

#### 2.4.4. Fungales

El peso molecular para las lipasas fungales está entre 20000 y 60000 daltons, se sabe que las lipasas fungales catalizan predominantemente la hidrólisis de triglicéridos que tienen ácidos grasos de cadena corta (Bennet, 1992). Se ha observado una diferencia sobre la especificidad por el sustrato entre varias lipasas fungales. Las lipasas de Aspergillus niger catalizan la hidrólisis de triglicéridos de cadena corta y larga, en tanto

que la enzima de Mucor lipolyticus cataliza la hidrólisis de triglicéridos de ácidos grasos de cadenas entre 4 y 12 carbonos. (Höfelmann, 1985).

El interés en el estudio de hongos termofílicos y sus enzimas se ha incrementado en años recientes, particularmente por su potencial para uso en ciertos procesos industriales. Un gran número de documentos han sido publicados acerca de hongos termofílicos y el comportamiento de las lipasas producidas por estos microorganismos.

Destacan los estudios sobre especies termofílicas de Mucor, entre ellas la de Mucor miehei que pudo ser usada como un sustituto de esterases animales en la producción de quesos (Depleoy, 1981).

La Tabla 7 ( Iwai y Tsujisaka, 1984 ) muestra la comparación de algunas propiedades enzimáticas de lipasas fungales

Tabla No. 7  
Comparacion de algunas propiedades enzimaticas  
de lipasas fungales.

	<u>A. niger</u>	<u>R. delemar</u> "A" "B"		<u>G. candidum</u>	<u>P. cyclopium</u> "A" "B"		<u>H. lanuginosa</u>
Peso molecular	38,000	44,000	45,000	54,000	27,000	36,000	27,500
Punto iso-electrico	4.3	7.3	8.2	4.3	4.9	4.1	---
Temperatura optima °C (sobre aceite de oliva)	25	35	35	40	35	40	60
Estabilidad a pH --	2.2-6.8 30°C/24hrs	3-8	4-7 30°C/24hrs	4.2-9.8 30°C/24hrs	6.5-9.0	4.0-6.5 30°C/17hrs	6-10 45°C/1 hr
Termoestabilidad °C pH/ tiempo(min)	50 5.6/15	65	45 5.6/15	55 5.6/15	30 6.0/15		60 8.0/20
pH optimo (sobre aceite de oliva)	5.6		5.6	6.3	7.5	5.8	8.0

(Iwai y Tsujisaka, 1984)

Probablemente muchos microorganismos producen dos o más lipasas extracelulares con diferente especificidad a ácidos grasos, especialmente con respecto al tamaño de la cadena (Macrae<sup>D</sup>, 1983; Macrae y Hammond, 1985).

La Tabla 8 que se muestra a continuación enlista microorganismos productores de más de una lipasa.

Tabla No. 8  
Microorganismos que producen mas de una lipasa

MICROORGANISMO	HOMENCLATURA	PESO MOLECULAR DALTONS	pH OPTIMO	TEMPERATURA OPTIMA C	REFERENCIA
<u>Aspergillus niger</u>	I	31,000	5-6		Hoffelmann, 1985
	II	19,000	5-6		
<u>Rhizopus delemar</u> CBS 327.42	A'	76,000			Tahoun, 1986
	B'	60,000			
	C'	45,000			
<u>Penicillium roquefortii</u>	A		6.0	40	Menassa, 1982
	B		4.5	35	
<u>Rodotorula pilimanae</u>	I	172,800	4.0	45-55	Muderhwa, 1986
	II	21,400	7.0	45-55	
<u>Penicillium cyclopium</u>	I		8.0		Okumura, 1980
	II		5.0		
	III	110,000	6.0	40	
<u>Mucor hypolyticus</u>	F <sub>1</sub>	30,000			Muderhwa, 1985
	F <sub>2</sub>	59,000			
	F <sub>3</sub>	200,000			
<u>Rhizopus pilimanae</u>	I	25,000			Muderhwa, 1986
	II	176,000			

(Diaz, A, 1992)

Se sabe que un factor determinante para la producción de diferentes metabolitos es la composición del medio. El medio para la producción de lipasa y de otras enzimas varía de acuerdo a la especie que se emplea (Bloquel, 1984; Chander, 1977).

#### 2.4.4.1. Iones

Se ha mostrado que los iones  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ , no tienen efecto sobre la síntesis de lipasa, pero el  $\text{Fe}^{2+}$ , en combinación con  $\text{Mg}^{2+}$ , han dado un crecimiento favorable y una máxima concentración de lipasa (Bloquel, 1984).

En un trabajo sobre Aspergillus niger se comprobó lo mencionado anteriormente pues los iones de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ , no tuvieron efecto sobre la concentración de la enzima. El  $\text{Mg}^{2+}$  en ausencia de  $\text{Fe}^{2+}$ , tuvo un efecto de inhibición, y  $\text{Fe}^{2+}$  en caso de no estar presente el  $\text{Mg}^{2+}$  tiene un efecto acelerador en la actividad específica.

$\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  incrementaron la concentración de enzima por unidad de peso de micelio, aunque no fue muy claro (Pal, 1978).

Para Rhizopus nigricans se probaron diferentes sales de citrato, obteniéndose que con citrato de calcio se obtiene el máximo crecimiento y la mayor concentración de lipasa, sin embargo todas las sales del citrato estimularon la producción de lipasa (Chander, 1981).

También se reportó un incremento en la producción de lipasa para Aspergillus wentii cuando el citrato de sodio o de calcio se adicionó al medio (Chopra, 1983).

#### 2.4.4.2. Temperaturas y tiempos de incubación

La temperatura óptima para la producción de lipasa varía de especie a especie. La producción máxima de lipasa se notó a  $30^\circ\text{C}$  con Geotrichum candidum. En una cepa de P. roqueforti se produjo una concentración máxima de lipasa a  $27^\circ\text{C}$  (Bloquel, 1984). Para Mucor mucedo una gran producción de lipasa ocurrió en cultivos incubados a  $38^\circ\text{C}$  (Stern, 1954). Rhizopus nigricans mostró un máximo de crecimiento y de producción de lipasa a  $30^\circ\text{C}$  por un período de 5 días (Chander, 1981).

Un período de incubación de 96 hrs a  $35^\circ\text{C}$  se requirió para obtener un máximo de actividad para Aspergillus niger (Pal, 1978) y la lipasa de Penicillium chrysoqenum

se produjo a 30°C en 3 días. (Chander, 1977). El hongo Rhizopus oligosporus fue de 25°C (Nahas, 1988).

#### 2.4.4.3. pH

Se observó que el pH inicial del medio de crecimiento también es importante para la producción de lipasa para algunos microorganismos. Los valores neutrales de pH del medio son óptimos para la mayor producción de lipasa por especies como Rhizopus arrhizus y otras (Bloquel, R, 1984). Rhizopus oligosporus, al igual que otros hongos tiene valores óptimos de pH para crecimiento y producción de lipasa de 5.5 y 6.5 respectivamente (Nahas, E., 1988). El incremento en la producción de lipasa se nota a pH 6.0, para Penicillium chrysogenum (Chander, 1977), y un pH igual se encontró para Rhizopus nigricans (Chander, 1981). El pH para la formación de lipasa de A. niger fue de 7.0 (Pal, 1978). Chopra en 1983 mostró que el pH óptimo para la síntesis de lipasa por medio de Syncephalastrum racemosum fue de 8.0.

#### 2.4.4.4. Aereación por agitación

Muchos investigadores a menudo observaron que la aereación aumentó la producción de varios microorganismos. Los cultivos agitados de Penicillium sp ; Rhizopus sp y Geotrichum sp tuvieron un incremento en el crecimiento celular y estimularon la producción de lipasa. Otros investigadores observaron que cultivos agitados dieron un incremento en el crecimiento celular, en la producción inicial de lipasa. En el caso de la actividad lipolítica producida por las bacterias ésta disminuye rápidamente con una agitación continua (Bloquel, 1984).

Rhizopus oligosporus, cultivado en un medio con aceite de soya, incrementó la producción significativamente en cultivos agitados, confirmando los resultados obtenidos por Sorenson y Hesseltine en 1966 (Nahas, 1988). Un incremento en la producción de lipasa de aproximadamente el 70% se obtuvo en cultivos agitados para

Penicillium chrysogenum (Chander, 1977). La aereación estimuló el crecimiento y la producción de lipasa por Rhizopus nigricans (Chander, 1981).

#### **2.4.4.5. Inductores y represores.**

Algunos organismos productores de lipasas producen la enzima solamente en la presencia de un inductor (Sztajer, 1988).

Para Penicillium roqueforti la adición de grasa de leche, aceite de maíz o aceite de oliva en el medio de crecimiento inhibió la producción de lipasa en 5, 21, y 29% respectivamente (Bloquel, 1984). La adición de aceite de oliva emulsificado y sin emulsificar a un medio con 0.5% v/v de glucosa, se probó, obteniéndose 431.5% y 110.5%, respectivamente, de actividad lipolítica volumétrica, al compararse con medio de glucosa al 1% w/v, sin aceite de oliva. En lo que respecta a los valores de actividad lipolítica específica se obtienen incrementos de 778.9% y 500.0%, con respecto a la producción con glucosa para Rhizopus oligosporus (Nahas, 1988).

Para Aspergillus niger el efecto de grasa y aceite fue estudiado sustituyendo diferentes lípidos en un medio basal. La adición de material lipídico al medio de fermentación incrementó la producción de lipasa. La grasa de leche y el aceite de oliva ayuda al mejor crecimiento celular y producción de enzima. La concentración óptima de aceite de oliva fue de 1% (Pal, 1978).

#### **2.4.4.6 Efecto de las fuentes de carbono**

La optimización de la producción de enzimas a partir de microorganismos depende de una serie de factores interrelacionados. Así por ejemplo, la presencia de un compuesto carbonado simple como glucosa, puede reprimir la síntesis de una enzima. La lógica que subyace en este fenómeno es que un microorganismo puede utilizar la glucosa sin necesidad de gastar energía en síntesis de enzimas útiles para degradar otras fuentes carbonadas más complejas. La represión por un catabolito carbonado es un fenómeno

que se da comúnmente en los microorganismos y que afecta a muchas enzimas constitutivas e inducibles (Gacesa, 1990).

Para algunos microorganismos estudiados se ha determinado que la mejor fuente de carbono para la obtención de lipasa es la glucosa y entre éstos se encuentra Penicillium roqueforti, en el que la máxima actividad de lipasa es alcanzada en un medio con glucosa al 2%, encontrando muy poca diferencia al emplear fructosa al 2%. La actividad de lipasa no es medible cuando el aceite de oliva es usado como fuente de carbono (Petrovic, 1990).

El efecto del carbono también se ha estudiado para Rhizopus oligosporus, donde las mejores fuentes de carbono son la galactosa y la xilosa (Nahas, 1988). Aspergillus niger tiene una mayor producción con sacarosa al 1 % en presencia de aceite de oliva (Pal, 1978). Se reporta que la máxima concentración de enzima para Penicillium chrysogenum se produjo con glucosa al 2% , seguido de maltosa (Chander, 1977). Estos resultados son contradictorios a las observaciones de Iwai y Tsujisaka, 1974, sobre Rhizopus delemar quienes no encontraron diferencias significativas en la producción de lipasa al emplear diferentes fuentes de carbono al 2% , iniciando la fermentación en un pH de 6.0, a un tiempo fijo de 96 hrs a 27°C y con agitación de 110 rpm. Rhizopus nigricans presenta la máxima concentración de enzima al emplear glucosa al 2% (Chander, 1981).

Algunos autores reportan que compuestos de carbono como glucosa, manitol y glicerina e incluso algunos disacáridos, inhiben o reprimen. El tipo de fuente de carbono que afecta varía según el metabolito y la cepa. En hongos no está claro el mecanismo por el que se lleva a cabo la represión catabólica. Se atribuye en parte al productor de gen CreA similar al del Crp y cAMP en bacterias (Scazzochio, 1992). El fenómeno de regulación por glucosa es ilustrado examinando la producción de lipasa por Geotrichum candidum donde la producción de la enzima solamente ocurre después de que la glucosa ha sido consumida en el medio de cultivo y el crecimiento

ha casi cesado. Efectos similares de glucosa sobre la formación de lipasa han sido observados con Rhizopus japonicus. (Macrae<sup>b</sup>, 1983).

La adición de lípidos al medio de crecimiento demostró que incrementan substancialmente la producción de lipasa para un número de microorganismos. En Geotrichum candidum triglicéridos como aceite de oliva, aceite de cacahuete, aceite de semillas de algodón y ácidos grasos, como el oleico, son efectivos en la estimulación de la formación de lipasa. Por lo tanto el medio de crecimiento usado para la producción de lipasa extracelular en alta concentración generalmente usa como fuente de carbono cualquier polisacárido como almidón o salvado o fuentes lipídicas como triglicéridos o ácidos grasos. Sin embargo, pequeñas cantidades de glucosa son usadas para iniciar el crecimiento (Macrae<sup>b</sup>, 1983).

Algunos ejemplos de estimulantes o represores en la producción de lipasas se pueden observar en la Tabla 9 (Espinoza<sup>b</sup>, 1990).

Tabla No. 9

Elementos estimulantes o depresores en la producción de lipasas en hongos filamentosos.			
Microorganismos	Estimulantes	Represores	Referencia
<u>Penicillium roqueforti</u>	Peptona Extracto de levadura	Acete de maiz y olivo, Lactosa Glucosa.	Eitenahler, 1970
<u>Penicillium candidum</u>	Glucosa, Peptona y oxigeno	-----	Kornacki, 1980
<u>Penicillium chrysogenum</u>	Glucosa, Peptona y oxigeno	-----	Chander, 1981
<u>Aspergillus wentii</u>	Glucosa, Manitol Harina de soya y Peptona	Fructosa, Aceites, Tributirina, Grasa butirica.	Chander, 1980
<u>Aspergillus niger</u>	Sacarosa y Nitrate de amonio.	Aceites y Magnesio	Pal, 1978
<u>Geotrichum candidum</u>	Peptona, Sales de Magnesio y Potasio	-----	Arends, 1986
<u>Rhizopus nigricans</u>	Glucosa, Galactosa y Peptona	-----	Chander, 1981
<u>Rhizopus oligosporus</u>	Tweens y Harina de Soya	Oxigeno	Nahas, 1988
<u>Rhizopus chinensis</u>	Acido oleico, Acete de olivo	Glucosa	Nakashima, 1988

(Espinosa, 1990)

## **2.5. Aplicaciones de lipasas**

Las enzimas microbianas han sido usadas en lácteos, y otros procesos, y las lipasas producidas "in situ" por microorganismos son importantes en la palatabilidad y aceptabilidad de alimentos. Las lipasas microbianas son usadas en detergentes, productos farmacéuticos, cosméticos, producción de ácidos alifáticos y en tratamiento de aguas domésticas e industriales. Los fabricantes ofrecen enzimas lipolíticas en polvo libres de otras enzimas, a veces son microencapsuladas para aplicaciones especializadas.

### **2.5.1. Embutidos y Carnes Curadas**

Los jamones en los cuales tiene lugar una fermentación láctica presentan un incremento en los niveles de compuestos volátiles que dan sabor, incluyendo ácidos grasos, como butírico, propiónico y mirístico. Las lipasas bacterianas están involucradas en el desarrollo del sabor y la producción de estos ácidos grasos. En otros estudios se observó que durante la maduración de embutidos secos italianos, las enzimas lipolíticas desempeñaron un papel importante en el desarrollo del sabor. Ciertas especies de Micrococcus son especialmente lipolíticas en la grasa de cerdo y se detectan numerosos ácidos grasos volátiles en la maduración, embutidos italianos durante hechas un período de 70 días (Seitz,1974).

### **2.5.2. Detergentes**

En las últimas décadas el mercado de las enzimas como proteasas, lipasas y amilasas en productos detergentes se ha incrementado grandemente. Un gran potencial del mercado para las enzimas lipolíticas se presenta en la formulación de detergentes donde pueden ser efectivas en la remoción de manchas de grasa, particularmente a temperaturas de lavado muy bajas (Chaplin, 1990 y Estell, 1993).

En este campo, a partir de 1970 se tiende a desarrollar productos que faciliten el uso práctico de enzimas en formulación de detergentes. Una tendencia es la reducción del fosfato que es parte de los detergentes para resolver los problemas ambientales, y otro es la tendencia hacia el lavado a bajas temperaturas para ahorrar energía.

Las glicerol éster hidrolasas podrán ser usadas en detergentes para lavandería en seco para promover la remoción de manchas de triglicéridos de sebo humano, el cual es difícil de remover bajo condiciones normales de lavado. Durante la eliminación de glicéridos por lavado con soluciones alcalinas de surfactantes, los ácidos grasos libres son fácilmente removidos por la formación de jabones de ácidos grasos solubles, pero los triglicéridos no son saponificados por las soluciones alcalinas (Fujii, T, 1986).

Se han publicado diversas patentes sobre el uso de lipasas microbianas en la formulación de productos de lavado para trajes, vestidos y ropa de cama. La adición de las enzimas en agentes de remojo para prelavado y detergentes en polvo ha sido defendido (Chaplin, 1990). Las lipasas microbianas han sido recomendadas para su aplicación en la eliminación de depósitos de grasa en productos para lavado de vajilla, manufactura de piel y tratamiento de aguas sucias (Macrae<sup>D</sup>, 1983). La aplicación en detergentes representa un potencial alto en tonelaje para el uso de lipasas en el futuro. (Macrae y Hammond, 1985).

### **2.5.3. Farmacia y Cosmetología**

Se han descrito cremas de interés y aplicación general para desgrasar la piel humana, en una patente alemana [August, P; German Pat. 2064,940 (1972)]. La composición incluye 500 UI de lipasas (la fuente es desconocida). Con pequeñas cantidades de bilis de bovino se ayuda a estabilizar la enzima.

The Kaken Chemical Co. de Japón produce una preparación digestiva la cual incluye una lipasa. Un producto granular encapsulado fue evaluado y se encontró satisfactorio como digestivo para ayudar en un modelo gastrointestinal artificial. El revestimiento

consiste de una grasa y una lipasa la cual asiste en una rápida asimilación de los fármacos en el tracto digestivo.

Una patente alemana [Berrebi C., Manoussos and S. A. Oreal, German pat. 1,974,876 (1968)] propone el uso de cremas que combaten la inflamación de las células de la piel localmente, describe cosméticos y preparaciones farmacéuticas que contienen de 1 - 5% de lipasa (fuente desconocida), hialuronidasa y tiomucasa.

Otra patente alemana [Saphir,J.,German pat. 1,242,794 (1967)].describe el proceso en el cual una lipasa fue adicionada para una composición de ondulado permanente del cabello para promover la penetración de la preparación en el cabello (Seitz, 1974).

