



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
CAMPUS IZTACALA

MICROORGANISMOS LIPOFILICOS
PRESENTES EN ACEITE ALMACENADO
CRUDO DE CARTAMO

TESIS PROFESIONAL

QUE PRESENTAN:

JOSE ALBERTO TORRES SANCHEZ
JUAN ALBERTO RAMIREZ GONZALEZ

PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

MARZO DE 1995





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

CAMPUS IZTACALA.

MICROORGANISMOS LIPOFILICOS PRESENTES EN ACEITE ALMACENADO CRUDO DE CARTAMO.

POR:

P. DE B. José Alberto Torres Sánchez.

P. DE B. Juan Alberto Ramírez González.

DIRECTOR:

M. EN C. Agustín Ruiz Cabrera.

El presente trabajo se realizo en el laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Universidad Nacional Autónoma de México campus Iztacala.. El cual contó con el apoyo del departamento de investigaciones, de la Fabrica de Jabón La Corona S.A. DE C.V.

La constancia siempre obtiene las cosas mas difíciles en poco tiempo.

F r a n k l i n .

Nuestro agradecimiento para la realización de esta tesis a los siguientes investigadores, por sus atinados consejos y la oportuna intervención en la culminación de la misma.

Dr. Carlos del Río.

M. en C. Irene Frutis.

Al M. en C. Agustín Ruiz C., maestro y director de esta tesis.

G r a c i a s .

Una dedicatoria muy especial a quien nos a sustentado, en este tiempo la M. C. Josefina Torres Gómez por el apoyo en la realización de este trabajo, por su buen humor y dedicación, además de todo el tiempo cedido a la revisión del proyecto, compartiendo ese caudal de conocimientos y sus siempre acertados comentarios.

A un amigo y profesor que siempre será un ejemplo a seguir, D. en C: José Luis Stephano, quien nos demostró que no existen obstáculos insalvables cuando se desea realizar un proyecto.

Dedicamos esta tesis a nuestras familias quienes respectivamente han tenido la paciencia y el esmero de apoyarnos de principio a fin. Siendo la principal fuente de inspiración y apoyo en los momentos de flaqueza; y que hoy ven la culminación de este esfuerzo. que no es solo nuestro, sino suyo también.

A cada uno de ellos.

Gracias.

INDICE

	PAGINA
ÍNDICE DE DIAGRAMAS	VII
ÍNDICE DE FIGURAS.	VIII
ÍNDICE DE GRÁFICAS.	IX
ÍNDICE DE TABLAS Y CUADROS.	X
1.- RESUMEN.	1
2.- INTRODUCCIÓN.	3
3.- OBJETIVOS.	21
4.- MATERIAL Y MÉTODO.	22
5.- ANÁLISIS QUÍMICOS.	26
6.- ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS.	32
7.- RESULTADOS QUÍMICOS.	37
8.- RESULTADOS MICROBIOLÓGICOS.	49
9.- DISCUSIÓN.	58
10.- CONCLUSIÓN.	70
11.- BIBLIOGRAFÍA.	72

Í N D I C E D E D I A G R A M A S

Diagrama No. 1

Diagrama de flujo del procesamiento de oleaginosas, en la industria extractiva. 5

Diagrama No 2

Metodología, diagrama de flujo 25

Diagrama No. 3

Diagrama de flujo de técnicas microbiológicas y bioquímicas para la obtención y purificación de los diferentes microorganismos 32

ÍNDICE DE FIGURAS .

FIGURA 1 Fórmulas de los diferentes glicéridos.	6
FIGURA 2 Reacción enzimática de lipasas no específicas y lipasas 1,3-específicas	8
FIGURA 3 Representación esquemática de los diferentes puntos de rompimiento enzimático, partiendo de triglicérido para la obtención de diglicéridos, monoglicéridos, glicerol y ácidos grasos libres	9
FIGURA 4 Lugar de ataque de los tres diferentes mecanismos de acción.	11
FIGURA 5 Oxidación bioquímica de grasas.	12
FIGURA 6 Espectro de infrarrojo de ácidos grasos y de sus esteres metálicos.	28
FIGURA 7 Cromatograma de ácidos grasos, por cromatografía de gases.	40
FIGURA 8 Cromatografía de placa fina mostrando los Rf promedio de mono , di y triglicéridos.	43
FIGURA 9 Cromatografía en placa fina presentando los Rf de la muestra Principal (Pr) y Paralela (Pa).	44

ÍNDICE DE GRÁFICAS.

GRÁFICA No. 1

Porcentaje de humedad en superficie, medio y fondo. 38

GRÁFICA No. 2

Diferenciación porcentual de ácidos grasos iniciales y finales para superficie, medio y fondo. 41

GRÁFICA No. 3A

Porcentaje de acidez libre en la región de la superficie para las muestras Pr y Pa. 46

GRÁFICA No. 3B

Porcentaje de acidez libre en la región media para las muestras Pr y Pa. 47

GRÁFICA No. 3C

Porcentaje de acidez libre en la región del fondo para las muestras Pr y Pa. 48

ÍNDICE DE TABLAS Y CUADROS

TABLA 1	
Contenido de humedad en las tres zonas de muestreo.	37
TABLA 2	
Porcentaje de ácidos grasos en las diferentes zonas de muestreo.	39
TABLA 3	
Porcentaje de acidez libre para las diferentes zonas de muestreo, de las muestras Principal y Paralela.	45
CUADRO 1	
Pruebas bioquímicas de bacterias	51
CUADRO 2	
Pruebas bioquímicas de hongos levaduriformes.	53
CUADRO 3	
Prueba de actividad lipolítica en hongos filamentosos.	54
CUADRO 4	
Organismos de mayor incidencia en el estrato de superficie.	55
CUADRO 5	
Organismos de mayor incidencia en el estrato medio.	56
CUADRO 6	
Organismos de mayor incidencia en el estrato del fondo.	57

Resumen:

El presente estudio se realizó con la finalidad de diferenciar la hidrólisis química de la microbiana, para poder determinar su impacto, así como el tipo de microorganismos presentes en el aceite, se partió desde la obtención de la muestra en un tanque de almacenamiento de 790 953 lts. de capacidad, dividiéndolo en tres zonas distintas que son: Superficie, Medio y Fondo.

Posteriormente se procedió a realizar el análisis de los siguientes parámetros fisicoquímicos: Humedad, Acidez libre, Concentración de ácidos grasos y Presencia de Mono, di y triacilgliceridos en el aceite.

Simultáneamente al estudio de los parámetros fisicoquímicos se aislaron y purificaron las cepas encontradas, determinando la especie y/o el género de los microorganismos encontrados y se procedió a confirmar la capacidad hidrolítica de las cepas aisladas, cultivándolas en un medio mínimo con aceite de cártamo, como fuente única de carbono.

Al concluir el análisis comparativo de los resultados de acidez o grado de hidrólisis del aceite, se designaron los posibles mecanismos de degradación o rompimiento del triacilglicerido, según observaciones realizadas, por cromatografía en placa fina.

Una vez finalizado el estudio se cuantificó la pérdida diaria de aceite, donde para un tanque de 790 953 lts, es de 384.18 Lts.

Como resultado de estos estudios se detectaron los siguientes microorganismos:

Pseudomonas viridiflava., *Candida sp. 11.* y *Aspergillus terrus*, las cuales son capaces de llevar a cabo una hidrólisis parcial o total del aceite, con un tipo de reacción enzimática, no específica.

Introducción:

La industria del procesamiento de aceites y grasas vegetales es de las más complejas del país: Abarca desde la molienda de oleaginosas, como materia prima, la elaboración de aceites comestibles, pastas para alimentos balanceados de consumo animal, productos químicos, hasta la elaboración de jabones y cosméticos. El valor de su producción representa cerca del uno por ciento del producto interno bruto, con una participación de N\$ 16 900 millones de nuevos pesos para 1990 (INEGI; 1993).

En México se explotan algodón, ajonjolí, soja, girasol, coco, coquito, linaza, cacahuete, nabo, maíz (gérmen) y cártamo. En nuestro país tenemos un consumo *Per Capita* calculado según censo realizado en 1991, fue de 1.083 Kgs. Estimándose 98 000 hectáreas sembradas para el mismo año (INEGI, 1993). Dentro del renglón de los aceites comestibles, México cuenta con la infraestructura necesaria para su elaboración, proceso que incluye: recolección de la semilla, molienda, extracción del aceite crudo, su almacenamiento, así como su blanqueo deodorizado, entre otros, hasta su envasado. (Diagrama No. 1).

El aceite o grasa neutra es el éster de los ácidos grasos del alcohol glicerina y recibe el nombre de acilglicerido, grasa neutra o glicérido (Lehninger, 1975).

Cuando los tres grupos de la glicerina se encuentran esterificados con ácidos grasos (C-R) la estructura resultante recibe el nombre de triacilglicerido constituyendo este la mayor parte de lo que son la grasa neutra naturales. Sin embargo, en la naturaleza se encuentran también diacilgliceridos y monoacilgliceridos (op cit.). (Figura No. 1)

El ácido graso como componente principal del triacilglicerido, es una larga cadena carbonada que además de contener un grupo carboxilo, presenta o no dobles enlaces. El número de átomos en las cadenas carbonadas es generalmente 16, 18 o 20. Y el número de dobles enlaces va de cero a cuatro e.g. Acido palmítico (16,0) que es el más común de los ácidos saturados, ácido oleico (18,1) el más abundante de los ácidos monoinsaturados, el ácido linóleico (18,3) y el ácido araquídico (20,4), son los principales ácidos poliinsaturados. (Mc Murray, 1975).

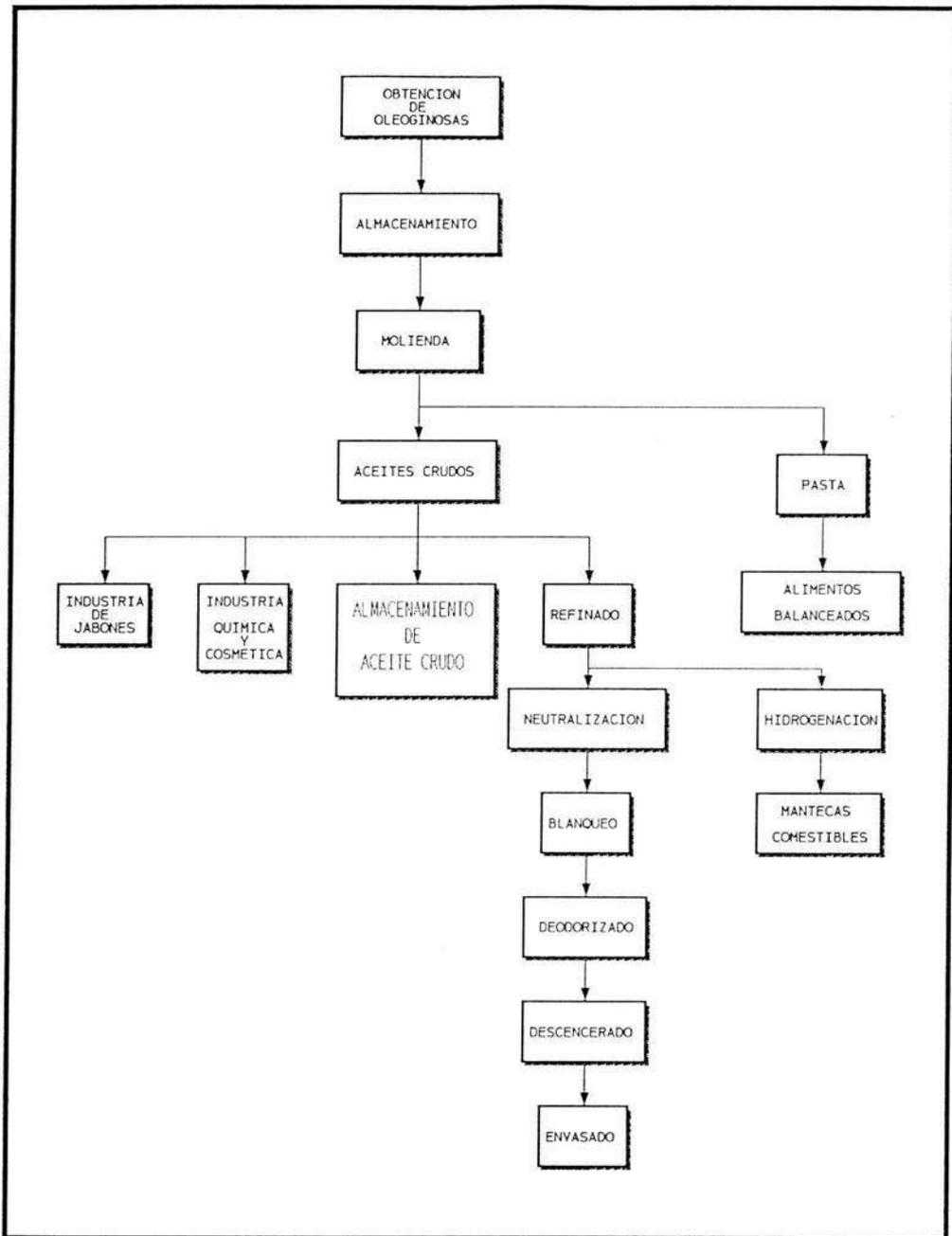


DIAGRAMA No. 1.- Diagrama de flujo del procesamiento de oleaginosas, en la industria extractiva.