#### **2.5.4. Panificación**

Diversas patentes han sido emitidas sobre enzimas para modificar la composición de la grasa de leche para impartir o intensificar el sabor a mantequilla en productos de panadería.

En general las lipasas de origen animal fueron más satisfactorias para la modificación de la grasa de la leche. La incorporación de la grasa de leche modificada por acción de estas enzimas produjo mejor sabor que otras grasas modificadas con enzimas de otro origen.

La Tabla 10 muestra las enzimas utilizadas para esta modificación.

**Tabla No. 10**  
Enzimas empleadas en la modificación de grasa de leche

Lipasa de leche
Lipasa de pasta de renina
Lipasa pancreática
Lipasa pregastrica
Lipasas fungales:
<u>Aspergillus oryzae</u>
<u>Geotrichum candidum</u>
<u>Penicillium requeforti</u>
Lipasas bacterianas:
<u>Achromobacter lipolyticum</u>
<u>Pseudomonas fluorescens</u>
<u>Lactobacillus sp.</u>
Esterasas pregastricas:
Cabrillo
Cordero

(Arnold, 1975; Fox, 1993; El Soda, 1993)

### 2.5.5. Química clínica

La enzimología clínica consiste en el diagnóstico de enfermedades mediante la valoración de enzimas en muestras de tejidos y principalmente en sueros sanguíneos. El nacimiento de esta disciplina se remonta a principios de siglo, cuando se descubrió en Alemania que el suero de pacientes con pancreatitis aguda contenía altos niveles de  $\alpha$ -amilasa y lipasa. Estas enzimas son especialmente abundantes en el páncreas, que las sintetiza para verterlas al intestino durante la digestión de los alimentos. Sin embargo cuando sus células exócrinas sufren daño liberan estas enzimas a la sangre y ello permite un fácil diagnóstico de la pancreatitis.

Sólo cuando un órgano es especialmente rico en una determinada enzima tiene esta utilidad de diagnóstico (Serrano, 1985 y Bühler, 1987).

Un uso importante y actual de las lipasas es en la determinación de lípidos con propósitos clínicos, mencionado por Macrae y Hammond, 1985, donde también se menciona el uso de fosfolipasas.

#### **2.5.6. Tratamiento de residuos**

El uso de las lipasas en tratamiento de aguas residuales es mencionado en la literatura.

Las enzimas de Candida han sido usadas en Estados Unidos de Norteamérica en plantas de tratamiento de aguas residuales y para el tratamiento de aguas en edificios y hoteles y para el lavado de tuberías y alcantarillas. Se propone el uso de lipasas para tratar desechos de industrias, como los efluentes producidos por la industria de helados, que son particularmente difíciles de tratar por tener un alto contenido de grasa (arriba del 50% de sólidos de grasa) (Seitz, 1974). La solución más económica para este problema intratable es el uso de una combinación de enzimas y bacterias para la digestión y degradación de grasa, produciendo compuestos utilizables por bacterias en forma aeróbica en un tanque de tratamiento. La combinación incluye lipasas potentes (para degradar la grasa) lo cual hace efectivo el tratamiento de efluentes de helados (West, 1988).

#### **2.5.7. Análisis químico y Síntesis orgánica.**

Los trabajos de Oritani y Yamashita 1973 indicaron el potencial de las lipasas microbianas y las estererasas para la resolución de mezclas racémicas o ésteres de alcoholes terpénicos por explotación de la estereoespecificidad de sus enzimas. Otra aplicación es la resolución de alcoholes isoméricos (Macrae y Hammond, 1985). La reversibilidad de la reacción de las lipasas permite que las enzimas sean usadas para

catalizar la formación de ésteres de alcoholes y ácidos grasos. En otros casos un gran exceso de alcohol de usa, presumiblemente para derivar la esterificación.

Las lipasas catalizan la esterificación y han sido usadas para sintetizar ésteres de alcoholes terpénicos cortos y medios y ácidos grasos de cadena larga (Macrae<sup>b</sup>, 1983), teniendo utilidad para fragancias (Macrae y Hammond, 1985).

En este caso, por disminución de la actividad de agua, es posible llevar a cabo la reacción en dirección de la esterificación. La síntesis de ésteres ciertamente puede ser hecha químicamente por catálisis ácida o básica y hay definitivamente ventajas para el uso de la tecnología de enzimas. La reacción puede llevarse a temperatura y presión ambiente con el uso de un catalizador natural. Estas condiciones suaves podrían limitar parte de la reacción, y por la preferencia de la enzima y los materiales crudos, es posible producir productos muy específicos y reportes recientes indican que es posible obtenerlos en una alta concentración (Posorske, 1984 y Schmid, 1987).

Un producto comercial llamado "Lipozyme", el cual es una lipasa fungal de Mucor miehei inmovilizada en una resina sintética, puede ser obtenida de los Laboratorios Novo y la enzima puede ser usada para la síntesis comercial de ésteres (Miller, 1988).

Esterasas, lipasas y amidasas son ampliamente usadas en resoluciones de mezclas racémicas. Por ejemplo, ciertos epoxiésteres pueden ser resueltos con lipasas pancreáticas de cerdo. Este procedimiento provee una alternativa a la epoxidación asimétrica de alcoholes alílicos usando metales de transición.

Las esterazas de hígado de cerdo han sido aplicadas en síntesis asimétricas de ácido cristémico, permetrínico y carónico de sus correspondientes metil-ésteres racémicos (Wolfgang, 1990).

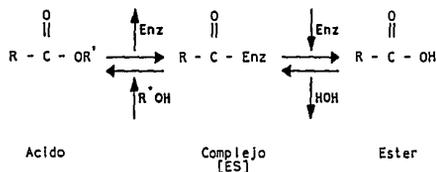
La calidad de los productos (ésteres) los cuales se sintetizan por enzimas son normalmente mejores que los productos derivados químicamente, pues la baja temperatura de reacción y el evitar una catálisis ácida fuerte impiden la degradación de productos (Miller, 1988).

El esquema de la síntesis de ésteres se muestra en la siguiente figura.

Reacción que se lleva a cabo para la síntesis de ésteres por una lipasa.

Síntesis enzimática de ésteres (Miller, 1988)

$R'OH > HOH$



### 2.5.8. Confitería

Las cremas lipolizadas ayudan en el incremento del sabor en dulces, pasteles de queso, "dips" y pastas dulces. Para sabores delicados o suaves se usan productos que tienen de 0.05-0.1% de ingrediente modificado en su composición y para sabores más pronunciados, de 0.1-0.5%, basado en el peso del producto final. El aceite de mantequilla parcialmente hidrolizado es usado en cereales y bocadillos, como el aceite usado para palomitas de maíz. La formulación, así como, el proceso de elaboración son mencionados por Kilara, 1985.

Con sustratos lipolizados dispersos en agentes apropiados, como almidón, suero en polvo o secados por aspersión, se pueden tener sabores para espolvorear productos como botanas infladas y papas fritas. Si se usa en la masa de galletitas "crackers" les otorga una buena característica de queso, resistiendo el proceso de horneado. También es posible saborizar crema para rellenar obleas. etc (Arnold, 1975)

### 2.5.9. Interesterificación

La habilidad para producir nuevas mezclas de triglicéridos usando lipasas específicas es de interés para la industria de aceites y grasas porque algunas de estas mezclas

tienen propiedades valiosas. Hay patentes que muestran que las lipasas microbianas pueden ser usadas para catalizar reacciones de interesterificación. Como se mencionó previamente, la reacción de la lipasa es reversible así que la hidrólisis y resíntesis de glicéridos ocurre cuando la lipasa es incubada con aceites y grasas. Este rompimiento y resíntesis causa migración de acilos entre las moléculas de glicéridos y dan productos interesterificados. Bajo condiciones en las que se restringe la cantidad de agua en el sistema de reacción, la hidrólisis de la grasa puede ser minimizada para que la lipasa catalice la interesterificación como reacción dominante (Macrae<sup>b</sup>, 1983). El intercambio puede ser catalizado químicamente y el resultado de esta interesterificación enzimática con enzimas específicas para cada ácido graso, de acuerdo al tamaño de cadena o posición, resulta en un mayor control de producto final (Posorske, 1984).

La interesterificación es un proceso en el cual la composición de las grasas puede ser modificado con un cambio neto en las propiedades físicas. El metóxido de sodio o sodio metálico promueve la migración de acilos entre las moléculas de glicéridos obteniéndose una distribución al azar. En vez de sodio metálico las lipasas microbianas pueden actuar para catalizar la reacción de interesterificación. Por medio de esta reacción un triglicérido barato puede ser transformado en un triglicérido costoso, siendo el ejemplo más representativo la obtención de manteca de cacao, la cual tiene un gran número de usos en formulaciones de alimentos y cosméticos (Lie, 1992) y es de gran aplicación en la industria de confitería y chocolate.

La aplicación particular de la reacción para la obtención de manteca de cacao se menciona por Macrae y Hammond, 1985; Kilara, 1985; Bloomer, 1990; Osterberg, 1989; Posorske, 1988; Harwood, 1989. La obtención de manteca de cacao se ha intentado hacer con enzima inmovilizada, para el reuso de la enzima es importante por razones de economía de proceso. La inmovilización de la lipasa es necesaria para

facilitar la recuperación de la enzima para reuso y además para llevar a cabo un proceso continuo.

Hay muchos factores los cuales tienen influencia en el perfeccionamiento de la preparación de enzimas inmovilizadas. Algunos de los más importantes son el solvente en el que se trabajara el material de soporte y el contenido de agua (Bloomer, 1990).

#### **2.5.10. Taxonomía y microbiología médica**

La producción de lipasas y esterases ha sido investigada como un método de clasificación de bacterias y como una posible forma de identificación y detección de cepas patogénicas (Bloquel, 1984).

#### **2.5.11. Saborizante en lácteos**

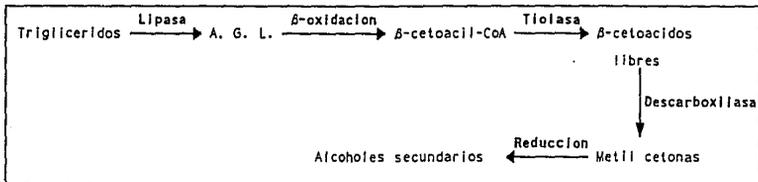
El desarrollo del sabor en algunos productos lácteos puede ser atribuido a la acción de enzimas sobre la grasa de leche. Las enzimas lipolíticas son usadas para incrementar la formación del sabor en quesos y producir preparaciones con sabor a mantequilla y queso, de aceite de mantequilla y leche entera en polvo. La aplicación de enzimas lipolíticas para el desarrollo del sabor en productos lácteos ha sido revisada por Arnold, 1975. Se sabe que la lipasa de Mucor miehei puede sustituir a las lipasas pregástricas animales, como agente para el desarrollo del sabor en quesos italianos duros (Fox, 1993).

El uso de la lipasa refuerza el desarrollo del sabor mediante la lipólisis de las grasas presentes en los alimentos. Permite la producción de sabores únicos y además de sabores que sólo pueden obtenerse mediante alternativas más costosas. El efecto del sabor de los sustratos como nata y grasa de leche, puede aumentarse considerablemente mediante el tratamiento con lipasa (Novo, 1987).

Es muy difícil de caracterizar el sabor del queso químicamente. Sin embargo hay ciertos compuestos que pueden ser considerados como contribuyentes significantes en

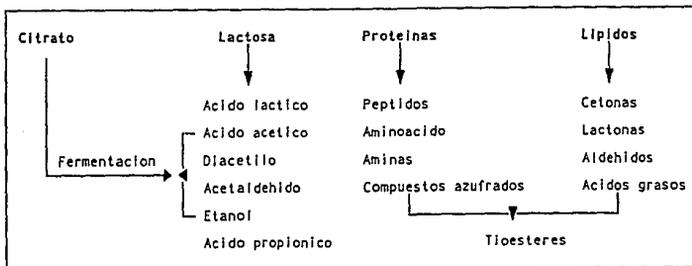
el sabor particular del queso. La lipólisis es una reacción importante en el desarrollo del sabor del queso, pues los ácidos grasos libres son los mejores contribuyentes a las características de este sabor.

Las características de sabor se atribuyen a la producción de metilcetonas y sus correspondientes alcoholes secundarios. Estos compuestos son derivados de la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos (Moskowitz, 1987), como se esquematiza a continuación



(Moskowitz & Noelck, 1987).

No sólo la grasa es importante en el desarrollo del sabor. Las proteínas y la lactosa también son precursores de compuestos que originan sabor



(Law, 1984)

En los quesos modificados por enzimas se aceleran los cambios experimentados por los quesos mediante un proceso de maduración natural.

Este tipo de queso fue diseñado para proporcionar una fuente concentrada de sabor, pueden utilizarse como sustitutos de queso, en productos de quesos procesados.

Se puede ahorrar más utilizando el queso modificado por enzimas para reemplazar un queso añejo que reemplazándolo con un queso joven.

Con el interés actual en reducir el consumo de calorías y de colesterol, ha aparecido una nueva generación de productos queseros ha aparecido en el mercado. En estos productos el contenido de grasa se ha reducido al utilizar sólo queso de leche desnatada que se mezcla con queso normal añadiendo caseinato o suero adicional, sin incluir crema o aceite vegetal. Todos estos cambios resultan en la pérdida del sabor de queso típico. En estos productos los quesos modificados por enzimas ofrecen una fuente concentrada de sabor a queso con menos calorías (Talbot, 1981).

Los avances en maduración acelerada de queso son reportados por (El Soda, M. A., 1993), y fundamentalmente consisten en controlar la acción enzimática por atrapamiento y en la utilización simultanea de enzimas y microorganismos.

### 3. Lipasas de Rhizopus delemar

Rhizopus delemar produce tres clases de lipasas (A,B, y C), en el medio de cultivo lo cual se reportó por Iwai, 1966. Sin embargo Haas (1992) sólo encuentra una. En dos estudios acerca de las propiedades de las mismas se reporta para las enzimas A y C lo indicado en las Tablas 11 y 12.

Además se probó la acción de las enzimas en diferentes sustratos obteniéndose como resultado que tanto para A como para C, el mejor sustrato es la tributirina, seguido de trioleina. Las lipasas fueron activadas en presencia de iones calcio y se consideró que la activación depende del estado de emulsificación de la mezcla de reacción por la formación de sales de calcio con ácidos grasos libres. Por otra parte las lipasas fueron inactivadas por iones  $Fe^{2+}$  y  $Fe^{3+}$ . Debido a que forman complejos con los ácidos grasos ionizados cambiando su solubilidad, y el comportamiento de las interfases. Se

demonstró también el efecto que tenían las proteínas sobre la enzima; la inactivación de lipasas por proteasas depende de las diferentes características de estructura de las lipasas y la especificidad de la proteasa.

Tabla No. 11

ENZIMA	A	C
pH OPTIMO	5.6	5.6
T° OPTIMA (60min de reaccion)	35	35
ESTABILIDAD A pH (30°C/24h)	3-8	4.7
TERMOESTABILIDAD °C (pH=5.6/15min)	65	45
ACTIVIDAD ESPECIFICA (U/mg proteina)	7000	22000

(Tsujijsaka, 1972)

Tabla No. 12

ENZIMA	PESO MOLECULAR DALTONS
A'	76,000
B'	60,000
C'	45,000

(Tahoun, 1986)

Según este autor, la producción de las tres lipasas no depende de la clase o fuente de carbono empleada, más sí sugiere que el incremento en la producción de la lipasas B y el decremento de la lipasa C, no depende la proteína empleada, a diferencia de la longitud de los péptidos o la composición de los aminoácidos. La lipasa A, es una proteína diferente a las lipasas B y C, pues éstas parecen ser idénticas. La molécula de la lipasa C pudo ser parcialmente modificada después de la secreción (Iwai, 1974). Se estudió el efecto de los fosfolípidos y se determinó que el incremento en la actividad de la lipoproteína de C fue considerable al tratarse esta enzima con fosfolípidos. Este incremento depende de las condiciones de tratamiento, como son la concentración de fosfolípidos, el tiempo y la temperatura del tratamiento así como la variedad de fosfolípidos empleados (Iwai, 1979). Posteriormente se estudió específicamente el efecto de fosfatidilcolina y la cardiolipina (Iwai, 1980), llegando a la

conclusión de que la modificación en la lipasa era reversible. Esto se comprobó al disminuir la concentración de fosfatidilcolina y comprobando que se recuperan las propiedades iniciales de la fosfolipasa y pH<sub>i</sub>. Estos difieren ligeramente de la lipasa original, sugiriéndose que el tratamiento realizado no elimina completamente la fosfatidilcolina ligada a la enzima (Shimada, 1981). La interacción de la enzima con fosfolípidos incrementa la actividad de ésta sobre los ésteres solubles en agua lo que se explica como resultado de un cambio estructural del sitio catalítico de la lipasa al vincularse con fosfatidilcolina (Shimada, 1983).

El efecto de la limitación de oxígeno sobre la producción de la enzima se demostró experimentalmente utilizando diferentes tamaños de inóculo. Un inóculo pequeño forma "pellets" tan grandes que se limita la difusión de oxígeno en el mismo, mientras que en un inóculo grande la transferencia de oxígeno puede ser limitada por un alto consumo en el matraz. En conclusión se tiene que una baja concentración de oxígeno implica una baja producción de enzima, pues una concentración de oxígeno mínima tiene grandes efectos sobre el metabolismo de los hongos (Giuseppin, 1984).

La producción de la enzima con respecto a la fuente de carbono empleada se reportó recientemente (Espinosa<sup>a</sup>, 1990). Las dextrinas son la mejor fuente de carbono trabajando a un tiempo fijo de 96 hrs de fermentación y con una concentración de 1% . En este mismo artículo se reporta el efecto de posibles inductores y surfactantes sobre el crecimiento y producción de lipasa de este hongo, así como el efecto de las diferentes fuentes de nitrógeno. Se concluye que la enzima no es inducible, pero los aceites ejercen un efecto positivo como buenas fuentes de carbono.

El estudio concerniente a Rhizopus delemar para la síntesis de triglicéridos a partir de diferentes ácidos grasos, así como el efecto de las condiciones de reacción y el grado de síntesis de triglicéridos y la especificidad de las enzimas fue investigado y reportado por (Tahoun, 1986) mientras que varios productos químicos que inhiben la síntesis de los glicéridos por estas enzimas son reportados por Tahoun, 1988.

### 3.1. Análisis de actividad " in situ "

Ante el hecho de que se desconoce si esta cepa de Rhizopus delemar produce más de una lipasa y de que cabe la posibilidad de que cada una, sea regulada en forma diferente por las diversas fuentes de carbono tal como ocurre con las diversas celulasas de T reesei (Messner, 1990), o para detectar este hecho, la herramienta más adecuada es la realización de zimogramas o geles de electroforesis que permitan detectar actividad y asociar las bandas visibles a la acción sobre el sustrato.