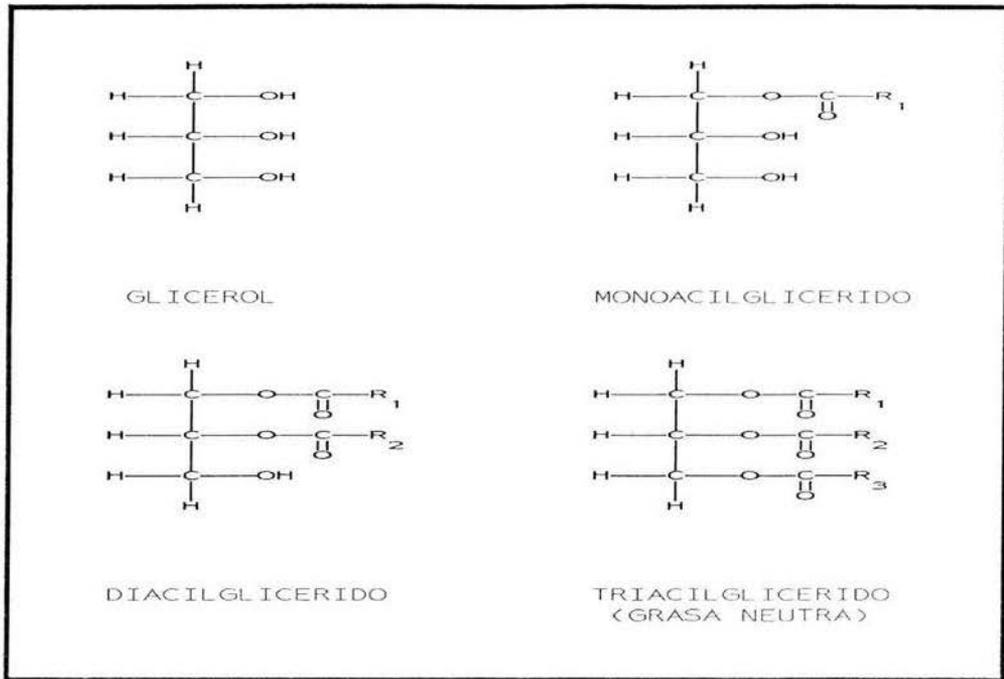


FIGURA No. 1.- Fórmulas de los diferentes glicéridos.

Las grasas o lípidos desempeñan distintas funciones en los seres vivos:

a) Como agente de protección de las paredes celulares en muchas bacterias (Dart y col, 1980), como componentes en plantas superiores, principalmente en el endospermo (palmeras) o en los cotiledones del embrión (soja, cártamo) (Inst. de Sevilla, 1981).

b) Como componente estructural de las membranas celulares (Lehninger, 1975).

c) Como aislante térmico en tejido subcutáneo e.g. mamíferos del ártico (Schmidt, y col, 1987).

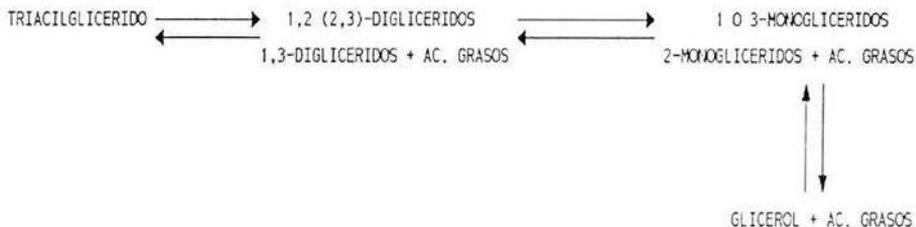
d) Como fuente de energía calorífica empleados directa o indirectamente, en aves migratorias. Ya que la oxidación de un gramo de grasa proporciona 9.3 Kcal. en contraste con los carbohidratos y proteínas que solamente liberan 4.2 a 5.6 Kcal. respectivamente (Lehninger, 1975).

De lo anterior se resume que tanto animales, plantas y microorganismos requieren principalmente tres alimentos que son: Hidratos de carbono, aminoácidos y grasas (Senez, 1976).

Actualmente se sabe que la fermentación es un proceso de oxido-reducción, que se lleva a cabo en los microorganismos y organismos en general por medio de catalizadores biológicos o enzimas (Tamayo Legorreta, 1989).

Las enzimas que catalizan la hidrólisis de los triacilgliceridos, para darnos ácidos grasos libres y glicerol reciben el nombre genérico de lipasas: estas enzimas pertenecen al género no específico de las Carboxi-éster-hidrolasas. (Koksho y col, 1982) (Figura No. 2).

LIPASAS
NO ESPECIFICAS



LIPASAS
1,3 ESPECIFICAS

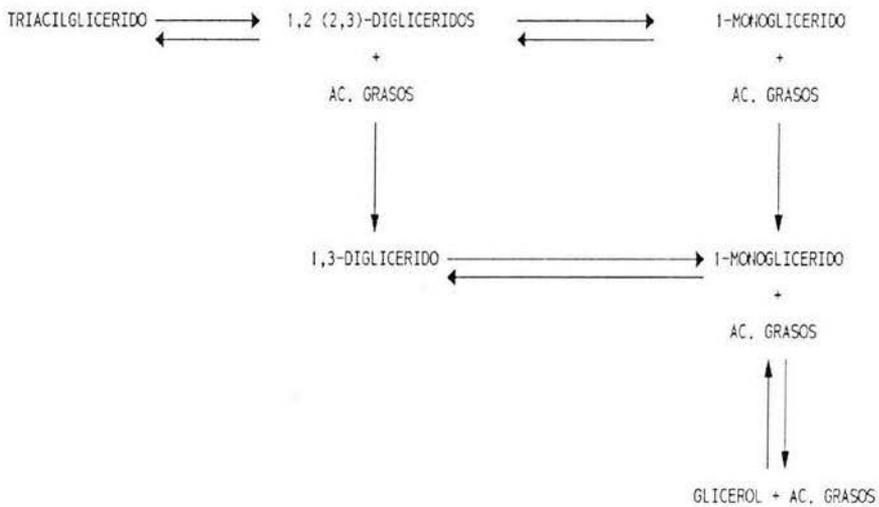


FIGURA No. 2.- Reacción enzimática de lipasas no específicas y lipasas 1,3 específicas. (Okamura, S. y col, 1976)

Por su carácter restringido y específico de las reacciones que catalizan (Sidney, 1977). Esta característica se puede observar en las lipasas que cortan los ésteres de la posición 1,3 del triacilglicerido, mientras que otras hidrolizan cualquiera de los tres enlaces con idéntica especificidad, por consiguiente contamos con lipasas no específicas y lipasa 1,3 específicas. (Figura No. 3)