## **4. MATERIALES Y METODOS**

### **4.1. Ceba**

La cepa empleada en este trabajo es Rhizopus deleamar CDBB H313 y se obtuvo del cepario del Departamento de Biotecnología del CINVESTAV en el Instituto Politécnico Nacional.

La cepa se mantiene en "slants" de PDA (agar/papa/dextrosa) cubierta con aceite de parafina estéril y a una temperatura de refrigeración de 4° C.

Para iniciar la fermentación se parte de una cosecha de esporas que se obtiene sembrando a partir de un "slant" de 4 a 6 matraces de 500 ml con PDA e incubando a 29°C por 6 días , que es el tiempo requerido para la esporulación del microorganismo. Pasado este tiempo se procede a la cosecha de esporas.

### **4.2. Cosecha de esporas**

Se esterilizan matraces de 250 ml con 100 ml de glicerina al 50%.

En una campana de flujo laminar o en condiciones estériles, se va tomando el micelio de los matraces de 500 ml donde creció el microorganismo y se coloca en el glicerina. Se agita el matraz donde fue transferido el micelio en un vortex, repitiendo esto con cada uno de los matraces. Se agita hasta obtener una suspensión de esporas de aproximadamente 0.06 de absorbancia a una Lambda de 540 nm.

Por separado se toman 2ml de la suspensión de esporas más 5ml de agua destilada y se leen en el espectrofotómetro ( Shimadzu UV - 120 - 02 ) a 540 nm. Utilizando como blanco una solución de glicerina al 50%.

Es importante mencionar que el micelio que quede tanto en los matraces como en los tubos que se van a leer debe retirarse para que la suspensión de esporas quede libre del mismo.

Finalmente se guarda la suspensión de esporas en tubos de ensayo de 12 X 175 con

tapón de rosca, poniendo 10ml de la suspensión en cada uno. Los tubos deben ser previamente esterilizados, una vez cerrados se refuerzan con parafilm y se conservan en refrigeración a 4°C.

#### 4.3. Medio empleado en las fermentaciones

Una vez que se recuperan las esporas se procede a montar la fermentación para la cual se emplea el medio D (Celerin y Fergus, 1971, modificado según Espinosa, 1990).

##### Medio "D"

Glucosa.....	10.0 g/l
Casaminoácidos.....	10.0 g/l
KNO <sub>3</sub> .....	2.0 g/l
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O.....	0.5 g/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	1.0 g/l
Biotina.....	5.0 µg/l
Tiamina.....	100.0 µg/l
*Aceite de oliva.....	20.0 ml/l
Solución de elementos traza.....	1.0 ml/l

Nota: Se ajusta el pH 7 antes de agregar los elementos traza y el aceite de oliva.

\* Se adiciona sólo cuando el medio es suplementado y se agrega al final, por separado, 1ml por cada 50ml de medio.

"Solución de elementos traza "

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

La fuente de carbono (glucosa) fue sustituida por otros carbohidratos pero en la misma proporción así como por glicerina y aceite de oliva.

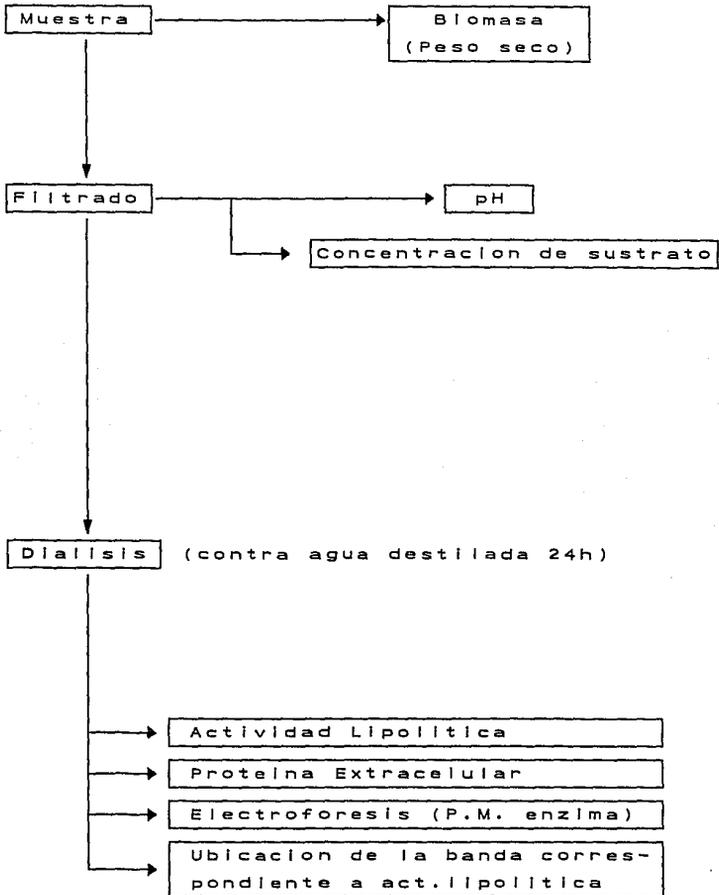
Las fuentes de carbono empleadas son: Glucosa, dextrinas, almidón, sacarosa, fructosa, lactosa, galactosa, maltosa, glicerina y aceite de oliva. Para sustituir el glicerina y aceite de oliva se tomó en cuenta su densidad, que es de 1.2608 y 0.912, respectivamente.

#### **4.4. Montaje de la fermentación**

- En matraces de 250ml se colocan 50ml de medio D y se esterilizan a 121°C por 15 min.
- Se inocula en la campana de flujo laminar o bajo condiciones estériles con 2ml de la suspensión de esporas cada uno de los matraces.
- Los matraces se colocan en la incubadora a 29°C con agitación a 150 rpm y por un período de 96 horas, siguiendo la evolución de la fermentación, muestreando cada 24 horas.
- Siguiendo el esquema de trabajo mostrado en la figura 14

Figura 14

Tratamiento de muestras posterior a la fermentacion



#### **4.5. Biomasa (peso seco)**

Se filtran las muestras en sistema millipore, utilizando papel filtro whatman # 1, puesto previamente a peso constante.

La biomasa se coloca en una estufa a 60°C por 24 horas, pasado este tiempo se pesa y por diferencia se calcula el peso seco.

Al filtrado se le mide el pH en Potenciómetro ( Orion 520 A ) y de 10 a 15 ml del mismo se le dializa en bolsitas (Spectrapor ) con un rango de expulsión se 12000 a 14000, contra agua destilada a 4°C y por 24 horas.

#### **4.6. Actividad lipolítica**

En un baño a temperatura constante de 37°C y con agitación se hacen las mediciones utilizando un potenciómetro (Orion 520 A ), que detecta la disminución en los valores de pH, por liberación de ácidos grasos. Los resultados así obtenidos, se comparan con una curva de ácido butírico al 0.5% y se obtienen los valores de actividad en micromoles de ácido butírico liberados por minuto con un mililitro de enzima (Menassa, 1982).

Se define como una unidad las micromoles de ácido butírico liberado en un minuto de reacción bajo las condiciones antes mencionadas.

#### **4.7. Proteína extracelular**

Se toman alícuotas de 0.5 ml del filtrado dializado llevándose a un volumen final de 1ml con agua destilada.

Se adicionan 5ml de reactivo E y se deja reposar 10 min.

Se agregan 0.5ml de reactivo de Folin 1:1 en agua destilada, y se agita vigorosamente,

se dejan reposar por espacio de 30 min en la oscuridad.

Las muestras se leen en un espectrofotómetro ( Shimadzu UV - 120 - 02 ) a 590 nm y se obtiene el valor de proteína interpolando los valores leídos en una curva estandar de albúmina (Lowry, 1951).

#### Reactivos Empleados:

Reactivo A	CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O al 1% en agua destilada.
Reactivo B	Tartrato doble de sodio y potasio al 2% .
Reactivo C	NaOH (0.1N) + Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (2%)
Reactivo D	1 A + 1B
Reactivo E	1D + 50C

#### 4.8. Consumo de sustrato , carbohidratos (fenol sulfúrico)

A un mililitro de filtrado sin dializar, se le adiciona 1ml de fenol al 5% y 5ml de ácido sulfúrico concentrado, agitando vigorosamente (en vortex) los tubos.

Se dejan reposar 10 min y se vuelven a agitar (en vortex). Se incuban en un baño de agua de 20°C a 30°C por 20 min y se leen en un espectrofotómetro ( Shimadzu UV - 120 - 02 ) a 490 nm. Se interpolan los datos leídos en la curva patrón del azúcar correspondiente. (Dubois, 1956).

Nota: El consumo de aceite de oliva y glicerina se midió por extracción con cloroformo (gravimétricamente) (Corzo, 1992).

#### 4.9. Precipitación de la enzima

Se realiza un purificación parcial de la enzima, al precipitar las proteínas con acetona (Okeke, 1981) a temperaturas inferiores a los 0°C. Esto se logra al enfriar acetona en un baño de hielo seco, con acetona y NaCl y se hace lo mismo con el filtrado evitando

que se congele.

Se llena una bureta con acetona fría y se añade el solvente gota a gota a la muestra, con agitación constante. Se mantiene frío sin congelar.

Se suspende la adición de acetona cuando el volumen añadido es por lo menos el triple del volumen de filtrado utilizado.

Se centrifuga a 7000 rpm durante 10 minutos, se decanta y resuspende en el mínimo volumen de agua.

Se determina la cantidad de proteína por el método de Lowry.

El liofilizado se lleva a cabo en frascos viales hasta eliminación total de agua. Se suspende en la mínima cantidad de agua, y si el volumen lo permite se determina proteína por el método de Lowry.

Nota: La muestra liofilizada debe ser hidratada poco antes de llevar a cabo la electroforesis. Una vez resuspendida la muestra se debe guardar en congelación.

#### 4.10. Electroforesis

Electroforesis (Laemmli, 1970 y Aguilar, 1991 )

Concentración de acrilamida	10%T, 2.7%C	4%T, 2.7%C
Solución 1	3.33 ml	0.67 ml
Buffer 3	2.50 ml	.....
Buffer 4	.....	1.25 ml
Solución 5	0.10 ml	50 µl
Agua	4.0 ml	3.0 ml
Solución 6	50 µl	25 µl
TEMED	5 µl	2 µl
Volumen Final	10 ml	5 ml

En un matraz kitasato de 50 ml mezclar los reactivos en la proporción indicada para el gel inferior (10%), excluyendo el TEMED y la solución 6.

Colocar en agitación al vacío, durante 7 min para degasar, y evitar que el oxígeno disuelto haga lenta la reacción.

Una vez degasada la muestra, se añade el TEMED y la solución 6. Se vierte en la cámara (Mini Protean II, Biorad) y se añaden unas gotas de solución de isopropanol (al 50%) en agua, para asegurar bordes lisos.

Una vez gelificado, se enjuaga con agua destilada y se seca con papel filtro.

Se repite el procedimiento para el gel superior (4%).

Antes de la gelificación se coloca el peine para la formación de los carriles. Ya gelificado, se retira el peine, y se enjuaga con agua destilada y se seca con papel filtro.

Se cargan las muestras con ayuda de una jeringa para cromatografía de gases (Unimetrics, TP 5050-1 de 50 µl).

se llena la cámara con el buffer y se corre a corriente constante de 30 mA. La corrida toma aproximadamente 1.30 horas para geles de 9X6 cm y con un espesor de 1.5 mm.

#### **Preparación de muestras:**

En tubos eppendorf, se coloca el volumen de muestra correspondiente aproximadamente de 200 microgramos de proteína, y se añade la misma cantidad de colorante.

Se llevan las muestras a ebullición durante 60 seg y se colocan en hielo. Ya frías se cargan en los carriles y se procede a la corrida. El mismo tratamiento se aplica a los marcadores de Peso Molecular

Terminada la corrida el gel se tiñe, por 24 horas y posteriormente, se destiñe con ácido acético para observar las bandas obtenidas.

### **Soluciones empleadas para electroforesis**

Solución 1 : 58.4 g de acrilamida y 1.6 g de bisacrilamida se disuelven en 200 ml de agua destilada y se almacenan a 4°C. La acrilamida es neurotóxica, por lo que la solución debe ser preparada y manejada con sumo cuidado.

Buffer 3 (Tris - Cl 1.5M) : 36.3 g de tris se disuelven en 100 ml de agua destilada, ajustando el pH a 8.8 con HCl y aforando a 200 ml.

Buffer 4 (Tris - Cl 0.5M) : 3 g de tris se disuelven en 25 ml de agua destilada, ajustando el pH a 6.8 y aforando a 50 ml.

Solución 5 (SDS 10%) : 50g de SDS se disuelven en 500 ml de agua destilada y se conserva a temperatura ambiente.

Solución 6 (Persulfato de amonio 10%) : 0.5 g de persulfato de amonio se disuelven en 5 ml de agua destilada, se dividen en alícuotas y se conservan en refrigeración.

Colorante de las muestras : Se mezclan en un tubo de ensayo 2.5 ml de la solución 4, 4 ml de la solución 5, 2.0 ml de glicerina, 1.0 ml de 2 mercaptoetanol y se llevan a un volumen final de 10 ml, añadiéndose un poco de color en polvo de azul de coomassie R 250. Se mezcla bien y se divide en alícuotas que se conservaran congeladas.

Buffer de corrida (Tris 0.025M Glicina 0.192M SDS 0.1%) : 12 g de tris y 57.6 g de Glicina se disuelven en agua destilada y se añaden 40 ml de la solución 5, ajustando el pH a 8.3 y aforando a 4 litros. Esta solución se mantiene en refrigeración.

Solución teñidora: A 62.5 ml de una solución stock de azul de coomassie R 250 al 10% se le añaden 250 ml de metanol y 50 ml de ácido acético llevando a un volumen final de 500 ml con agua destilada.

Solución desteñidora: 500 ml de metanol mas 100 ml de ácido acético se aforan a un litro con agua destilada. Esta solución se prepara al momento de usarla.

Se debe hacer mención de que todas las soluciones antes mencionadas deben ser filtradas a través de papel Whatman # 1 inmediatamente después de preparadas para su posterior almacenamiento y/o uso.

#### **4.10.1. Técnicas para medir actividad " in situ "**

1.- Incubación tipo sandwich: Se prepara un gel de agarosa con una concentración de 1.5 %, en el cual se emulsifica el sustrato a probar ( tributirina o aceite de oliva ) en una concentración del 5 % y una solución al 0.05 % de rodamina (1:1) con respecto a la agarosa. Se utiliza como emulsificante Tritón X-100 al 1 % con respecto a la agarosa. Se agita a la máxima velocidad en el vortex por espacio de 20 a 30 minutos, hasta lograr una sola fase, esperando que la emulsión sea estable por lo menos 10 minutos.

Una vez que se tiene la emulsión estable se procede a vaciar en un vidrio de (23 x 23 cm) al que previamente se le colocó cinta para cubrir en la orillas para evitar que se

escurra antes de solidificar y procurando que el gel sea lo más delgado posible. Teniendo el gel sólido se coloca sobre éste el gel donde se corrieron las muestras sin teñir y previamente enjuagado con buffer de tris-maleatos pH 6 por tres veces con intervalos de 30 minutos cada uno.

Se pone a incubar por 24 horas con buffer de tris-maleatos pH 6 que apenas y toque los geles para evitar su separación, pasado el tiempo se observan las bandas de color verde-amarillo fluorescentes, a la altura de la banda donde se encuentra la lipasa.

2.- Réplica en papel: Se cortan cuadros de papel filtro Whatman # 1 de (12x9 cm) se colocan sobre una charola y se les van agregando poco a poco 6 ml de una emulsión de tributirina al (50 %, 20 % ó 5 % ) como toda la emulsión no puede ser absorbida por el papel se va añadiendo 1 ml y se coloca en la estufa a 50 °C hasta que se seca y así se continúa hasta terminar los 6 ml. Ya seco el papel se pone en una charola honda y sobre éste se coloca el gel donde se corrieron las muestras, dejando el vidrio del gel de corrida encima para añadir buffer de tris-maleatos pH 6 y evitar el defasamiento del gel o del papel durante la incubación de 24 horas.

Después de incubar se procede a teñir el papel con spray de una solución de azul de bromocresol que se prepara como sigue:

Azul de bromocresol.- 0.1g de azul de bromocresol se disuelven en 18 ml de NaOH 0.1N y se añaden 450 ml de agua destilada, ya preparado se guarda en refrigeración.

Al esprear el papel se observan manchas color amarillo donde se liberaron ácidos grasos por la hidrólisis con la lipasa, por lo que se puede determinar cual es la banda que corresponde a dicha enzima.

3.- Gel réplica específico para lipasa: (Höfelmann,1983) sustituyendo el buffer de succinatos pH 6 por buffer de tris-maleatos pH 6.

4.- Técnica de transferencia: Se corre el gel para separación de bandas y se prepara un papel filtro (# 5, filtración lenta) con una emulsión de tributirina al 5 % al igual que

en la técnica de réplica en papel. Se coloca en una charola el gel de corrida y sobre éste el papel filtro que encima tiene aproximadamente 400g de toallas sanitas, presionando éstas homogéneamente, y poniendo buffer (tris-maleatos pH 6 ) suficiente para que por capilaridad suba pasando por el gel y el papel filtro quedando en este último, las proteínas que difunden, se procede a incubar por 24 horas y transcurrida la incubación se tiñe el papel filtro con una solución de azul de bromocresol como se indica en la técnica de réplica en papel, para observar manchas amarillas a la altura de la banda correspondiente a lipasa.

5.- Copolimerización acoplada: Se prepara el gel de acrilamida, como se indica en la técnica general, pero emulsificando en éste el sustrato ( aceite de oliva al 5 % con respecto a la acrilamida y la solución de rodamina al 0.05 % ) empleando Tritón X-100 al 1 % como emulsificante. Esta emulsión se pone en la cámara de electroforesis como ya se indicó, haciendo los carriles. Ya sólido se cargan las muestras, se corre el gel, esperando que conforme corre la muestra se vaya hidrolizando el aceite de oliva, con la liberación de los ácidos grasos y por ende se puede observar fluorescencia por la reacción con la rodamina deteniéndose ésta a la altura donde se retiene la lipasa en el gel.

6.- Modificación a copolimerización acoplada: Se prepara el gel de corrida igual que la técnica anterior, pero suprimiendo de la emulsión la rodamina, una vez que se termina de correr el gel se lava con buffer de tris-maleatos pH 6 y se tiñe en una solución de rodamina al 0.05 % para observar manchas fluorescentes si el sustrato fue consumido y saber a qué altura queda la banda que corresponde a lipasa. Este mismo procedimiento se sigue pero al final se tiñe con una solución de azul de bromocresol, observándose manchas amarillas donde queda la lipasa después de la corrida ( esto es similar a lo observado en réplica en papel).

#### 4.10.2. Determinación de actividad en cajas petri

Se prepara agar al 12.5 % de concentración y se calienta hasta su completa disolución añadiendosele 1 % de tributirina, se licúa por espacio de 5 minutos hasta formar una emulsión, se esteriliza por 15 minutos a 121°C, se deja enfriar y antes de que solidifique se vacía en cajas petri dejando solidificar.

Una vez sólido se colocan círculos de papel filtro impregnados con las muestras a probar, y se incuban por espacio de 24 horas a 37°C. Después de la incubación se observan halos de claridad, en las muestras que presenten actividad.

Las condiciones probadas fueron: muestras hervidas (60 seg.) y con mercaptoetanol  
muestras hervidas (60 seg.) y sin mercaptoetanol  
muestras sin hervir y con mercaptoetanol  
muestras sin hervir y sin mercaptoetanol (control)

#### 4.11. Análisis estadístico

Se realizó un diseño experimental aleatorio. Se llevaron a cabo tres fermentaciones independientes para cada condición, con duplicados para cada tiempo. Las determinaciones de cada parámetro a su vez, se realizaron por triplicado.

Se trabajó a partir de datos individuales de las muestras analizadas, para obtener un análisis básico de producción y crecimiento para la enzima (Lipasa) a partir de R. delemar.

Determinaciones realizadas

PARAMETRO	UNIDADES
1.- Biomasa	mg / volumen
2.- Actividad lipolitica volumetrica	U.I.
3.- Proteina extracelular	$\mu$ g prot. / ml
4.- Productividad de la fermentacion	U.I. / h
5.- Actividad lipolitica especifica	U.I. / mg de biomasa
6.- Sustrato consumido	mg / ml
7.- Velocidad de consumo	mg / ml.h
8.- Rendimiento de producto	U.I. / mg sus.
9.- Rendimiento de biomasa	mg de biomasa. / mg sus.
10.-pH	
11.-Velocidad de crecimiento ( $\mu$ )	$h^{-1}$

Después de realizados los cálculos, se sometieron a un análisis estadístico, llevado a cabo con el sistema SPSS, realizando un análisis de varianza para determinar si existe diferencia significativa entre las variables independientes ( fuente de carbono, tiempo, aceite ) al evaluar todas las variables dependientes. Si con el análisis de varianza se determina que existe diferencia significativa ( $\alpha = 0.05$  ) o una diferencia altamente significativa ( $\alpha = 0.01$ ) se calculan las pruebas de rango. Estas consisten en una comparación entre medias que nos permite decir cómo se agrupan éstas y determinar cuáles son iguales y cuál es la mejor. Se realizaron pruebas tanto de rango fijo como de rango múltiple y se seleccionó aquella que separase en mayor número de grupos a las medias. Las pruebas de rango realizadas fueron LSD, Tukey, Duncan y SNK, así como un análisis de tendencias para los tiempos. Los resultados se presentan como promedios con desviación estándar, calculados con el mismo paquete estadístico y se muestran en los anexos.

## 5. Resultados y discusión

La solución a las interrogantes planteadas en torno al efecto de la fuente de carbono se buscó mediante la construcción de tres grupos experimentales, empleando un diseño aleatorio. Estos fueron:

- (I) carbohidratos como única fuente de carbono
- (II) aceite de oliva al 2%, suplementado con carbohidratos
- (III) aceite de oliva en dos concentraciones.

A continuación se presenta un análisis de los resultados más importantes obtenidos con cada uno de ellos y se realiza un análisis conjunto que permita esclarecer los fenómenos que se presentan.

### 5.1. Grupo I (carbohidratos como única fuente de carbono)

El grupo I, en el que se emplean exclusivamente carbohidratos como fuente de carbono, se incluyó con el objeto de establecer si la producción de la enzima es constitutiva y si existe algún fenómeno regulatorio ejercido por los diferentes carbohidratos relacionado con la facilidad con la que son asimilados. El estudio se realizó en forma cinética pues los trabajos previos reportan los resultados a tiempo fijo (Iwai, 1974 y Espinosa<sup>a</sup>, 1990).

En las Figuras 1 - 9 se observa el crecimiento, medido como peso seco de biomasa cada 24 h, obtenido con los diferentes carbohidratos. Entre ellos, el almidón proporciona los mejores resultados. Sin embargo, este polímero presenta una fase lag pronunciada, infiriéndose que ésto se debe a la falta de enzimas para su hidrólisis o a un retraso en la producción de las mismas. En Oriente se emplean microorganismos de este género para la fermentación de sustratos amiláceos, por lo que esta enzima debe estar presente. Con las dextrinas no se observa esta fase lag, seguramente por

la glucosa libre que contienen. El hecho de que se obtenga un bajo crecimiento cuando la fuente de carbono son disacáridos como lactosa, maltosa, y sacarosa, permite suponer que el microorganismo carece o tiene poco activas las enzimas involucradas en su metabolismo. No se tiene información con respecto a este género, pero en otros hongos es común el tener problemas de asimilación de disacáridos (Gadd,1988). El resultado puede ser sorpresivo en el caso de la sacarosa, puesto que este azúcar se emplea en numerosos procesos fermentativos; sin embargo, puede ser explicado al observar los pobres resultados obtenidos con fructosa, lo que indica que este monosacárido presenta dificultades para ser metabolizado.

Un indicador de la facilidad con la que se asimilan los carbohidratos lo constituye la velocidad de crecimiento, que se presenta en la Tabla 10 para el caso del intervalo de las primeras 24 horas. El almidón es la fuente con la que se obtiene la más baja velocidad de crecimiento ya que presenta una fase lag pronunciada en el período considerado. Entre el resto de las fuentes de carbono no hay diferencias importantes en cuanto a los valores obtenidos. Ni la magnitud de crecimiento ni la velocidad están asociadas al consumo de sustrato, pues no se encuentran diferencias significativas en cuanto a la eficiencia de consumo de ninguno de los carbohidratos probados ( Anexo I, Cuadros 1 y 2 ). Todos son consumidos totalmente a las 96 h. El sustrato consumido fue evaluado por la técnica de fenol-sulfúrico para azúcares totales ante la variabilidad o falta de confiabilidad mostrada por pruebas con el método de antrona (Loewus,1951) y de azúcares reductores (Dubois,1956). Los resultados obtenidos indican que las diferencias de comportamiento entre los carbohidratos se deben al metabolismo al interior celular, no a defectos en el transporte o asimilación de los mismos.

El metabolismo de los carbohidratos repercute en la generación de metabolitos que acidifican o alcalinizan el medio (Figuras 1 - 9). El metabolismo de lactosa y maltosa, dos disacáridos, no genera ácidos, pues el pH final está en el rango alcalino. Coincidentemente son los dos carbohidratos con los que se obtiene menor

crecimiento. Las diferencias entre los valores obtenidos para pH permiten establecer varios grupos entre los que se presentan diferencias significativas (Anexo I, Cuadro 3). Sin embargo, estas diferencias no parecen ser suficientes para explicar los niveles de enzima obtenidos (Figuras 1 - 9). Los dos casos de actividad más baja se presentan en el pH más alcalino (7.55-7.70), mientras que valores altos y bajos de actividad se encuentran distribuidos en un rango de valores de pH más ácido (5.15-6.51).

La incorporación de la fuente de carbono al microorganismo se analiza calculando el rendimiento de biomasa (Ys). Comparando los valores reportados en la Tabla 11 se observa que para el caso de la fructosa, a pesar de que es el que se consume más eficientemente, es de los que menos se incorpora a biomasa. Otros carbohidratos cuyo consumo es más lento son mejor asimilados, como almidón, dextrina, sacarosa y glucosa, sin que se encuentren diferencias significativas entre ellos, ya que ocupan el mismo rango de valores (Anexo 1, Cuadro 4).

En todos los casos se presenta producción de enzima en ausencia de aceite. Esto confirma que la producción de la enzima es constitutiva. La máxima actividad lipolítica se presenta con la fuente que permite mayor crecimiento, que es el almidón (Figuras 1 - 9). En seguida se encuentra la producción con dextrinas y después con glucosa. Esta relación inversa entre actividad lipolítica y grado de hidrólisis del carbohidrato permite suponer la existencia de un efecto regulatorio negativo ejercido por glucosa. Recientemente, otros autores han reportado el fenómeno de regulación por glucosa en este microorganismo, al comparar el comportamiento de la producción de enzima en el medio de cultivo con glucosa y glicerina (Haas,1993). Debe señalarse que la mayor parte de los trabajos que reportan producción de lipasas en diferentes microorganismos emplean glucosa como fuente de carbono. No se reportan análisis de efectos regulatorios, excepto para R. chinensis (Nakashima,1988) y P. roqueforti (Eitenahler,1970).

Como se ha señalado, la máxima producción de enzima se presenta con la fuente que permite mejor crecimiento y, a excepción del caso de la galactosa, parece existir una correlación directa entre actividad lipolítica y crecimiento. Esto indica que las estrategias empleadas para incrementar el crecimiento podrían repercutir en elevar la actividad enzimática, tal como ha sido reportado para Rhizopus oligosporus (Nahas, 1988) y Aspergillus niger (Pal, 1978). Un problema que se presenta en este microorganismo es un crecimiento exhuberante, con presencia de hifas largas, lo que podría presentar problemas en cultivos a mayor escala.

El comportamiento de la cinética de producción de la enzima con respecto al crecimiento se observa en las mismas Figuras 1 - 9. Se puede ver que en todos los casos hay un máximo de producción a las 24 h. Los análisis estadísticos indican que para el caso de glucosa y almidón las diferencias si son significativas (Anexo I, Cuadro 5) con respecto a las muestras subsecuentes y el comportamiento es lineal (El análisis de tendencias se muestra en el Anexo II, Cuadro 1). Se puede afirmar que la producción de la enzima está parcialmente asociada a crecimiento, pues se presenta un máximo previo al inicio de la fase estacionaria (24 h) y los valores obtenidos posteriormente no difieren significativamente de los valores obtenidos a las 24 h. Se desconoce la función que pueda ejercer una lipasa expresada en forma constitutiva. Es posible que la actividad detectada provenga del proceso de germinación de esporas, lo que explicaría la rápida elevación de niveles en ausencia de lípidos en el medio de cultivo.

Al ser la lipasa una enzima extracelular es importante observar la evolución de producción de proteína extracelular. La secreción de proteínas se inicia a las 24 h de fermentación y se puede afirmar que ésta va en aumento conforme avanza el tiempo de fermentación, con un comportamiento lineal (Figura 12). Existe una estrecha correlación entre la proteína excretada y la actividad lipolítica (Tabla 13), a excepción de los resultados obtenidos para lactosa y maltosa, en los que se obtienen niveles de

proteína comparables a los de los mejores productores pero su actividad lipolítica es baja (Anexo I, Cuadro 19).

El estudio de la producción específica (referida a biomasa) se presenta para los puntos de 24 h y 96 h. Los valores de la misma son mucho más elevados a tiempo corto, y la disminución posterior sugiere que la actividad es inhibida o reprimida por productos del metabolismo (Tabla 13). Se advierte el efecto negativo ejercido por glucosa sobre la producción de enzima, pues a tiempo corto es el que menor actividad específica posee.

Al calcular el valor de  $Y_p$  (rendimiento de producto) (Tabla 14), en este caso se observa que los valores máximos se obtienen con sacarosa y almidón, sustratos con los que también se presenta el mayor  $Y_s$ , no existiendo diferencias significativas entre estas dos fuentes (Anexo I, Cuadro 6).

Las muestras provenientes de fermentaciones que empleaban glucosa, almidón y dextrinas presentan variantes en las tendencias de producción. La presencia de más de un máximo de producción permite suponer que se pueda producir más de una enzima con actividad lipolítica (Figuras 1-9). Por otra parte, el comportamiento mostrado por los experimentos efectuados con glucosa, almidón y dextrinas sugiere que se presenta un efecto regulatorio por glucosa, el que pudiera ser ejercido diferente si hay varias enzimas que poseen actividad lipolítica. Para evaluar esta hipótesis se realizaron geles de poliacrilamida con extractos crudos y se probaron diferentes métodos de detección de actividad "in situ", descritos en Materiales y Métodos. Los geles se realizaron en condiciones desnaturalizantes, en presencia de SDS, tomando en cuenta que puede lograrse la renaturalización posterior para poder medir la actividad.

Se tuvieron que realizar experimentos previos para obtener una mejor visualización de las bandas en el gel. Esto se logra mejor si las muestras están hervidas y en presencia de mercaptoetanol. Si sólo se hierven y no tienen mercaptoetanol las

bandas son difusas. Por ello, es necesario verificar en qué medida estos tratamientos inciden sobre la actividad enzimática para poderla evaluar con las técnicas de actividad "in situ". La evaluación se llevó a cabo colocando muestras tratadas de la misma manera que las muestras de corrida en electroforesis, en cajas de petri con agar y tributirina al 1% emulsificada, llevando a cabo dichas pruebas por triplicado. Se analizó el efecto de hervir o no hervir las muestras, en presencia y en ausencia de mercaptoetanol. Si se hierve en presencia de mercaptoetanol por espacio de 60 segundos no se encuentran muestras con actividad. La mera ebullición implica la pérdida de actividad en aproximadamente 50% de las muestras probadas. Estos resultados sugieren que se requieren puentes disulfuro intactos para mantener actividad. Para poder lograr visualizar las bandas y detectar actividad las muestras hervidas en presencia de mercaptoetanol fueron lavadas tres veces con agua, logrando recuperar actividad.

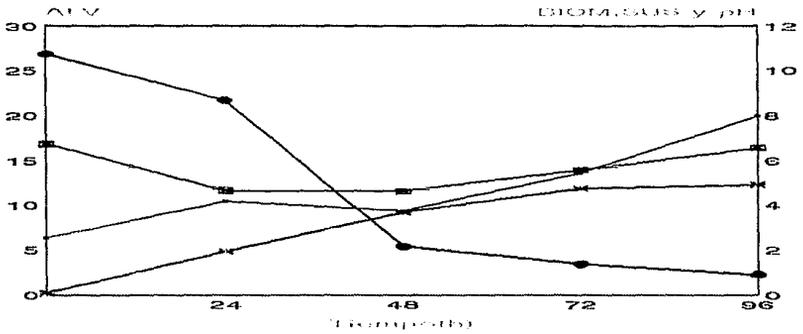
Las muestras empleadas en la electroforesis fueron tomadas a diferentes tiempos en cada una de las fuentes consideradas. Por consiguiente, a las 0 h no se detecta ninguna banda (Figura "A"). A las 24 horas de fermentación (Figura "B") se observa la aparición de una banda a la altura del tercer marcador de peso molecular para las muestras correspondientes a dextrinas (45 000 Da) y almidón (48 000 Da), siendo más intensa la muestra correspondiente a dextrinas. No se ve una banda equivalente en la muestra proveniente de glucosa, lo que coincide con baja actividad lipolítica en este momento. Aparecen cuatro bandas más, pero muy tenues, de las cuales se puede suponer son enzimas requeridas para la hidrólisis y posterior asimilación de los carbohidratos (28 000, 14 000, 5 000, 3 000 Da). A las 48 horas de fermentación (Figura "C") se observan 7 bandas definidas en la muestra correspondiente al almidón; en dextrinas sigue predominando la banda de 45 000 Da, observándose 2 bandas más, muy tenues y que apenas se podían observar a las 24 horas (28 000, 10 000 Da). En la muestra obtenida de glucosa aparece una banda (51 000 Da)

aproximadamente a la misma altura que en las dextrinas y el almidón. Las diferencias en los pesos moleculares calculados pueden deberse a problemas de manejo de muestra. A las 72 h (Figura "D") en todas las muestras se observa un incremento en el número de bandas. Esto coincide con el incremento en la concentración de proteína extracelular que se observa en el Anexo I, Cuadro 19. La banda cercana a los 45 000 Da y se intensifica la cercana a 28 000; aparece una banda nueva, con peso molecular cercano a los 14 000. Al final de la fermentación (Figura "E") el perfil de bandas no presenta diferencias, aunque se observa un ligero barrido, probablemente debido a la actividad proteolítica que se ha reportado para esta cepa (Espinosa <sup>b</sup>,1990).

De los métodos de detección de actividad " in situ " el que mejor funcionó fue el método de transferencia a papel. La única banda que presenta actividad es la de 45 000 Da, por lo que, al menos con esta metodología, debe descartarse la hipótesis de que los picos de actividad presente se deban a la presencia de dos enzimas lipolíticas. Tahoun (1986) reporta una cepa con tres enzimas lipolíticas, una de las cuales pesa 45 000 Da. Haas et al. (1991) aislan un gene de lipasa de *R. delemar* pero la proteína pesa 42 000 Da antes del procesamiento y 30 000 Da después del mismo. Esto hace suponer que es una cepa más cercana a la reportada por Tahoun.

En términos de implementación de un proceso a nivel de producción es importante considerar no sólo los niveles de actividad alcanzados, sino la productividad de la fermentación. El valor alcanzado por la fermentación llevada a cabo con dextrinas a las 24 h es el más alto (Tabla 16). Si se consideran todos los valores obtenidos a lo largo de la fermentación el valor más alto se obtiene para el almidón (Anexo I Cuadro 7). Por lo tanto, puede sugerirse el realizar fermentaciones más cortas, recomendación reforzada por el hecho de que sólo se obtiene una actividad enzimática lipolítica.