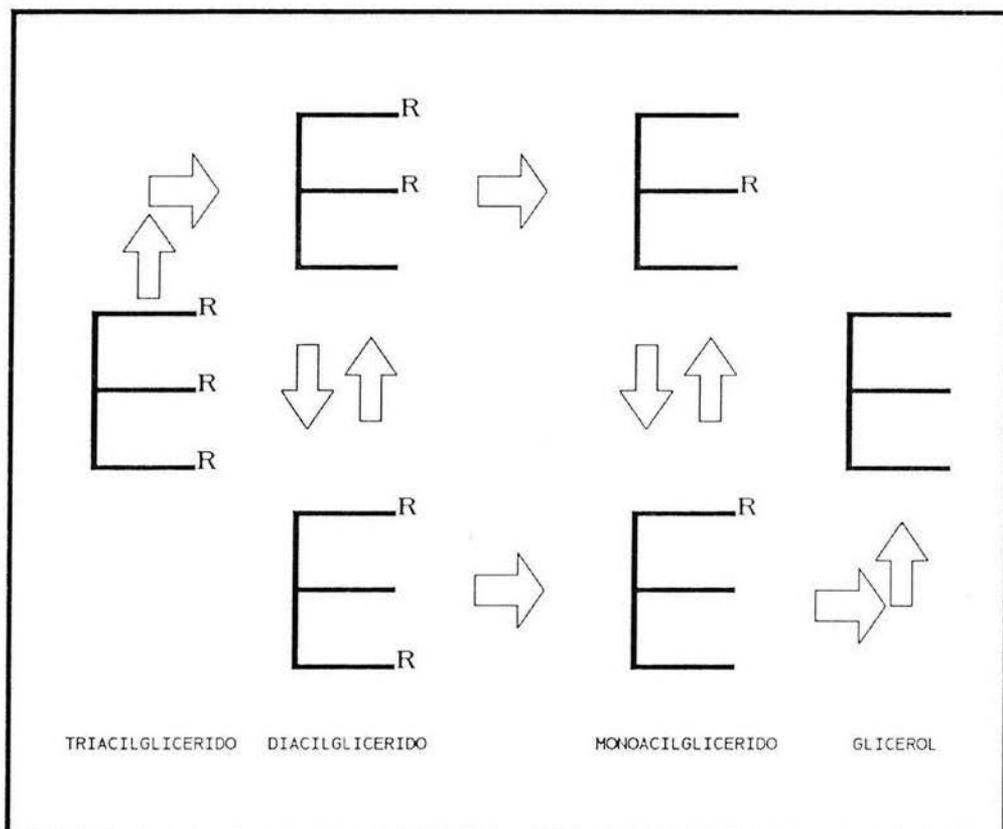


FIGURA No. 3.- .Representación esquemática de los diferentes puntos de rompimiento enzimático, partiendo de triacilglicerido para la obtención de Diglicéridos, Monoglicéridos, Glicérol y Ácidos grasos libres. (Novo, 1985)

Después de ser liberados los ácidos grasos del triacilglicerido, estos son integrados al metabolismo mediante los tres mecanismos, descubiertos hasta ahora, que son:

1) La β -oxidación, que es el proceso más universal, ya que tiene lugar en toda clase de seres vivos y es el más importante. El sitio de ataque es el segundo carbono, después del grupo carboxilo o carbono β . Obteniéndose un ácido con dos átomos de carbono menos.

2) En la α -oxidación, que es específica para los vegetales superiores, el ataque se efectúa en el carbono siguiente al grupo carboxilo ó carbono alfa y da lugar a la formación de un ácido graso con un átomo de carbono menos. Se utilizan para la obtención de ácidos grasos impares la alfa hidrólisis, y eliminación de obstáculos en la cadena grasa para facilitar el camino a la Γ -oxidación.

3) La Γ -oxidación que se ha demostrado en los animales y ciertas bacterias, siendo hipotética su existencia en los vegetales. El ataque tiene lugar en el último carbono contando a partir del grupo carboxilo, Obteniéndose un ácido dicarboxílico.
(Ruiz, 1986)

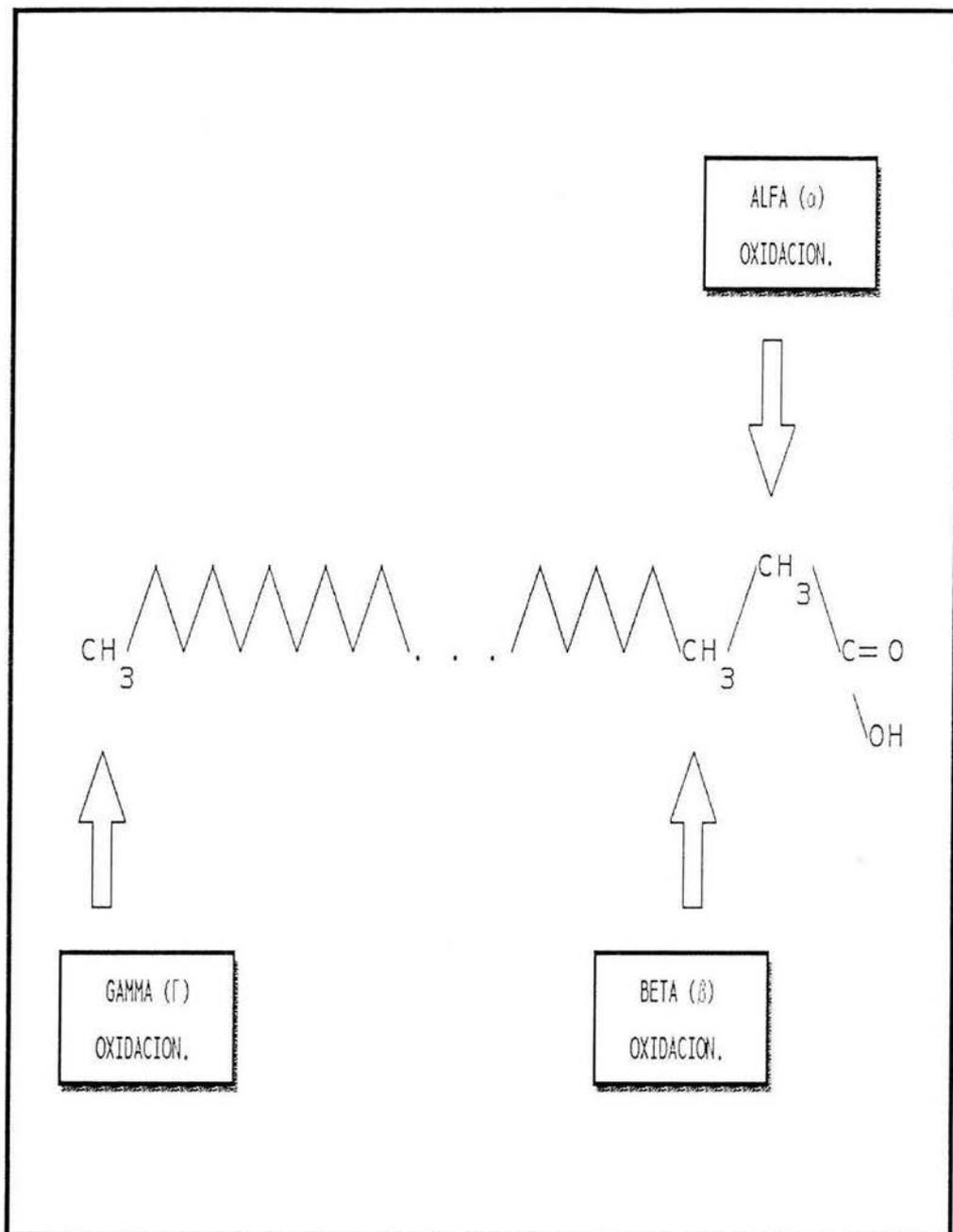


FIGURA No. 4.- Lugar de ataque de los tres diferentes mecanismos de acción. (Mazuelos, V., 1981)

Posterior a la beta o alfa oxidación se inicia la fase degradativa de la cadena carbonada del ácido graso para producirnos restos de acetilo en forma de acetil CoA, seguida por la oxidación de los restos de acetilo a CO₂. (Lehninger, 1975), (Figura No. 5).