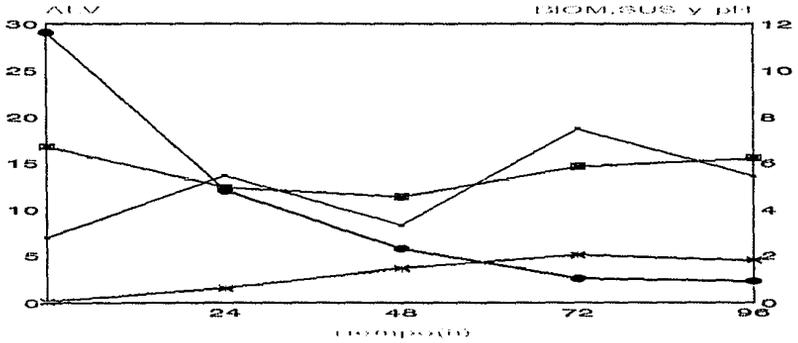
## GLUCOSA COMO UNICA FUENTE DE CARBONO



ALV (U.I.)  
  BIOMASA (mg/ml)  
  SUS (mg/ml)  
  pH

FIGURA 1

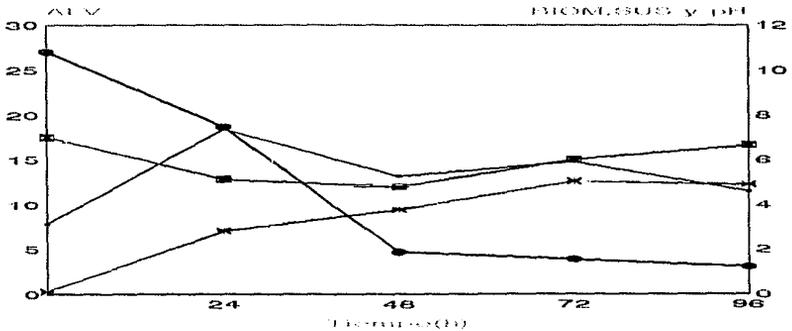
## FRUCTOSA COMO UNICA FUENTE DE CARBONO



ALV (U.I.)  
  BIOMASA (mg/ml)  
  SUS (mg/ml)  
  pH

FIGURA 2

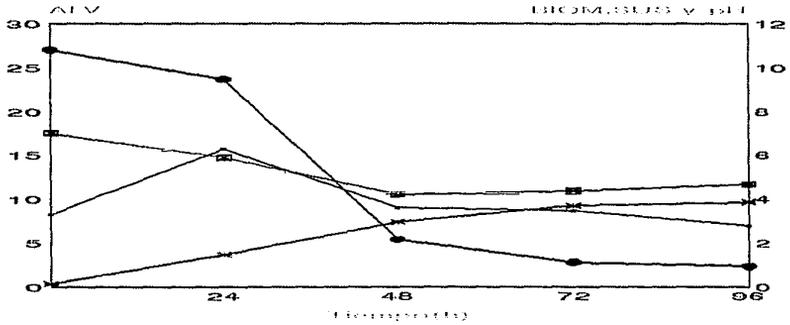
## DEXTRINAS COMO UNICA FUENTE DE CARBONO



ALV (U.I.)  
  BIOMASA (mg/ml)  
  SUS (mg/ml)  
  pH

FIGURA 3

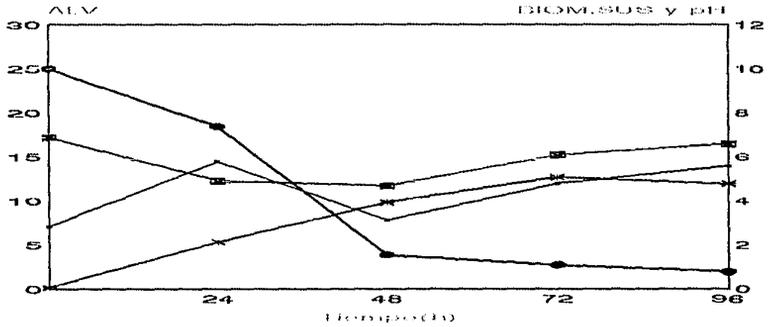
## SACAROSA COMO UNICA FUENTE DE CARBONO



— ALV(U.I.) \* BIOMASA(mg/ml) ● SUS(mg/ml) ■ pH

FIGURA 4

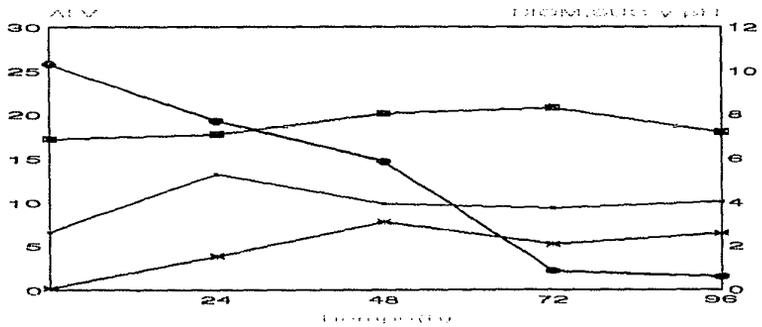
## GALACTOSA COMO UNICA FUENTE DE CARBONO



— ALV(U.I.) \* BIOMASA(mg/ml) ● SUS(mg/ml) ■ pH

FIGURA 5

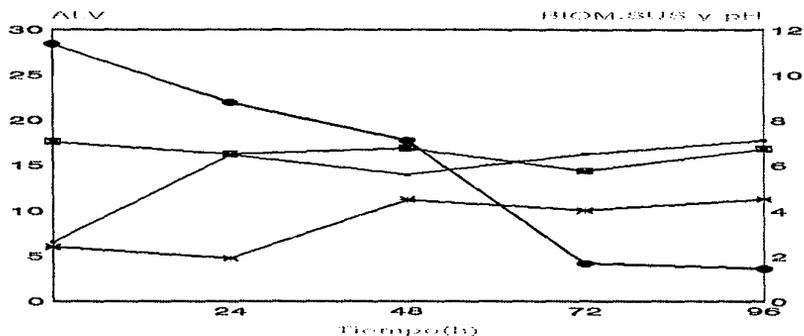
## MALTOSA COMO UNICA FUENTE DE CARBONO



— ALV(U.I.) \* BIOMASA(mg/ml) ● SUS(mg/ml) ■ pH

FIGURA 6

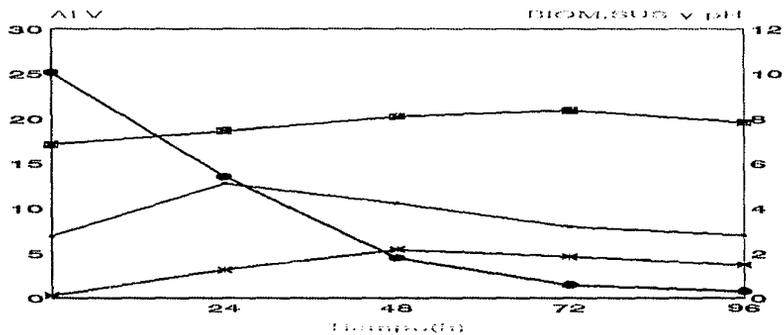
## ALMIDON COMO UNICA FUENTE DE CARBONO



— ALV(U.I) \* BIOMASA(mg/ml) ◆ SUS(mg/ml) ■ pH

FIGURA 7

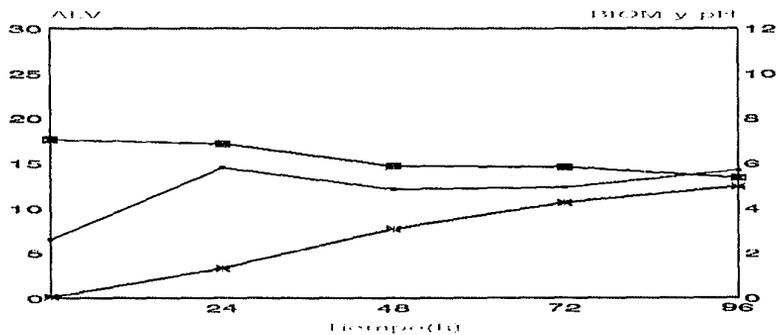
## LACTOSA COMO UNICA FUENTE DE CARBONO



— ALV(U.I) \* BIOMASA(mg/ml) ◆ SUS(mg/ml) ■ pH

FIGURA 8

## GLICERINA COMO UNICA FUENTE DE CARBONO



— ALV(U.I) \* BIOMASA(mg/ml) ■ pH

FIGURA 9

Tabla 10

VELOCIDADES DE CRECIMIENTO ( $\mu$ ) 24 HORAS

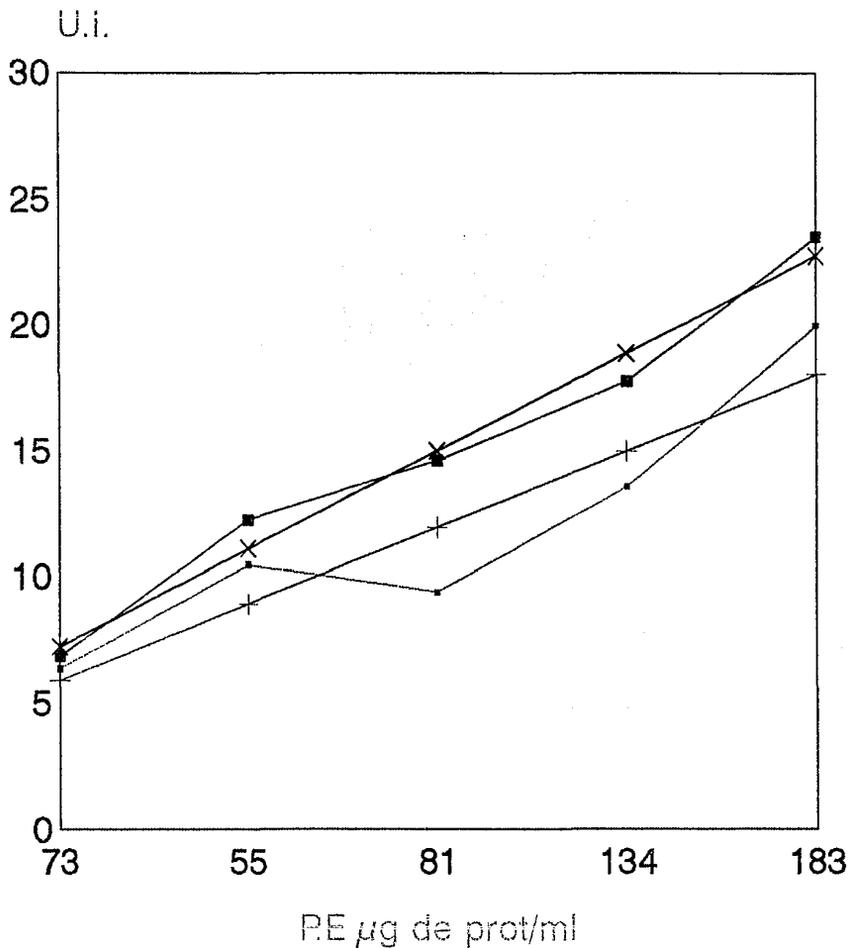
FUENTE DE CARBONO	$\mu$ SIN ACEITE	$\mu$ CON ACEITE
Glucosa	0.13	0.06
Fructosa	0.12	0.06
Dextrinas	0.13	0.09
Sacarosa	0.11	0.07
Galactosa	0.14	0.08
Maltosa	0.13	0.06
Almidon	0.01	0.03
Lactosa	0.10	0.09
Glicerol	0.15	0.06
A.O.	0.08	0.07

Tabla 11

Rendimiento de Biomasa ( $Y_s$ ) al final de la fermentacion 96 Hrs

Fuente de Carbono	Sin aceite	
	$\bar{x}$ mg de cel.	$\sigma$
	mg sus.	
Glucosa	0.5043	0.0491
Fructosa	0.4243	0.0353
Dextrinas	0.5212	0.0874
Sacarosa	0.4813	0.2719
Galactosa	0.5166	0.0344
Maltosa	0.2643	0.0662
Almidon	0.5350	0.3468
Lactosa	0.1509	0.0168

# CORRELACION ENTRE ALV. vs P.E GLUCOSA



○ GLU S/A + R.L. ■ GLU C/A \* R.L.

Figura 12

Tabla 13  
Actividad lipolitica especifica  
U.L./mg biomasa  
sin aceite

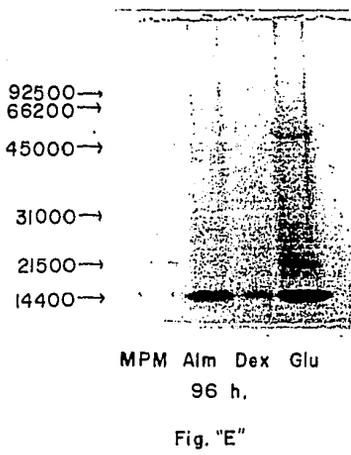
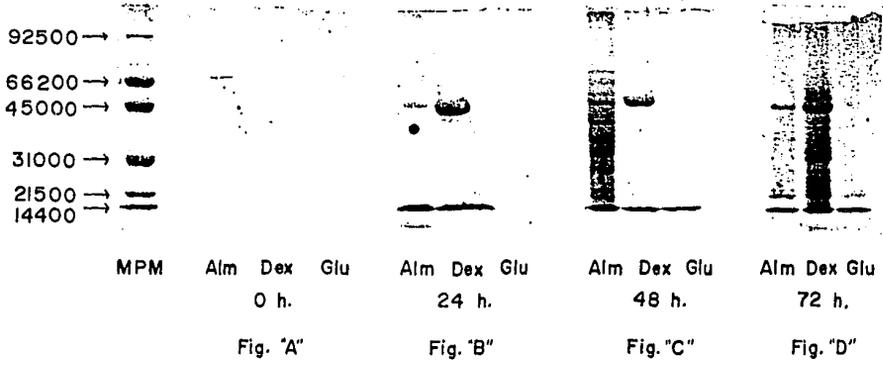
Fuente de carbono	Tiempo(hrs)	$\bar{X}$	Fuente de carbono	Tiempo(hrs)	$\bar{X}$
Glucosa	0	81.00	Maltosa	0	101.28
	24	5.38		24	8.65
	48	2.55		48	3.15
	72	2.87		72	4.49
	96	4.06		96	3.93
Fructosa	0	81.88	Almidon	0	2.69
	24	8.64		24	8.53
	48	2.26		48	3.11
	72	3.68		72	4.04
	96	3.02		96	3.95
Dextrinas	0	66.50	Lactosa	0	62.81
	24	6.54		24	10.07
	48	3.47		48	4.87
	72	2.93		72	4.29
	96	2.33		96	4.73
Sacarosa	0	71.41	Glicerina	0	185.04
	24	10.73		24	11.05
	48	3.05		48	3.93
	72	2.35		72	2.90
	96	1.80		96	2.87
Galactosa	0	100.76			
	24	6.75			
	48	1.98			
	72	2.35			
	96	2.91			

Tabla 14  
Rendimiento de producto  
U.L./mg sus.  
sin aceite

Fuentes de carbono	Tiempo(hrs)	$\bar{X}$	$\sigma$	Fuentes de carbono	Tiempo(hrs)	$\bar{X}$	$\sigma$
Glucosa	24	5.13	1.73	Galactosa	24	5.49	1.38
	96	2.01	0.99		96	1.50	0.53
Fructosa	24	2.00	0.56	Maltosa	24	5.06	0.39
	96	1.27	0.56		96	1.03	0.18
Dextrinas	24	5.56	1.43	Almidon	24	11.31	12.03
	96	1.21	0.51		96	1.59	0.67
Sacarosa	24	13.92	6.53	Lactosa	24	2.72	0.49
	96	0.75	0.12		96	0.71	0.05

TABLA No 16  
 PRODUCTIVIDAD DE LA FERMENTACION  
 U. I / h.  
 FUENTES DE CARBONO SIN ACEITE

Tiempo(h)	Glucosa $\bar{x}$	desv. est.	Fructosa $\bar{x}$	desv. est.	Dextrinas $\bar{x}$	desv. est.	Sacarosa $\bar{x}$	desv. est.	Glicerol $\bar{x}$	desv. est.
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0001	0.0001
24	0.4316	0.1318	0.5716	0.1701	0.7884	0.1972	0.6552	0.2190	0.6054	0.0729
48	0.1924	0.0449	0.1731	0.0331	0.2726	0.1264	0.1922	0.0784	0.2512	0.0805
72	0.1862	0.0652	0.2597	0.1725	0.2049	0.0815	0.1184	0.0293	0.1706	0.0655
96	0.1994	0.1029	0.1412	0.0650	0.1105	0.0610	0.0762	0.0116	0.1481	0.0654
Tiempo(h)	Galactosa $\bar{x}$	desv. est.	Maltosa $\bar{x}$	desv. est.	Almidon $\bar{x}$	desv. est.	Lactosa $\bar{x}$	desv. est.	A.O.1% $\bar{x}$	desv. est.
0	0.0198	0.0420	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0001	0.0001
24	0.6019	0.1478	0.5506	0.0530	0.6738	0.2419	0.5301	0.1020	0.6205	0.1009
48	0.1620	0.0306	0.2037	0.0601	0.2906	0.1910	0.2193	0.0798	0.5002	0.2138
72	0.1657	0.0520	0.1334	0.0187	0.2249	0.1175	0.1103	0.0216	0.3630	0.1732
96	0.1539	0.0522	0.1051	0.0181	0.1852	0.0776	0.0727	0.0043	0.1722	0.0776



## 5.2. Grupo II (aceite de oliva suplementado con carbohidratos).

El grupo II, que lleva en el medio de cultivo aceite de oliva al 2% además de los carbohidratos empleados en el grupo anterior, se diseñó para saber si el aceite se comporta como un efector positivo de la producción de enzima o un estimulante del crecimiento celular, pues los resultados anteriores indican que la enzima es constitutiva pero la gran mayoría de autores emplean lípidos en el medio de cultivo. Por otra parte, se desconoce si los efectos regulatorios detectados previamente se presentan cuando la naturaleza de la fuente de carbono es mixta.

Al analizar el crecimiento en este grupo no se encuentran diferencias significativas entre ningún carbohidrato, lo que sugiere que el uso de aceite es suficiente para sostener el crecimiento a este nivel de nitrógeno (Figuras 17 - 25). Si se comparan los valores obtenidos para este grupo con los obtenidos para el grupo I se verifica el hecho de que el aceite es estimulante del crecimiento celular, independientemente del carbohidrato empleado como suplemento. No se observan diferencias en cuanto a velocidad de crecimiento en este grupo (Tabla 10).

El análisis de la velocidad de consumo de carbohidratos en este tipo de fermentaciones indica que, a diferencia de las que no poseen aceite, si existen diferencias estadísticamente significativas entre las velocidades de consumo (Anexo I, Cuadro 8). La sacarosa, el almidón y la maltosa son los carbohidratos que se consumen más lentamente mientras la mayor velocidad de consumo se observa con la fructosa. No existen diferencias significativas entre los valores de consumo total de sustrato (Anexo I, Cuadro 9) y el que se consume en mayor medida es la fructosa.

La lactosa genera metabolitos que alcalinizan el medio, lo cual no parece afectar el crecimiento celular (Figuras 17 - 25). En los casos de sacarosa y almidón, que generan acidificación del medio, no se afecta significativamente el desarrollo de biomasa (Anexo I, Cuadro 11).

La actividad lipolítica volumétrica presenta un valor máximo cuando el aceite se suplementa con lactosa y esto ocurre a las 72 h de fermentación (Figuras 17 - 25). Después de la misma, las mejores fuentes de carbono para actividad volumétrica son dextrinas y fructosa, que presentan los máximos niveles a las 96 h. Los valores de actividad obtenidos con glucosa y almidón no son estadísticamente diferentes entre sí (Anexo I, Cuadro 14), por lo que se puede afirmar que en presencia del aceite el efecto regulatorio ejercido por glucosa es menos notorio.

En lo que respecta a la producción de enzima con respecto al tiempo se observa en todos los casos, a excepción del almidón, un comportamiento lineal ya que la producción de la enzima muestra un comportamiento siempre ascendente (Anexo II, Cuadro 2). En el caso del almidón si se puede afirmar que existen dos máximos de producción y este comportamiento posiblemente esté relacionado con la diferencia en la velocidad del consumo de sustrato. La relación entre producción de enzima y crecimiento indica que la enzima muestra un comportamiento similar al de los metabolitos secundarios, pues los niveles de enzima siguen elevándose al entrar en la fase estacionaria. Parece haber una relación proporcional entre pH del medio y niveles de actividad alcanzados. En general, los valores de actividad son mayores mientras más se acerca el pH a 6.5 (Figuras 17 - 25).

El aceite parece estimular la secreción de proteínas, particularmente en los casos en los que se detecta mayor producción de lipasa (lactosa, galactosa y almidón). Esto indicaría que la mayor actividad volumétrica detectada en el caso del uso de lactosa, se debe a que hay mayor secreción de proteínas. Sin embargo al analizar la actividad específica referida a biomasa, ésta es mayor para el almidón a las 24 h y para las dextrinas a las 96 h (Tabla 27). A excepción de la glicerina, la producción específica no varía significativamente entre los dos tiempos considerados. Por lo tanto, no puede hablarse de que ningún carbohidrato regula la síntesis de la enzima en presencia de aceite.

El rendimiento de biomasa ( $Y_s$ ) es más alto cuando se emplean sacarosa, galactosa, almidón y maltosa (Tabla 26, Anexo 1 Cuadro 12). Al evaluar el valor de rendimiento de producto ( $Y_p$ ) (Tabla 28), se observa que los valores más altos de este parámetro coinciden con los obtenidos para rendimiento de biomasa ( $Y_s$ ). Lactosa y fructosa proporcionan los valores mínimos encontrados.

Con el fin de comparar si el perfil enzimático es el mismo en presencia y en ausencia de aceite se siguió la metodología descrita anteriormente para conocer los perfiles electroforéticos y la posible presencia de más de una enzima.

En la (Figura "F") a las 0 h, no se observan bandas. A las 24 hrs de fermentación (Figura "G") se observa una banda de peso molecular aproximado de 28 000 Da, tanto en las fermentaciones realizadas con dextrinas como con almidón y no se distingue ninguna banda en la fermentación proveniente de glucosa. La banda de 28 000 Da también se distingue en los geles elaborados en el grupo I, lo que indica que la combinación aceite-carbohidratos no parece interferir en el tipo de proteína expresada. A las 48 hrs de fermentación (Figura "H") se observa que el patrón de bandas obtenido para la fermentación con almidón cambia por completo (si se compara con el obtenido en el grupo I) volviéndose más definido, pues se distinguen claramente cuatro bandas de 46 000, 31 000, 16 000 y 7 000 Da, respectivamente. Esto permite suponer que la combinación aceite-carbohidrato disminuye la síntesis de proteasas y por ende la hidrólisis de proteínas, por lo que las bandas son bien definidas.

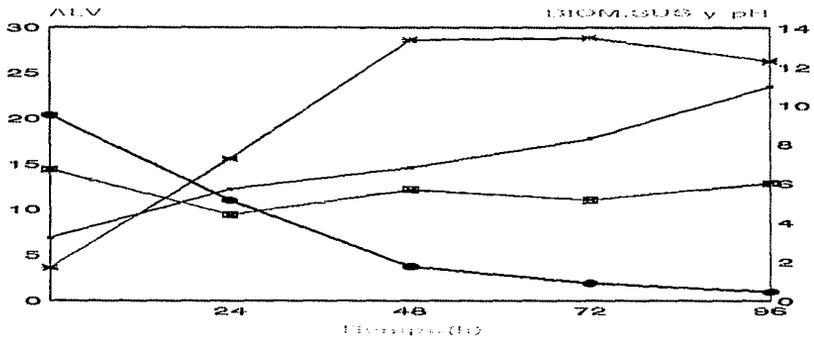
Aunque en lo referente a producción volumétrica no se aprecia claramente la regulación por glucosa, las muestras provenientes de la fermentación con este carbohidrato presentan bandas casi imperceptibles en comparación con las obtenidas con dextrinas o almidón, y se notan claramente hasta las 72 hrs de fermentación (Figura "I"), cuando se pueden observar, además, tres bandas de aproximadamente 19 000, 10 000 y 7 000 Da respectivamente. Al final de la fermentación 96 hrs (Figura

"J") el perfil de bandas es aún más definido, no apreciándose cambios con respecto al tiempo considerado anteriormente.

La única actividad "in situ" detectada corresponde a la banda de 45 000 Da por lo que se infiere la presencia de una sola enzima lipolítica durante el transcurso de la fermentación, bajo las condiciones trabajadas, y coincide con las características de la banda cuya actividad se detectó en ausencia de aceite por la técnica de transferencia a papel.

El análisis de la productividad de la fermentación indica, como en el caso anterior, que la fermentación puede acortarse a 24 horas (Tabla 29). En este grupo no hay diferencias significativas entre ninguna de las combinaciones empleadas (Anexo I, Cuadro 17).

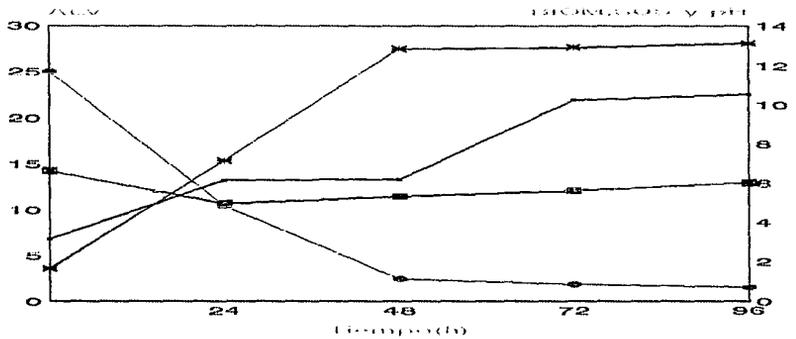
ACEITE DE OLIVA AL 2% SUPLEMENTADO CON GLUCOSA



— ALV(U.I) — BIOMASA(mg/ml) — SUS(mg/ml) — pH

FIGURA 17

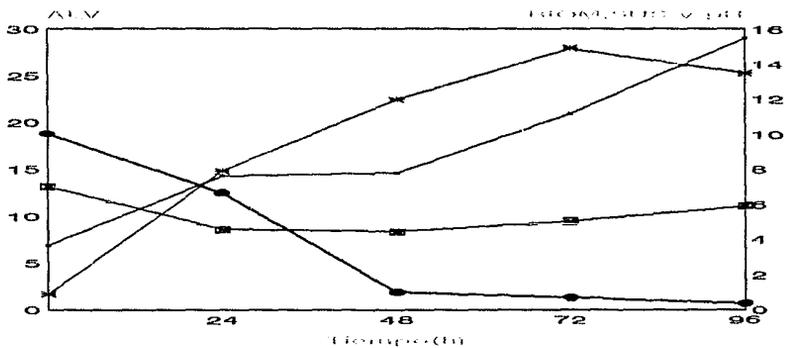
ACEITE DE OLIVA AL 2% SUPLEMENTADO CON FRUCTOSA



— ALV(U.I) — BIOMASA(mg/ml) — SUS(mg/ml) — pH

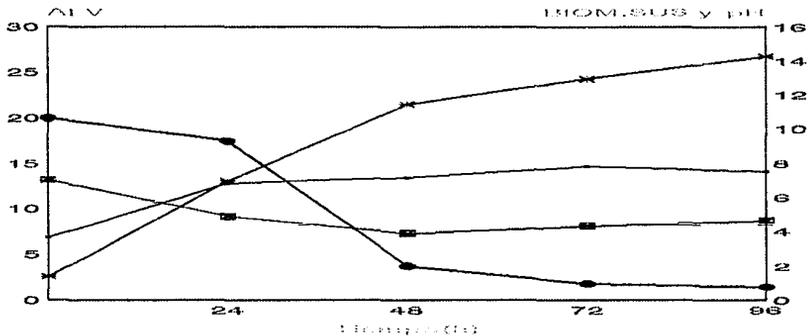
FIGURA 18

ACEITE DE OLIVA AL 2% SUPLEMENTADO CON DEXTRINA



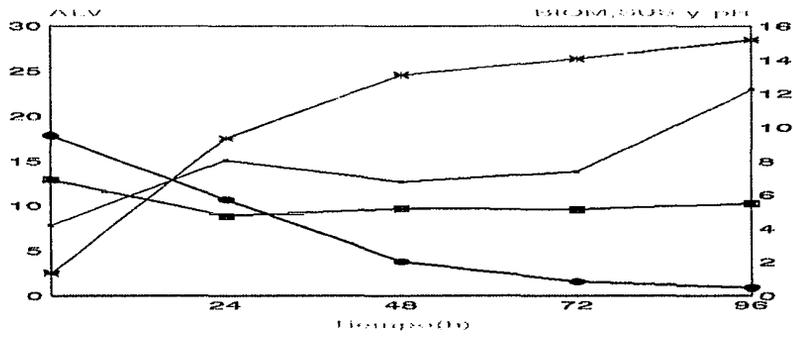
— ALV(U.I) — BIOMASA(mg/ml) — SUS(mg/ml) — pH

FIGURA 19



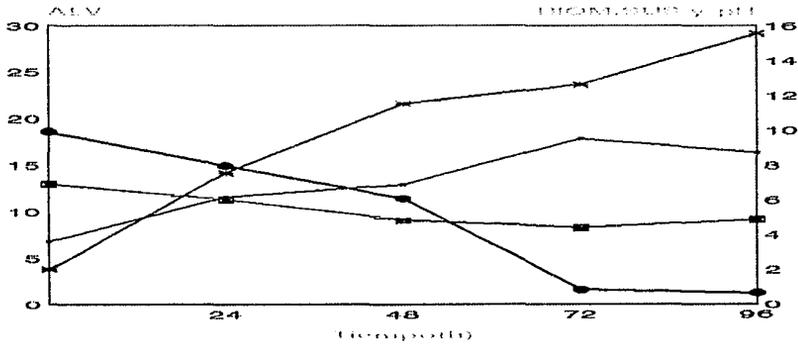
— ALV(U.I.) — BIOMASA(mg/ml) — SUS(mg/ml) — pH  
**FIGURA 20**

**ACEITE DE OLIVA AL 2% SUPLEMENTADO CON GALACTOS.**



— ALV(U.I.) — BIOMASA(mg/ml) — SUS(mg/ml) — pH  
**FIGURA 21**

**ACEITE DE OLIVA AL 2% SUPLEMENTADO CON MALTOS**



— ALV(U.I.) — BIOMASA(mg/ml) — SUS(mg/ml) — pH  
**FIGURA 22**

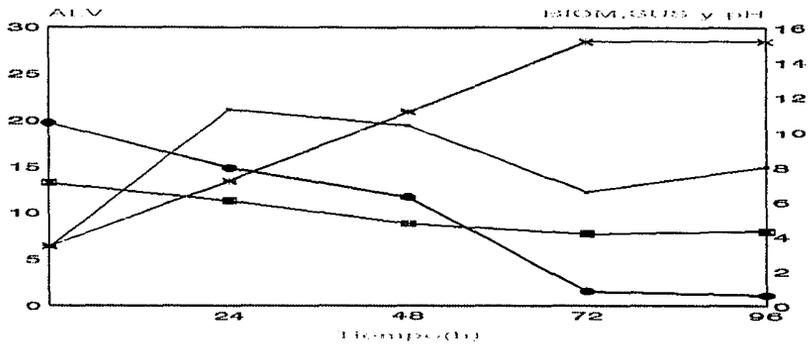


FIGURA 23

**ACEITE DE OLIVA AL 2% SUPLEMENTADO CON LACTOSA**

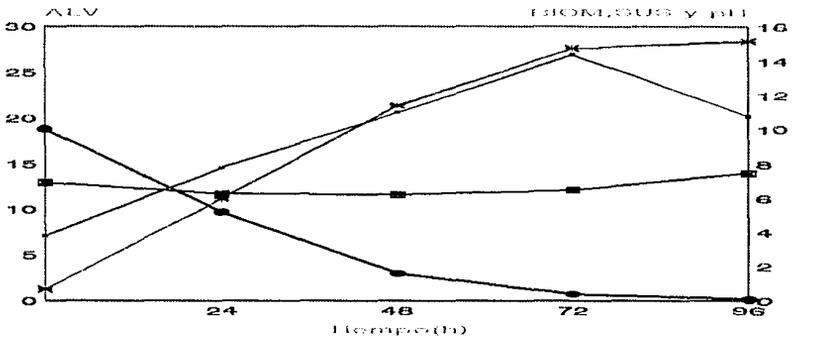


FIGURA 24

**ACEITE DE OLIVA AL 2% SUPLEMENTADO CON GLICERINA**

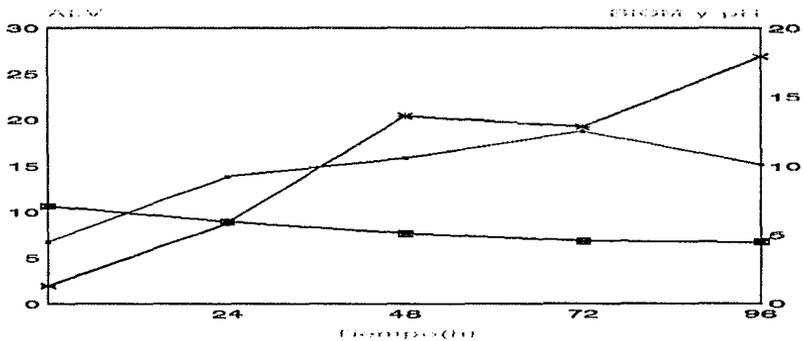


FIGURA 25

Tabla 27  
 Actividad lipolítica específica  
 U.L./mg biomasa  
 con aceite de oliva al 2%

Fuente de carbono	Tiempo(hrs)	$\bar{X}$	Fuente de carbono	Tiempo(hrs)	$\bar{X}$
Glucosa	0	4.09	Maltosa	0	3.36
	24	1.68		24	1.52
	48	1.09		48	1.12
	72	1.31		72	1.41
	96	1.91		96	1.05
Fructosa	0	4.12	Almidon	0	1.84
	24	1.83		24	2.95
	48	1.03		48	1.74
	72	1.70		72	0.80
	96	1.71		96	0.98
Dextrinas	0	7.65	Lactosa	0	10.70
	24	1.81		24	2.43
	48	1.22		48	1.80
	72	1.40		72	1.83
	96	2.15		96	1.33
Sacarosa	0	5.01	Glicerina	0	5.15
	24	1.84		24	2.36
	48	1.17		48	1.16
	72	1.13		72	1.46
	96	0.98		96	0.84
Galactosa	0	5.92			
	24	1.61			
	48	0.96			
	72	0.98			
	96	1.50			

Tabla 26  
 Rendimiento de Biomasa (Ys) al final de  
 la fermentación 96 Hrs

Fuente de Carbono	Con aceite	
	$\bar{X}$	$\sigma$
	mg de cel. mg sus.	
Glucosa	1.3584	0.5349
Fructosa	1.1962	0.2738
Dextrinas	1.3902	0.1536
Sacarosa	1.4486	0.2241
Galactosa	1.6000	0.2417
Maltosa	1.6884	0.4204
Almidon	1.5391	0.2348
Lactosa	1.5238	0.4386

Tabla 28  
Rendimiento de producto  
U.L./mg sus.  
con aceite

Fuentes de carbono	Tiempo(hrs)	$\bar{X}$	$\sigma$	Fuentes de carbono	Tiempo(hrs)	$\bar{X}$	$\sigma$
Glucosa	24	2.77	0.65	Galactosa	24	3.94	1.28
	96	2.58	0.85		96	2.53	0.55
Fructosa	24	1.92	0.56	Maltosa	24	5.89	0.96
	96	2.05	0.63		96	1.75	0.59
Dextrinas	24	4.28	1.36	Almidon	24	8.18	1.08
	96	2.99	1.06		96	1.49	0.30
Sacarosa	24	10.93	5.04	Lactosa	24	3.00	0.63
	96	1.42	0.54		96	2.02	0.82

TABLA No. 29  
PRODUCTIVIDAD DE LA FERMENTACION

U. I/h

FUENTES DE CARBONO CON ACEITE

Tiempo(h)	Glucosa $\bar{x}$	desv. est.	Fructosa $\bar{x}$	desv. est.	Dextrinas $\bar{x}$	desv. est.	Sacarosa $\bar{x}$	desv. est.	Glicerol $\bar{x}$	desv. est.
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0002	0.0001
24	0.5118	0.1209	0.5480	0.1575	0.5593	0.2239	0.5339	0.1470	0.5794	0.1074
48	0.3039	0.0754	0.2668	0.1057	0.3054	0.0859	0.2650	0.1166	0.3308	0.1223
72	0.2465	0.1132	0.3050	0.1017	0.2912	0.0877	0.2038	0.1044	0.2608	0.0864
96	0.2464	0.0846	0.2349	0.0711	0.3018	0.1082	0.1466	0.0540	0.1574	0.0452
Tiempo(h)	Galactosa $\bar{x}$	desv. est.	Maltosa $\bar{x}$	desv. est.	Almidon $\bar{x}$	desv. est.	Lactosa $\bar{x}$	desv. est.	A.O.3% $\bar{x}$	desv. est.
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0002	0.0001
24	0.6387	0.2153	0.4207	0.1195	0.8053	0.2888	0.6065	0.1285	0.4579	0.1168
48	0.2811	0.1096	0.2414	0.0465	0.4040	0.2582	0.4291	0.2093	0.3846	0.1916
72	0.1924	0.0329	0.2241	0.1772	0.1696	0.0373	0.3398	0.1372	0.2748	0.0781
96	0.2388	0.0512	0.1752	0.0676	0.1555	0.0329	0.2105	0.0816	0.2229	0.0697

92500 →  
66200 →  
45000 →  
31000 →  
21500 →  
14400 →

MPM



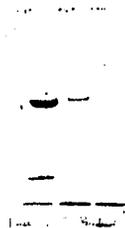
Alm Dex Glu  
0 h.

Fig. "F"



Alm Dex Glu  
24 h.

Fig. "G"



Alm Dex Glu  
48 h.

Fig. "H"



Alm Dex Glu  
72 h.

Fig. "I"

92500 →  
66200 →  
45000 →  
31000 →  
21500 →  
14400 →

MPM Alm Dex Glu  
96 h.