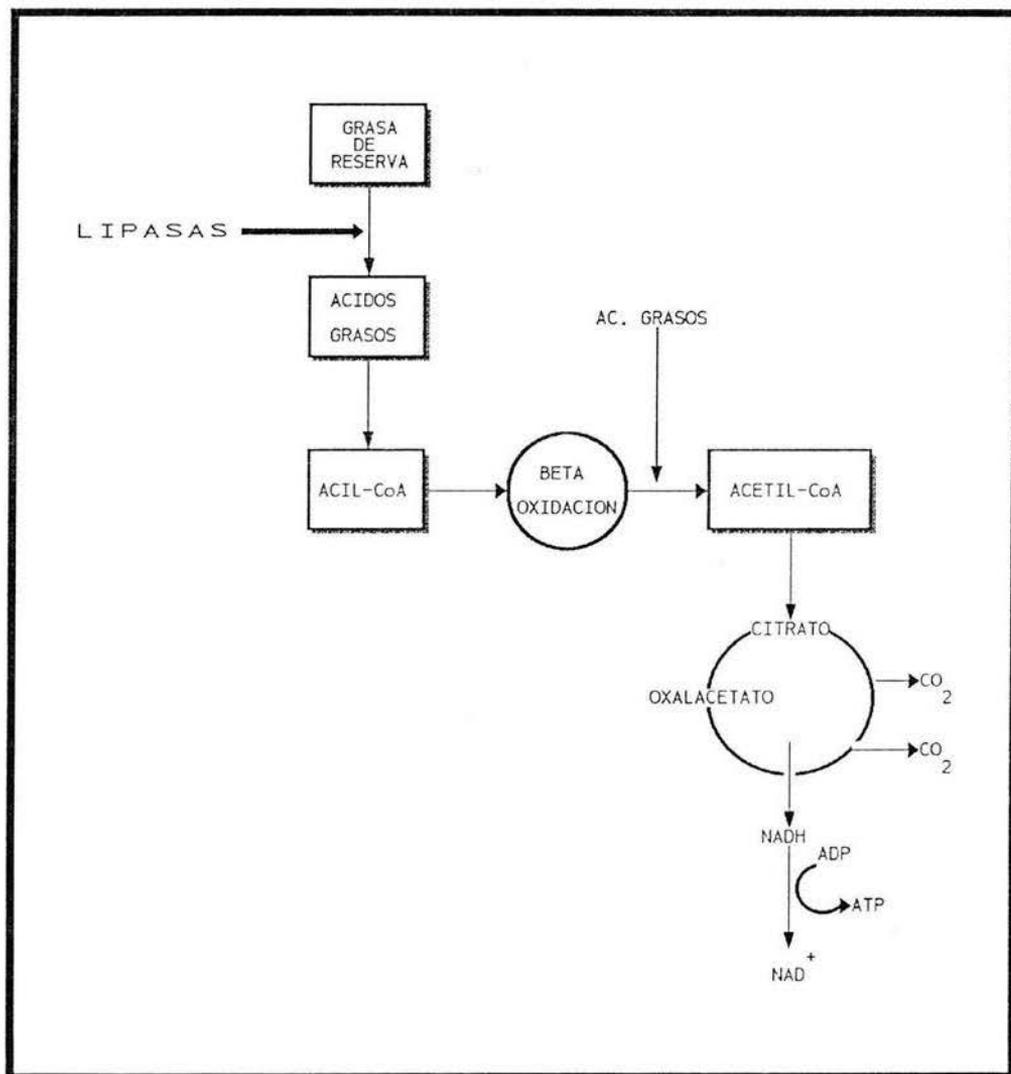


FIGURA No. 5.- Oxidación bioquímica de grasas. (Mazuelos, V., 1981)

El desarrollo de conceptos químicos más rigurosos, así como el conocimiento más amplio de la naturaleza de acción de estos sistemas subcelulares "enzimas", tuvo como resultado un mayor auge de la biotecnología dentro de la industria de grasas y aceites. Este nuevo impulso motivó a Coleman M.H. (1961), a realizar estudios relativos a la forma en que opera la lipasa pancreática sobre los triacilgliceridos de origen animal y vegetal, encontrando que actúa en el grupo 1,3 además de observar que en los monogliceridos resultantes a la hidrólisis predominan los ácidos grasos esteárico y oleico.

En otro trabajo realizado por Luddy y col. (1964), se comprueba la especificidad de la lipasa pancreática en la posición 1,3 del triacilglicerido. El conocimiento de este mecanismo facilitó la caracterización del triacilglicerido así como su composición original, auxiliándose para ello de técnicas, tales como cromatografía en capa fina (CCF), y cromatografía de gases (CG), (Coleman y Col, 1965). Otros autores comienzan a utilizar lipasas de organismos como, *Rhizopus*, *Enterobacter*, *Aspergillus*, *Pseudomonas*, *Chromobacterium*, *Candida*, *Múcor* y *Penicillium*, para sintetizar ésteres de carbohidratos, partiendo de ácidos grasos (ácido esteárico, oleico y linoléico) y carbohidratos (sacarosa, glucosa, fructuosa y sorbitol), encontrando que la lipasa de *Candida cylindracea* es la más activa para la síntesis

de ésteres de carbohidratos (Seino y col, 1984), siendo estos de importancia para la industria de emulsificantes, alimentos, cosméticos y medicamentos.

La necesidad de contar con triacilgliceridos formados con ácidos grasos específicos, condujo a trabajos con lipasas de organismos como *Candida lipolitica*, para realizar biomodificaciones en grasas y aceites (Bati y col, 1984).

Al observar la versatilidad de los microorganismos se buscaron nuevas formas de aprovechamiento, como es el caso de *Eubacterium rumiantum* que al desarrollarlo en condiciones anaerobias, con melaza como sustrato, se obtuvieron los siguientes subproductos: proteínas unicelulares y ácidos grasos libres, que a su vez fueron utilizados para el enriquecimiento de alimentos para ganado (Ketan I. M. 1984).

Warner y col, (1984), realizaron trabajos con lipasas de *Candida rugosa*, *Aspergillus niger* y *Rhizopus arbizus*, para hidrolizar grasas como sebo, aceite de coco y aceite de olivo, encontrando que a temperaturas de 24 °C a 25 °C se hidroliza más rápido el aceite de olivo, observando además que esta reacción se ve afectada negativamente por la presencia de solventes de hidrocarburos y surfactantes iónicos. El mismo autor continua sus trabajos utilizando lipasas de *Candida rugosa*, proponiendo su utilización en forma

industrial, obteniendo resultados de un 95% a un 98% de hidrólisis de aceite de olivo a una temperatura de 26 °C a 40 °C, utilizando 15 unidades de lipasa por miliequivalente U/meq para aceite de coco y 6 U/meq para el aceite de olivo, en un lapso de tiempo de 72 hrs., con un margen de repetitividad de +/- 10% .