Fig. "J"

### 5.3 Grupo III (aceite de oliva al 1% y al 3% como única fuente de carbono)

El grupo III se incluyó con el fin de evaluar el comportamiento de la fermentación con el mismo nivel de carbono empleado cuando el aceite se suplementado con carbohidratos (3%). El efecto más relevante del aceite consistió en estimular el crecimiento, y en consecuencia la actividad volumétrica, por lo que era importante verificar que éste no se debiera al nivel de carbono empleado.

Los resultados obtenidos con las dos concentraciones de aceite como únicas fuentes de carbono (Figuras 30 y 31) permiten observar un incremento en el desarrollo celular con el empleo de la mayor concentración. Aunque no se pudo evaluar el consumo de aceite mediante la técnica gravimétrica, a simple vista se observa que en el caso del uso de aceite de oliva al 3% como única fuente de carbono se queda sin utilizar una alta proporción del aceite añadido. En cuanto a los valores de pH determinados en ambas concentraciones existe una diferencia significativa estadísticamente, pues a mayor concentración de aceite mayor acidificación del medio (Anexo I, Cuadro 18).

Para la producción de enzima el aceite de oliva al 1% resulta ser mejor fuente de carbono que el mismo en una concentración del 3%, pues no hay un incremento proporcional de la actividad. Una posible explicación a este fenómeno sería que a altas concentraciones de aceite se forma un agregado micelial de mayor tamaño. Giuseppein (1984) afirma que cuando se forman agregados grandes disminuye la formación de lipasa en R. delemar por problemas de transferencia de oxígeno. Por otra parte coincide con el comportamiento de otros hongos, en los que la adición de lípidos ejerce un efecto negativo sobre la producción de lipasas, probablemente por el efecto inhibitorio de productos de reacción de la enzima. Esto se corrobora al observar los valores encontrados en la Tabla 32, con un claro descenso en la actividad específica a 24 y 96 h en las concentraciones elevadas de aceite. Un fenómeno similar se reporta

en los trabajos sobre lipasas de P. roqueforti (Eitenahler,1970), A. wentii (Chander, 1980) y A. niger (Pal, 1978).

Si se compara el comportamiento de la fermentación con aceite de oliva al 1% con el de las muestras suplementadas con carbohidrato, se observa que los valores obtenidos en este caso son superiores a los obtenidos en cualquier combinación aceite carbohidrato (excepto en el caso de lactosa, en el que es igual) o a los carbohidratos solos. Por tanto por facilidad de proceso puede pensarse en el empleo de aceite 1% como única fuente de carbono, lo cual se justifica inclusive por razones de costos (Tabla 33). Podría pensarse en disminuir aún más el uso de aceite, tal y como reportan Maliszewska y Mastalerz (1992) para la producción de lipasa por P. citrinum.

# ACEITE DE OLIVA AL 1%

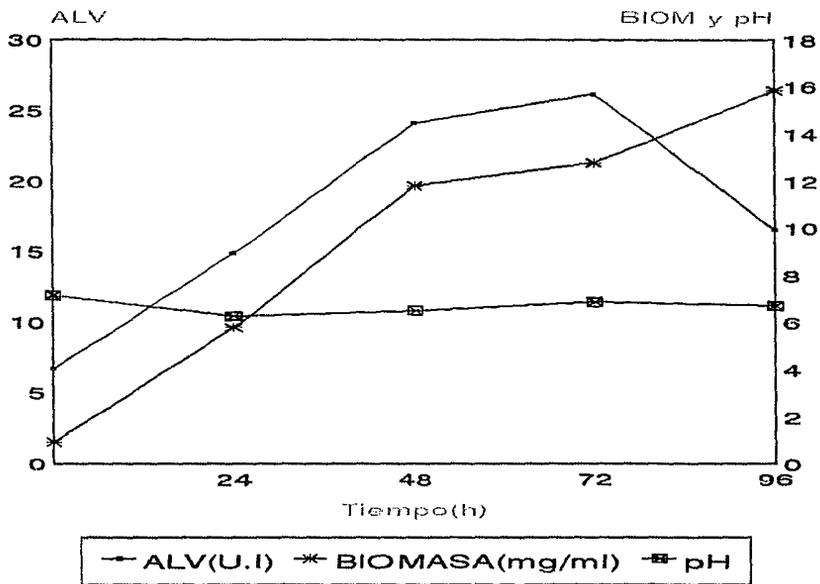


FIGURA 30

# ACEITE DE OLIVA AL 3%

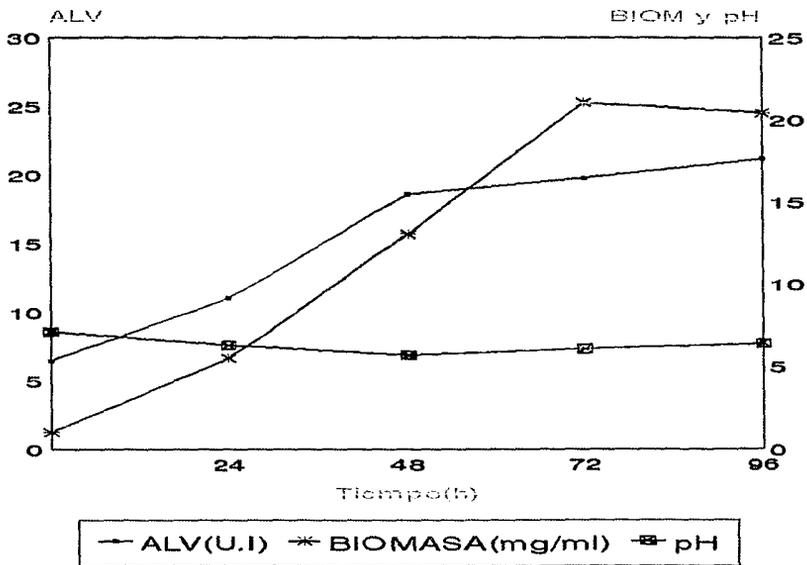


FIGURA 31

Tabla 32  
Actividad lipolitica especifica  
U.L./mg biomasa

Fuente de carbono	Tiempo(hrs)	- X
Aceite de oliva 1%	0	7.28
	24	2.57
	48	2.04
	72	2.04
	96	1.04
Aceite de oliva 3%	0	6.35
	24	1.99
	48	1.42
	72	0.93
	96	1.03

Tabla 33  
Tabla de costos de fuentes de carbono empleadas

Fuente de carbono	Marca	Costo/g \$
Glucosa	Merck	71.50
Sacarosa	Merck	96.80
Fructosa	Merck	1969.00
Galactosa	Merck	3700.00
Lactosa	Merck	325.60
Glicerol	Baker	38.54
Aceite de- Olivo	G-Sensat	41.11
Dextrinas	Arancia	1.81
Almidon	Merck	879.00

#### 5.4 Análisis conjunto de grupos

La actividad lipolítica volumétrica se incrementa en forma notable y significativa cuando los carbohidratos y aceite se encuentran juntos, en comparación al grupo I en el que sólo se emplean carbohidratos. Sin embargo se puede visualizar que la mejor fuente de carbono para la producción de enzima es el aceite de oliva 1% (grupo III), aunque ésto trae consigo una disminución en la productividad, pues el valor máximo se alcanza a las 72 h.

El incremento en actividad que se presenta en presencia de aceite parece deberse a un incremento en crecimiento, pues, por el contrario, la actividad específica disminuye significativamente al comparar los valores obtenidos en presencia de aceite en el medio. La excepción a este comportamiento se observa con el aceite de oliva al 3%, condición en la que se produce mayor desarrollo celular aunque no así mayor producción de enzima. Esto puede explicarse por la presencia en el medio de ácidos grasos y otros productos de degradación del aceite que pudieran constituirse en inhibidores de la enzima o en posibles represores.

Es de hacerse notar que los valores de actividad específica obtenidos en presencia de aceite son consistentemente menores a los obtenidos en el medio que sólo posee carbohidratos. Esto apoya la hipótesis de que los ácidos grasos u otras moléculas presentes en el aceite ejercen un efecto regulatorio negativo.

Si se comparan los resultados obtenidos cuando no hay aceite en el medio con aquéllos en los que si lo hay, se observa que en los casos de uso de polisacáridos, como dextrinas y almidón, la velocidad de consumo de carbohidratos es mayor cuando éstos se emplean como única fuente de carbono, lo que sugiere que el aceite afecta la producción de enzimas necesarias para la asimilación de estos polímeros, no así para el resto de los carbohidratos. Esto se refleja también al evaluar el consumo total de sustrato, en donde se presenta una diferencia significativa entre los valores en

presencia y en ausencia de aceite para el caso del almidón, que disminuyen en presencia de aceite (Anexo I, Cuadro 10). En el resto de los casos los valores totales de consumo son similares en presencia y en ausencia de aceite. En los dos grupos el carbohidrato que se consume en mayor proporción y a mayor velocidad es la fructosa. El análisis de las diferencias en  $Y_s$  al emplear aceite-carbohidratos y comparar con las fermentaciones que únicamente tienen carbohidratos como fuente de carbono (Anexo I, Cuadro 13) permite notar que el cambio de comportamiento más evidente es el de la maltosa, en el que se eleva 6 veces el rendimiento de biomasa en presencia de aceite, no así la cantidad de enzima.

Si se analizan los datos obtenidos para  $Y_p$  en presencia y en ausencia de aceite y los valores de actividad volumétrica, es claro que no existe una relación directa entre crecimiento y producción, sino que se presentan efectos regulatorios atribuibles a cada fuente de carbohidratos (Anexo I, Cuadros 15 y 16).

El análisis de tendencias mostrados en los Cuadros 1 y 2, Anexo II, muestra que cuando se emplean aceite y carbohidratos la tendencia de producción muestra un comportamiento lineal (a excepción del almidón), mientras que en el grupo I, con carbohidratos como única fuente de carbono, se presenta una mayor diversidad de comportamientos. En ninguno de los dos casos puede hablarse de un modelo de producción en el que la enzima esté asociada al crecimiento. Cuando sólo se emplean carbohidratos la máxima producción de enzima precede al inicio de la fase estacionaria, mientras que la presencia de aceite permite una producción continua de enzima, que de hecho no alcanza una fase estacionaria.

El perfil electroforético varía en presencia y en ausencia de aceite, y al parecer éste tiene que ver con una inhibición de proteasas que permite ver bandas más definidas. En los dos casos sólo se encuentra una banda que presenta actividad lipolítica y que coincide para los dos grupos.

## Conclusiones

- 1.- Los resultados obtenidos al emplear carbohidratos como única fuente de carbono indican que la producción de la enzima es constitutiva, pues se presenta actividad en ausencia de lípidos en el medio de cultivo.
2. - La condición en la que se obtiene la mayor actividad lipolítica volumétrica es la utilización de aceite de oliva al 2% suplementado con lactosa 1% a las 72 h de cultivo. Esta condición no presenta diferencia significativa con el valor obtenido al emplear aceite de oliva 1% como única fuente de carbono al mismo tiempo de cosecha.
3. El costo de materias primas indicaría que el aceite de oliva 1% puede emplearse como materia prima para procesos a mayor escala.
4. - La suplementación de carbohidratos con aceite se traduce en un incremento en actividad lipolítica, aunque el porcentaje del mismo varía según la combinación aceite carbohidrato empleada. Este efecto positivo se logra al incrementar el crecimiento celular. Si no se emplea aceite como fuente de carbono, el almidón proporciona el mejor resultado en cuanto a actividad lipolítica, además de ser el que presenta un mayor crecimiento celular, aunque el valor obtenido es un 50% menor que el de la mejor condición obtenida en presencia de aceite.
- 5.- Los resultados indican que las estrategias conducentes a incrementar el crecimiento celular deben traducirse en un incremento en actividad lipolítica volumétrica.

6.- El crecimiento celular parece afectarse si el pH final es ligeramente alcalino, como se muestra en los casos de empleo de la lactosa y la maltosa. Los valores máximos de actividad se presentan en un rango de pH final entre 6.0 y 6.5.

7.- El comportamiento de la producción de enzima con respecto al crecimiento varía en presencia y en ausencia de aceite. En ausencia de aceite la producción de la enzima se detiene previo al inicio de la fase estacionaria. En su presencia la enzima continúa produciéndose aún y cuando el organismo haya alcanzado la fase estacionaria.

8.- En ausencia de aceite puede detectarse un fenómeno regulatõrio negativo ejercido por glucosa. En presencia de lípidos no se detecta este fenómeno.

9.- Las técnicas de determinación de actividad " in situ" por transferencia sólo permitieron identificar una banda que presenta actividad lipolítica, que posee un peso molecular aproximado de 45 000 Da. Esta banda aparece en todas las condiciones de fermentación empleadas y este peso molecular corresponde al de una de las enzimas reportadas por Tahoun (1986).

10.- El tiempo de fermentación puede reducirse pues el máximo de productividad se encuentra a las 24 horas en ausencia de aceite en el medio (almidón y dextrinas), y a las 72 horas en presencia del mismo (lactosa).

## 7. Recomendaciones

- 1.- Al incrementar el crecimiento se debe tomar en cuenta el crecimiento exuberante del microorganismo que puede generar problemas en fermentadores de mayor escala.
- 2.- Se debe establecer cuál es la concentración óptima de aceite a emplear, especialmente si es la única fuente de carbono empleada.
- 3.- En una optimización del medio de cultivo deberá considerarse el efecto de la relación carbono nitrógeno.
- 4.- Si se maneja el microorganismo en un fermentador instrumentado se sugiere controlar el pH en el rango 6.0-6.5, ya que la tendencia a alcalinizarse repercute negativamente en la actividad.
- 5.- Se debe evaluar cuantitativamente el efecto de la proteasa en la actividad y estabilidad de la enzima.
- 6.- Los valores de actividad lipolítica obtenidos presentan una alta variabilidad atribuible parcialmente a la técnica de medición, por lo que se recomienda emplear otras.

## BIBLIOGRAFIA

- Aguilar, G. Trejo, B. García, J. Huitrón, C., 1991., Influence of pH on endo and exo Pectinase Production by Aspergillus sp. CH-Y-1043. Can. J. Microbiol. 37., 912 -917.
- Arnold, G. R. Shahani, M. K. Dwivedi, K. B., 1975., Application of lipolytic enzymes to flavor development in dairy products. J. Dairy Sci. 58 (8)., 1127 - 1143.
- Bennet, J. W., Klich, M.A., 1992., Cap 7, Industrial Enzymes from Aspergillus Species, Biology and Industrial Applications ., Butterworth - Heinemann. U.S.A., 155 - 202
- Bloomer, S. Adlercreutz, P. Mattiasson, B., 1990., Triglyceride interesterification by lipases 1. Cocoa butter equivalents from a fraction of palm oil. JAOCS. 65 (8)., 519 - 524.
- Bloquel, R. Veillet-Poncet, L., 1984., Factors contributing to production of microbial lipases. Microbiol. Food Nutr. 12., 179 - 185.
- Boyce, L.O.C., 1984., Developing a new industrial enzyme application: A. strategy. JAOCS. 61 (11)., 1750 - 1753.
- Bühler, M and Wandrey,C., 1987., Enzymatic hydrolysis of fats. Henkel- Referate 23., 29-35.
- Celerin, E. M. y Fergus, C. L., 1971., Effects of nutrients, temperature and relative humidity on germination and longevity of the ascospores of Chaetomium thermophile var. Coprophile. Mycologia. 63., 1030 -1045.
- Corzo, B. G., 1992., Estudio comparativo de la producción de lipasas por Yarrowia lipolytica en cultivos líquido y sólido. Tesis para obtener el grado de maestría en Biotecnología. UACPyP, CCH, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, México, D.F.
- Cottle, W. E., 1987., Unraveling proteases roles. Biotechnology. 5(2)., 108-109.
- Chander, H. Batish, K. V. Ghodekar, R. D., 1981., Factors affecting lipase production in Rhizopus nigricans. J. Dairy Sci. 64 (2)., 193 -196.
- Chander, H. Sannabhadri, S. Elias, J., 1977., Factors affecting lipase production by Penicillium chrysogenum. J. Food Sci. 42 (6)., 1677 -1682.
- Chaplin, M. F. Bucke, C., 1990., Enzyme Technology. Cap. 4, The large-scale use of enzymes in solution. Ed. Cambridge University Press. Great Britain., 138 - 143.
- Chopra, K. A. Chander, H., 1983., Factors affecting lipase production in Syncephalastrum racemosum. J. Appl. Bacteriol. 54., 163 -169.

- Deploey, J. J. Fortman, B. Perva, L., 1981., Daily measurements of Mucor miehei lipase activity. Mycologia. 73 (5)., 953 - 958.
- Desnuelle, P., 1972., The Enzymes, Boyer Vol. VII, Cap. 19, The lipases. Ed. Academic Press, New York., 575 - 616.
- Díaz, A. A., 1992., Lipasa: Estudios sobre su síntesis en Penicillium candidum. Tesis para obtener el grado de maestría en biotecnología. UACPyP, CCH, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, México, D. F.
- Díaz, A. A., 1988., Estudio de mercado sobre lipasas. Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Comunicación personal.
- Dubois, M. Gilles, K. A. Hamilton, J. A. Rebers, P. A. and Smith., 1956., Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry. 28., 350 - 356.
- Eitenahler, R. A. Vannand, J. R. y Shahani, M., 1970., Production and properties of Penicillium roqueforti lipases. J. Food Sci. 35., 130 - 133
- El Soda, M., 1993., The role of lactic bacteria in accelerated cheese ripening. FEMS Microbiol. Reviews. 12 (1 - 3)., 239 - 252.
- Espinosa, E<sup>a</sup>. Sánchez, S. Farrés, A., 1990., Nutritional factors affecting lipase production by Rhizopus delemar CDBB H313. Biotech Letters. 12 (3)., 209 - 214.
- Espinosa, E<sup>b</sup>, 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. UACPyP, CCH, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, México, D. F.
- Estell, A. David., 1993., Engineering enzymes for improved performance in industrial applications. J. Biotechnol. 28., 25 - 30.
- Fox, P.F., 1993., Exogenous enzymes in dairy technology. A review J. Food Biochem. 17., 173 - 199.
- Fujii, T. Tatara, T. Minagawa, M., 1986., Studies on applications of lipolytic enzyme in detergency 1. Effect of lipase from Candida cylindracea on removal of olive oil from cotton fabric. JAOCS. 63 (6)., 796 - 799.
- Fukumoto, J. e Iwai, M., 1963., Studies on lipase: 1. Purification and crystallization of lipase secreted by A. niger. J. Gen. Appl. Microbiol. 9., 353 - 361.
- Gacasa, P. Hubble, J., 1990., Tecnología de las enzimas. Cap. 2, Procedencia comercial de las enzimas. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza-España. 15 - 24.

Gadd, M. G., 1988., Carbon nutrition and metabolism. En Physiology of industrial fungi. Cap 2, por Berry, D. R. Ed. Blackwell Scientific Publications. Great Britain., Oxford. 21 - 57.

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

Godfrey, T. and Reichelt, J., 1983., Industrial Enzymology Cap. 3, 4 and data index 4. Legislation and regulation, industrial applications and data index 4. The Nature Press, Ed. Macmillan Publishers Ltd., 142-145, 276-311, 549-551.

Hames, D. B. Rickwood, D., 1990., Gel electrophoresis of proteins: a practical approach. Cap. 1, One dimensional polyacrylamide gel. Ed. IRL Press., 2a edicion., Oxford, New york, Tokyo. 1 - 147.

Hamosh, M., 1984., Lipasas. Cap. II Lipasas en mamíferos. Editado por Borgström, B. y Brockman, H., Ed. Elsevier Science Publisher B. U., Holanda., 47 - 81.

Harwood, J., 1989., The versatility of lipases for industrial uses. Trends Biochem. Sci. 14 (4)., 125 - 126.

Hass, M. J., Bailey, D. G. , 1993., Glycerol as a carbon source for lipase production by the fungus Rhizopus delemar. Food Biotechnol, Vol 7, 1ss 1, 49-73. (Abstract)

Heeb, J. M. Othmar, G., 1984., Enzyme localization in gels. Methods in Enzymology. Vol. 104. Parte C., 416 - 439.

Hofelmann, M. Hartmann, J. Zink, A. Schreier, P., 1985., Isolation, purification and characterization of lipase isoenzymes from a technical Aspergillus niger enzyme. J. Food Sci. 50., 1721 - 1725.

Hofelmann, M. Kittsteiner-Eberle, R., Schreier, P., 1983., Ultrathin-layer agar gels: A novel print technique for ultrathin-layer isoelectric focusing of enzymes. Anal. Biochem. 128., 217 - 222.

Huang, A., 1984., Lipasas. Cap. III A Lipasas de plantas. Editado por Borgström, B. y Brockman, H., Ed. Elsevier Science Publishers B. U., Holanda. 419 - 439.

Iwai, M., Tsujisaka, Y., 1974., Interconversion of two lipases from Rhizopus delemar. Agric. Biol. Chem., 38 (6)., 1249 - 1254.

Iwai, M., Tsujisaka, Y., Tominaga, Y., 1979., Increase in the activity of Rhizopus C-lipase on lipoprotein by its interaction with phospholipid. Agric. Biol. Chem., 43 (5)., 893 -900.

Iwai, M., Shimada, Y., Tsujisaka, Y., 1980., Modification of Rhizopus delemar lipase by its binding with phospholipids. J. Biochem., 88 (2)., 533 - 538.

Iwai, M., Tsujisaka, Y., 1984., Lipasas. Cap. III B Lipasas fungales. Editado por Borgström, B. y Brockman, H., Ed. Elsevier Science Publisher B. U., Holanda. 442 - 467.

Kawasaki, L., 1991., Efecto de glucosa sobre la producción de lipasa por Rhizopus delemar en fermentación sumergida. Tesis para obtener el Título de Biólogo, Facultad de Ciencias, UNAM., México, D. F.

Kilara, A., 1985., Enzyme-Modified lipid food ingredients. Process Biochem. 4., 35 - 44.

Laemmli, V. K., 1970., Cleavage of the structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature., 227., London, 680 - 685.

Lie, E. y Molin, G., 1992., Esterification of polyunsaturated fatty acids with lipases from different sources. International J. Food Sc. and Tech. 27. 73 - 76.

Loewus, F. A., 1952., Improvement in anthrone method for determination of carbohydrates. Anal. Chem. 24 (1), 219.

Lowry, O. H. Rosebrough, N. J. Fair, L. y Randall, R. J., 1951, Protein measurement with folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 93., 265 - 275.

Macrae<sup>b</sup>, A. R., 1983., Microbial Enzymes and Biotechnology. Cap. 5., Extracellular microbial lipases. Forgy, M. W., (ed) Academic Press. New York., 225 - 249.

Macrae<sup>a</sup>, A. R., 1983., Lipase-Catalyzed interesterification of oils and fats. JAOCS. 60 (2), 291 - 294.

Macrae, A. R., Hammond, R. C., 1985., Present and future applications of lipase. Biotechnol. Genet. Eng. Rev. 3., 193 - 217.

Maliszewska, I and Mastalerz, P., 1992., Production and some properties of lipase from Penicillium citrinum. Enzyme Microb. Technol. 14. 190 - 193

Menassa, A. y Lamberet, G., 1982., Contribution a l'étude du système lipolytique de Penicillium roqueforti. Caracteres compares de deux activités exocellulaires. Le Lait, 62., 32-43.

Messner, R., Hagspiel, K., and Kubicek, C., 1990., Isolation of  $\beta$ -Glucosidase binding and activating polysaccharide from cell walls of Trichoderma reesei. Arch. Microbiol. 154., 150 - 155.

Miller, C. Austin, H. Posorske, L. Gonzalez, J., 1988., Characteristic of an immobilized lipase for the commercial synthesis of esters. JAOCS. 65 (6), 927 - 931.

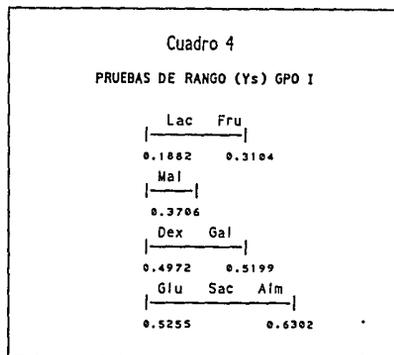
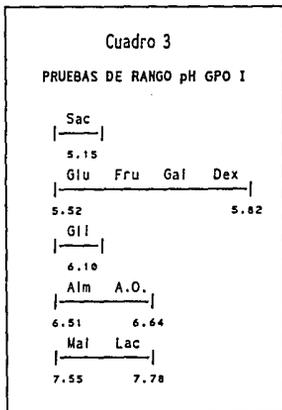
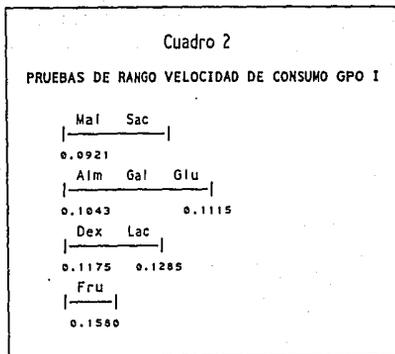
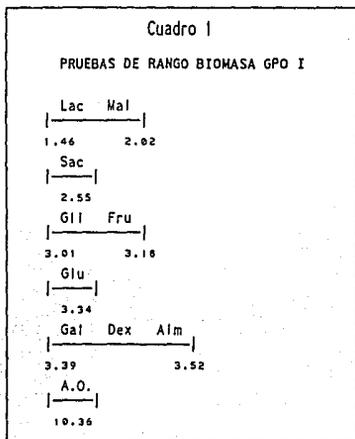
Moskowitz, J. G. Noelck, S. S., 1987., Enzyme-Modified cheese technology. J. Dairy Sci., 70., 1761 - 1769.

- Nahas, E., 1988., Control of lipase production by Rhizopus oligosporus under various growth conditions. J. Gen. Microbiol. 134., 227 - 233.
- Nakashima, T. Fukuda, H. Kyotani, S. y Moriskawa, H., 1988., Culture conditions for intracellular lipase production by Rhizopus chinensis and its immobilization within biomass support particles. J. Ferment. Technol. 66., 441 - 448.
- Neidleman, L. S., 1991., Enzymes in the food industry: A backward glance. Food Technol. Enero., 88 - 91.
- Novo., 1987., Un preparado de lipasa para reforzar el sabor de los productos alimentarios. Enzime Information. Informacion de producto preliminar Palatase M 1000 L.
- Nochur, V. S., Demain, L. A. and Roberts, F. M., 1992., Carbohydrate Utilization by Clostridium thermocellum: Importance of internal pH regulating growth. Enzyme Microb. Technol., Vol, 14 Mayo.
- Okeke, C. N. and Okolo, B. N., 1990 ., The effect of cultural conditions on the production of lipase by Acremonium strictum. Biotechnol. Letters., 12(10)., 747 - 750.
- Osterberg, E. Blomstrom, C. A. Holmberg, K., 1989. Lipase catalyzed transesterification of unsaturated lipids in a microemulsion. JAOCS. 66 (9)., 1330 - 1333.
- Pal, N. Das, S. Kundu, K. A., 1978., Influence of culture and nutritional conditions on the production of lipase by submerged culture of Aspergillus niger. J. Ferment. Technol. 56 (6)., 593 - 598.
- Petrovic, E. S. Skrinjar, M. Becarevic, A. Vujicic, F. I. Banka, L., 1990., Effect of various carbon sources on microbial lipases biosynthesis. Biotechnol. Letters. 12 (4)., 299 - 304.
- Polnisch, E. y Hofmann, 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.
- Posorske, H. L., 1984., Industrial-Scale application of enzymes to the fast and oil industry. JAOCS. 61 (11)., 1758 - 1760.
- Posorske, H. L. LeFebvre, K. J. Miller, A. C. Hansen, T. T. Glenvig, L. B., 1988., Process considerations of continuous fat modification with an immobilized lipase. JAOCS 65 (6)., 922 - 926.
- Sambrook, J., 1989., Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Transfer of DNA from agarose gel to solid supports. Vol. 2., 2a. Edición., Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press., 9.34 - 9.37.
- Scazzocchio, C. 1992., Cap 3., Industrial Enzymes from Aspergillus Species., Control of gene expression in the catabolic pathways of Aspergillus nidulans: a personal and biased account, Butterworth - Heinemann. U.S.A., 43 - 68.

- Schmid, D. Rolf with Henkel., 1987., Biotechnology: Application to oleochemistry. JAOCS. 64 (4) 563 - 570.
- Seitz, W. E., 1974., Industrial application of microbial lipases: A review. JAOCS. 51., 12 - 16.
- Serrano, S. R., 1985., Introducción a las aplicaciones de las enzimas. Ed. Alhambra., 95 - 97.
- Shimada, Y. Iwai, M. Tsujisaka, Y., 1981., Reversibility of the modification of Rhizopus delemar lipase by phosphatidilcholine. J. Biochem. 89 (3), 937 - 942.
- Shimada, Y. Tominaga, Y. Iwai, M., 1983., Increase in the activity of Rhizopus delemar lipase on water-soluble esters by its binding with phosphatidilcholine. J. Biochem. 93 (6), 1655 - 1660.
- Stern, M. A. Ordal, J. Z. Halvorson, O. H., 1954., Utilization of fatty acids by and lipolytic activities of Mucor mucedo. 68., 24 - 27.
- Sugiura, M., 1984., Lipasas. Cap III D Lipasas bacterianas. Editado por Borgström, B. y Brockman, H. Ed. Elsevier Science Publisher B. U. Holanda. 505 - 523.
- Sztajer, H. Maliszewska, I., 1988., The effect of culture conditions on lipolytic productivity of microorganismos. Biotechnol. Letters. 10 (3), 199 - 204.
- Tahoun, K. M. Ali, A. H., 1986., Specificity and glyceride synthesis by mycelial lipases of Rhizopus delemar. Enzyme Microb. Technol. 8., 429 - 432.
- Tahoun, K. M., Mashaley, R., Ismail, A., 1988., The mechanisms of Rhizopus delemar intracellular lipases inhibition by various chemicals. Microbios. 53., 139 - 146.
- Talbott, L. L., McCord, C., 1981., La utilización de quesos modificados por enzimas para dar sabor a productos de queso procesado. Segunda Bienal Marschall International Cheese Conference. Celebrada en el Coliseum del Dane County Exposition Center en Madison, Wisconsin.
- Taylor, R., 1993., Expanding Applications in The Food Industry for Immobilized Enzymes. Genetic Engineering News. Vol 13(3):5
- Tobalina, F. Rivera, M. G. Diaz, M. A. Matute, P. Sánchez, S. y Farrés, A.\* Generation of cheese like flavors by lipases from P candidum and R delemar. Cartel presentado en el 23<sup>rd</sup> International Dairy Congress. Montreal, Canadá., Octubre 1990.
- Wasserman, P. B., 1990., Evolution of Enzyme Technology progress and prospects. Food Technol. Abril. 118 - 122.
- West, S., 1988., How enzymes help the dairy industry. Food Manufacture. 63 (5), 29 - 31.

Wolfgang, G., 1990., Enzymes in Industry. Cap. 4 , Industrial uses of enzymes. Ed. VCH, Federal Republic of Germany., 77 - 143.

Anexo I



Cuadro 5

PRUEBAS DE RANGO ACT. LIP.VOL. GPO I

Lac	Sac	Mal	Gal
-----			
9.36			11.46
Glu	GII	Fru	
-----			
12.35		12.61	
Dex			
-----			
13.43			
Alm			
-----			
14.66			
A.O.			
-----			
18.89			

Cuadro 19

PRUEBAS DE RANGO  
(PROTEINA EXTRACELULAR) GPO. I

Sac	GII	
-----		
66.93	88.03	
Dex	Glu	Fru
-----		
99.17		110.07
A.O.		
-----		
124.73		
Alm	Lac	
-----		
130.80	132.27	
Gal		
-----		
134.06		
Mal		
-----		
143.90		

Cuadro 6

PRUEBAS DE RANGO (Yp) GPO I

Lac	Fru	Mal	Gal	Glu	Dex
-----					
1.1852					2.1343
Alm	Sac				
-----					
3.5905	4.2353				

Cuadro 7

PRUEBAS DE RANGO PRODUCTIVIDAD DE LA FERMENTACION GPO I

Lac	Mal	Sac	Glu	Gal	Fru	GII	Dex
-----							
0.1998							0.2735
Alm							
-----							
0.3127							
A.O.							
-----							
0.3749							

Cuadro 8

PRUEBAS DE RANGO VELOCIDAD DE CONSUMO GPO II

Mal	Alm	Sac
-----		
0.0818		0.1015
-----		
Gal		
-----		
0.1130		
-----		
Dex		
-----		
0.1157		
-----		
Glu Lac		
-----		
0.1258		0.1318
-----		
Fru		
-----		
0.1633		

Cuadro 9

PRUEBAS DE RANGO SUSTRATO GPO II

Mal	Alm	Gal	Sac
-----			
5.02			6.34
-----			
Dex Glu Lac			
-----			
6.59			7.04
-----			
Fru			
-----			
8.37			

Cuadro 11

PRUEBAS DE RANGO pH GPO II

Sac	Alm		
-----			
4.80	5.08		
-----			
Gli	Mal	Dex	Gal
-----			
6.10			5.37
-----			
Glu Fru			
-----			
5.52			5.65
-----			
A.O.			
-----			
6.27			
-----			
Lac			
-----			
6.63			

Cuadro 14

PRUEBAS DE RANGO ACT. LIP.VOL. GPO II

Sac	Mal	Gli	Gal
-----			
12.76			14.97
-----			
Alm	Glu	A.O.	Fru
-----			
15.30			16.09
-----			
Dex			
-----			
18.09			
-----			
Lac			
-----			
19.16			

Cuadro 12

PRUEBAS DE RANGO (Ys) GPO II

Fru	Lac
0.9928	1.1606
Glu	Dex
1.4133	1.4363
Gal	
1.6073	
Alm	
1.8146	
Mal	Sac
2.1103	2.1653

Cuadro 17

PRUEBAS DE RANGO PRODUCTIVIDAD DE LA FERMENTACION GPO I Y II\*

Lac	Mal	Sac	Glu	Gal	Fru	Mal*	Sac*	Glu	Dex
0.1998									0.2735
A.O.*	Glu*	Gal*	Fru*						
0.2822			0.2865						
Glu*	Alm	Dex*							
0.2944		0.3128							
Alm*									
0.3202									
Lac*									
0.3467									
A.O.									
0.3749									

Cuadro 18

PRUEBAS DE RANGO pH GPO I Y II\*

Sac*	Alm*	Sac			
-----					
4.80				5.15	
Gli*	Mal*	Dex*	Gal*	Glu*	
-----					
5.31				5.44	
Glu	Fru				
-----					
5.52		5.57			
Fru*					
-----					
5.65					
Gal					
-----					
5.78					
Dex					
-----					
5.82					
Gli					
-----					
6.10					
A.O.*					
-----					
6.27					
Alm	Lac*	A.O.			
-----					
6.51				6.64	
Mal	Lac				
-----					
7.55				7.78	

Cuadro 10

PRUEBAS DE RANGO SUSTRATO GPO I Y II\*

Mal*	Alm*	Mal	Sac	Gal*	Gal	Sac*
						6.34
5.02						
Alm	Dex	Glu	Dex*	Glu*	Lac	Lac*
						7.04
6.48						
Fru						
8.02						
Fru*						
8.37						

Cuadro 13

PRUEBAS DE RANGO (Ys) GPO I Y II\*

Lac	Fru	Mal	Dex
			0.4972
0.1882			
Gal	Glu	Sac	Alm
			0.6302
0.5199			
Fru*	Lac*		
		1.1636	
0.9928			
Glu*	Dex*		
		1.4365	
1.4133			
Gal*			
1.6073			
Alm*			
1.8146			
Mal*			
2.1103			
Sac*			
2.1653			

Cuadro 15

PRUEBAS DE RANGO (Yp) GPO II

Fru	Glu	Gal	Lac
-----			
1.5402			2.1932
Dex			
-----			
2.4323			
Mal			
-----			
2.8500			
Sac Alm			
-----			
3.0911	3.2495		

Cuadro 16

PRUEBAS DE RANGO (Yp) GPO I Y II\*

Lac	Fru	Fru*	Mal	Gal	Glu*	Gal*	Glu	Dex	Lac*
-----									
1.1852									2.1932
Dex*									
-----									
2.4323									
Mal*									
-----									
2.8500									
Sac*									
-----									
3.0911									
Alm*									
-----									
3.2495									
Alm									
-----									
3.5905									
Sac									
-----									
4.2350									

Cuadro 1  
 Analisis de tendencias de  
 Actividad lipolitica volumetrica  
 Sin Aceite

Fuentes de carbono	Analisis de tendencias
Glucosa	Lineal
Fructosa	Cuartico
Dextrinas	Cuadratico
Sacarosa	Cubico
Galactosa	Cuartico
Maltosa	Cubico
Almidon	Lineal
Lactosa	Cuadratico
Glicerina	Cubico
Aceite de oliva 1%	Cuadratico

Cuadro 2  
 Analisis de tendencias de  
 Actividad lipolitica volumetrica  
 Con Aceite 2%

Fuentes de carbono	Analisis de tendencias
Glucosa	Lineal
Fructosa	Lineal
Dextrinas	Lineal
Sacarosa	Lineal
Galactosa	Lineal
Maltosa	Lineal
Almidon	Cubico
Lactosa	Lineal
Glicerina	Lineal
Aceite de oliva 3%	Lineal