Para el año de 1987, el Dr. Matías Buhler y Col. inician estudios de hidrólisis en aceite de olivo y de soja con enzimas de *Candida cylindracea* y *Pseudomonas sp.*, modificando los diferentes parámetros fisicoquímicos, proponiendo su estudio como alternativa para reducir costos en la industria, ya que en la actualidad para hidrolizar la grasa se utilizan altas presiones y temperaturas. Park y Col, (1988), encuentran que al mezclar lipasas de *R. delemar*, *R. niveus* y *Penicillium sp.* se alcanzan valores de hasta el 98% de hidrólisis de aceite de soja y maíz.

En paralelo a las investigaciones antes mencionadas, se efectuaron trabajos mas íntimamente relacionados con la iniciativa privada, e.g. Posorske (1984), nos presenta algunas ventajas en el empleo de enzimas dentro de la industria procesadora, como son:

a) Alta especificidad, lo que permite un control de los productos así como la reducción en los pasos de producción.

b) Condiciones moderadas con decremento de costos en términos de energía y equipo, reduciendo subproductos por su baja temperatura.

c) Bajo contenido de deshechos.

Proponiendo además su utilización en la industria de saborizantes, procesamiento de lípidos particularmente en el área de hidrólisis de grasas por hidrólisis inversa e interesterificación.

Siguiendo la misma línea de estudio tenemos a Boyce C. (1984), que nos habla del gran potencial que tienen las enzimas en el mercado internacional. Neidelman y Col. (1984), proponen el empleo de enzimas que requieren niveles altos de solventes orgánicos, como es la síntesis oleoquímica, así como también en la producción de monoesteres para uso alimenticio, con lipasas de *Acinetobacter sp.*

Rattray J. (1984), menciona diferentes aplicaciones de las enzimas a nivel industrial e.g. hidrólisis de triacilgliceridos, formación de ésteres, modificación de esteroides en la producción de mantequilla de cacao, biosurfactantes y derivados de prostaglandinas.

Finalmente a mediados de 1987, en el ramo de la biotecnología Schmid R. (1987), refiere algunos campos en los que utilizan las enzimas como es el caso de la oleoquímica, en la biotransformación, síntesis de ésteres y producción de alcoholes grasos.

Otro de los giros que exhibió el estudio de las lipasas fue el control de calidad de los aceites, como es el caso de la investigación que realizó el Dr. Mazuelos Vela (1981, 1983), donde se muestra que la distribución de las grasa en la molécula glicerídica de los aceites naturales es diferente de la que presentan los aceites esterificados. Basándose en esta diferencia describe un método de análisis cualitativo y cuantitativo para detectar adulteraciones de aceites esterificados con aceites naturales, incluyendo la lipólisis de la muestra con lipasa pancreática.

Dentro de esta misma rúbrica encontramos el trabajo hecho por Ruiz Gutiérrez (1986), donde consideró los posibles efectos tóxicos de los ácidos grasos naturales alterados, además de otros contaminantes.

Como se puede observar, el estudio de las enzimas a nivel biotecnológico y/o industrial ha tenido un avance considerable, sin embargo el efecto que tienen las enzimas "in vivo", como componentes intra o extracelulares de organismos que presentan capacidades lipolíticas ha sido poco examinado.

El-Saadany y Col. (1986), nos dan un ejemplo plausible, sobre el efecto que tiene la presencia de *Aspergillus flavus* en semillas de algodón, donde nos muestra los cambios en la composición de ácidos grasos como son: mirístico, palmítico y esteárico, en las semillas sanas es cuatro veces más alto que en las infectadas, en las cuales encontramos ácidos grasos insaponificables del orden de C₂₂, C₂₃, C₂₉ y en ambas solo que en mayor proporción en las infectadas el C₂₄ y C₃₀. El colesterol y estigmasterol desaparecen en aceite infectado mientras que en las sanas aumenta el sitosterol y campesterol.

Fucikovsky (1980) hace relación de las enfermedades del girasol ocasionadas por bacterias, como son: *Erwinia arthrooptia*, *Erwinia caratovora*, *Pseudomonas marginalis*, *Pseudomonas marginata*, *Flavobacterium sp.* y la calidad del aceite crudo como producto final.

Se ha observado que las plantas poseen en su superficie una microflora característica, aparte de esta flora superficial propia, los productos naturales se contaminan a partir del medio ambiente (suelo, agua, materiales cloacales, etc) de tal forma que los microorganismos aquí presentes se añaden a la microflora natural.

Por ejemplo, en un estudio realizado en el Instituto de Sevilla (1981) sobre la conservación de aceituna de molino, se aislaron diferentes tipos de bacterias, mohos y levaduras, que se desarrollaron sobre la aceituna atrojada. De las bacterias, únicamente tres cultivos pertenecientes a los géneros *Pséudomonas* y *Serratia*, presentan actividad lipolítica intensa. En cambio de las levaduras y mohos, nueve pertenecientes a los géneros *Trichosporum*, *Candida*, *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*, presentan actividad lipolítica intensa y en otros siete, dicha actividad es débil.

Se advierte entonces que existen microorganismos capaces de obtener su energía a partir de las grasas.

La alteración debida a la oxidación microbiana o química, se denomina enranciamiento oxidativo para distinguirla de las alteraciones consecutivas a la hidrólisis, causada por lipasas presentes originalmente en el alimento, o llegadas a él con los microorganismos, a la que suele denominarse enranciamiento hidrolítico.

Finalmente tenemos el estudio realizado por Horvath (1939), quien concluyó que el deterioro en el almacenamiento del aceite depende no solamente de factores externos sino, también de la condición inicial

del aceite en cuanto a su contenido de humedad, ácidos grasos libres, cantidad de impurezas orgánicas y contaminación por microorganismos.

Los hongos de la especie *Penicillium*, *Fusarium* y *Monilia*, poseen la mayor potencia para desdoblar grasas y se ha estimado que bajo condiciones conducentes a su crecimiento, el contenido de ácidos grasos libres del aceite se ve incrementado.

Objetivos:

- 1.- Determinar los microorganismos lipofílicos presentes en un tanque de almacenamiento de aceite crudo de cártamo.
- 2.- Evaluar los parámetros fisicoquímicos presentes en el tanque de almacenamiento.
- 3.- Medir el impacto de la degradación de aceite de cártamo por efecto microbiano.
- 4.- Designar los posibles mecanismos de degradación de los triacilglicéridos por efecto enzimático microbiano.

Material y método:

De un tanque de almacenamiento de aceite crudo de cártamo seleccionado al azar, con una capacidad de 790 953 lts. se extrajo la muestra a estudiar (Diagrama 2), sumergiendo una botella de muestreo zonal de 948 mL. (GCA-presicion Scientific cat. no. 14851) adquiriendo así la muestra de la Superficie, Medio y Fondo (Sup, Med y Fon).

Posterior a la obtención de la muestra, esta se recibe en un contenedor con una capacidad de 1000 mL. (previa esterilización del mismo).

Una vez obtenidas las tres muestras, Sup, Med y Fon, se procedió a homogeneizar las muestras con un agitador magnético introducido en el interior del frasco contenedor antes de su esterilización.

Las tres muestras se agitaron por espacio de cinco minutos para asegurar su uniformidad, esto se hizo en las condiciones asépticas adecuadas, con la finalidad de evitar en lo posible contaminación microbiana externa.

Al concluir la homogeneización, se tomaron dos muestras de 250 mL. cada una, de las diferentes zonas de muestreo.

Obteniéndose 6 muestras en total, dos para la superficie, dos para la parte media y dos para la profundidad del tanque.

De las seis muestras, se tomaron tres, una de cada zona de muestreo y se etiquetaron como muestra principal (Pr), zona de procedencia y fecha de muestreo.

Las tres muestras restantes se etiquetaron como muestra paralela (Pa), zona de procedencia y fecha de muestreo.

Las muestras Pr, fueron los controles biológicos en cuanto al grado de hidrólisis del aceite o triacilglicerido, ocasionado por microorganismos.

Las muestras Pa, fueron los controles químicos, para poder diferenciar la actividad hidrolítica microbiana de la química y así poder cuantificar el daño que ocasionan los microorganismos al aceite crudo.

El tratamiento que se les dió a las muestras Pr fue el siguiente:

Se incubaron a 37 °C por un periodo de 7 días, al concluir la incubación se cuantificó su acidez, como ácidos grasos libres, representando lo anterior, el grado de hidrólisis en el triacilglicerido.

Por otro lado se corrieron por cromatografía en capa fina (C.C.F.), alícuotas de las muestras a examinar, para detectar el rompimiento del triacilglicerido, via enzimatica.

Para el caso de las muestras Pa, se esterilizaron en autoclave a 15 lbs de presión durante 30 minutos, al finalizar la esterilización se incubaron junto con las muestras Pr por el mismo lapso de tiempo, para posteriormente cuantificar el por ciento de acidez.

En paralelo al procedimiento anterior, a los 448 mL. restantes de la muestra de aceite, de cada una de los diferentes puntos de muestreo, se le hicieron los siguientes análisis químicos y microbiológicos.

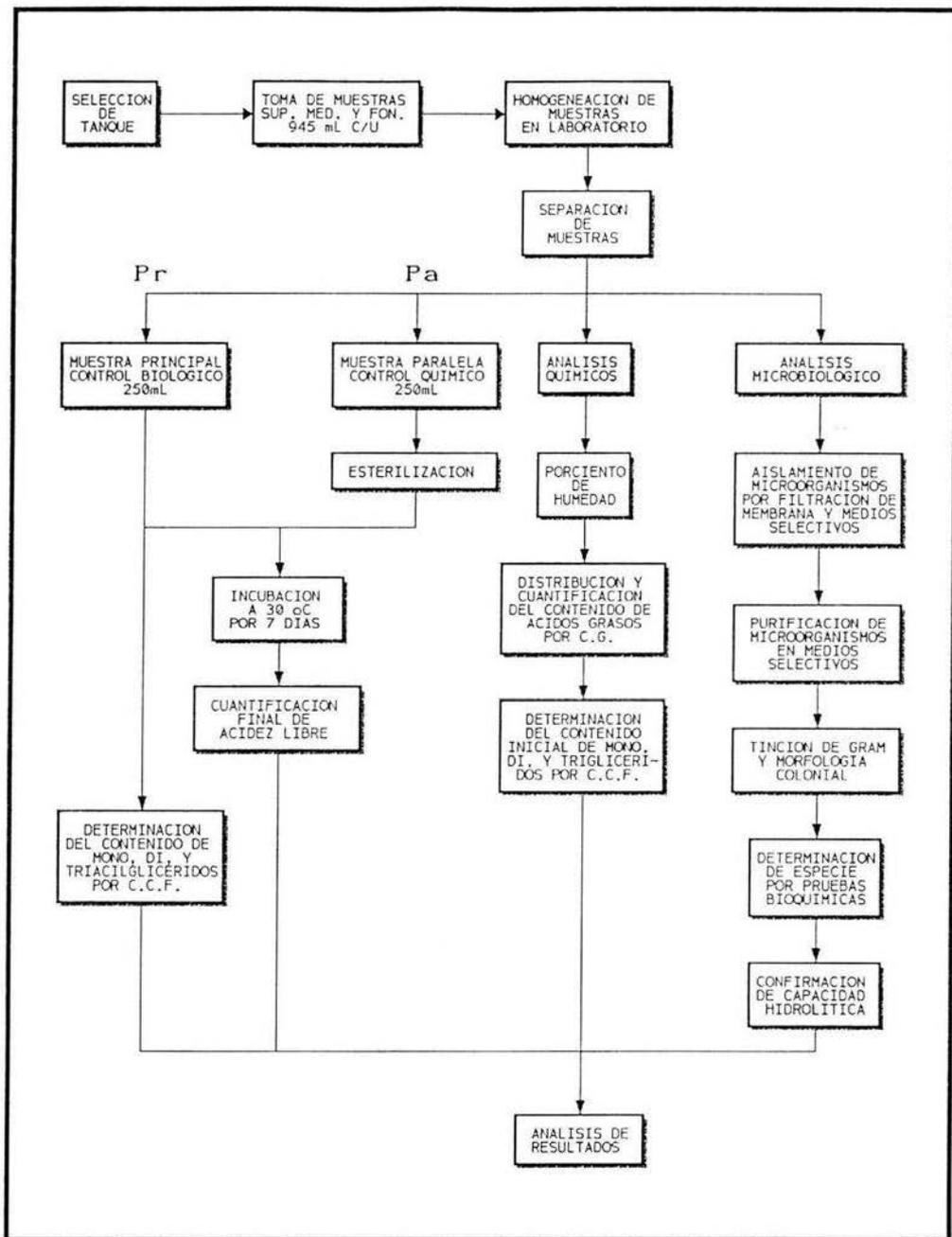


DIAGRAMA No. 2.- Metodología, diagrama de flujo.

Análisis químicos:

A) Cuantificación de humedad. (A.O.C.S., Da 2b-42)

Titulación de humedad por el método Karl-Fisher (K-F).

De la muestra de aceite se pesaron 2 grs. +/- 100 mg y se introdujeron en el vaso de K-F, una vez dentro se disolvieron con 20 mL. de metanol anhidro, al concluirse la disolución, se titularon con reactivo de K-F, después de finalizada la titulación se tomó la lectura del volumen gastado.

Este procedimiento es igual para cada una de las muestras así como para un control de humedad. El control de humedad se obtuvo pesando 150 mg. de tartrato de sodio en el vaso de K-F, y se tituló de igual manera.

Cálculos:

(Peso del tartrato de Sodio) (15.66)

----- = factor

Volumen gastado de Reactivo K-F

(factor) (Vol. gastado de Reactivo K-F)

----- = % DE HUMEDAD

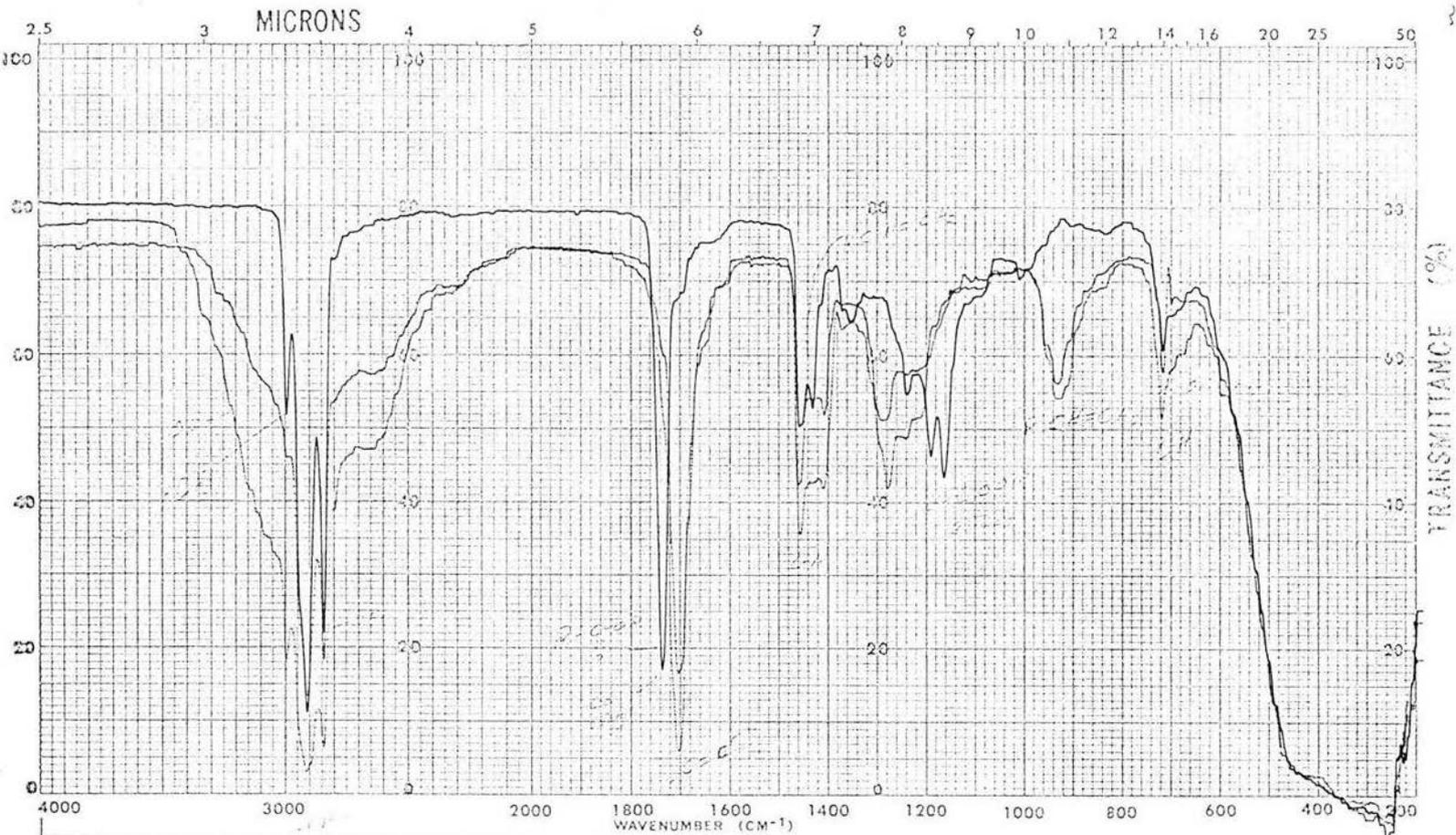
Peso de la muestra.

B) Cuantificación de ácidos grasos por cromatografía de gases (CG) (IUPAC).

Se pesaron 2 grs. de cada una de las muestras en un vaso de precipitado de 250 mL. y se agregaron 200 mL. de KOH 5.0 N en solución alcohólica, se calentaron hasta dejar un volumen aproximado de 50 mL, agregándoles posteriormente 100 mL. de agua destilada para disolverlos. Una vez disueltos se pasaron a un embudo de separación y se les agregaron unas gotas de anaranjado de metilo como indicador de pH, para ser acidulados con HCl 1:1. Una vez frío el contenido del embudo de extracción se agregó 50 mL. de éter de petróleo, se agitó de tal manera que los ácidos grasos se disolvieran en el éter, se dejó reposar hasta que la capa de éter quedara clara, a continuación se drenó la fase acuosa para dejar solo la fase etérea.

El éter con los ácidos grasos, se secaron con sulfato de sodio anhidro, pasando la muestra anhidra éter-ácidos grasos a un vaso de precipitado de 100 mL., para evaporar el éter de petróleo y así obtener la mezcla de ácidos grasos a analizar.

Para poder metilar los ácidos grasos se pesaron 100 mg. de muestra en un matraz de evaporación de 50 mL., provisto de refrigerante, adicionándole 3 mL. de trifluoruro de boro al 12.5 % en metanol, se calentó



SAMPLE <i>Azul Ac. grasos.</i> <i>Negro-Esteras Matihos.</i> ORIGIN	SOLVENT _____ CONC _____ CELL PATH _____ REFERENCE _____ PERKIN-ELMER	SCAN _____ SLIT _____ OPERATOR _____ DATE _____ No. 5102-1000	SINGLE B. _____ T.D. SPEED. _____ ORD. EXP. _____ T.CONST _____ REF. No. _____	REMARKS.
--	---	---	--	----------

la muestra a ebullición durante dos minutos, tiempo suficiente para su total metilación.

La reacción se detuvo adicionando 3 mL. de agua más 3 mL. de n-pentano, se paso la muestra a un embudo de separación de 60 mL y se deshechó la fase acuosa, el n-pentano con los ésteres metílicos se secaron con sulfato de sodio anhidro, finalmente se evaporó el n-pentano, introduciendo la muestra en un baño María, haciéndole pasar una corriente de nitrógeno, se confirmó la metilación por espectroscopia de infrarrojo. (Figura No. 6)

FIGURA No. 6.- Espectro de Infrarrojo de ácidos grasos y de sus ésteres metílicos.

Una vez concluida la metilación se disolvieron los ésteres metílicos en 0.3 mL. de éter etílico y se inyectaron al cromatógrafo de gases.

Las condiciones de operación del cromatógrafo de gases Perkin Elmer 2B fueron las siguientes:

Temperatura del inyector 235 °C

Temperatura del detector 260 °C

Temperatura programada del Horno.

Temperatura inicial 160 °C

Temperatura final 215 °C

Tiempo inicial 0 minutos.

Tiempo final 60 minutos

Incremento de temperatura 6 °C por minuto

Integrador:

Tiempo 60 - 1.5

Rango de sensibilidad 70.4

Atenuación de la carta 5.10

Columna Perkin Elmer de 2 m. de longitud por 1/8 de diámetro con soporte DEGS al 15 %.

C) Determinación de Mono, Di y Triacilgliceridos por cromatografía en capa fina (CCF) (IUPAC, MII, D27; C7.) (Privett, 1961).

Para determinar el contenido de los diferentes glicéridos (el análisis es semicuantitativo) se tomó un μL de cada uno de los estándares además de una alícuota de cada una de las muestras y se colocaron sobre la placa en forma horizontal con intervalos de un centímetro de cada una.

Por otro lado se preparó la mezcla de solventes para el corrimiento, se midieron:

210.0 mL. de éter de petróleo.
90.0 mL. de éter etílico.
0.4 mL. de ácido fórmico.

Se hizo la mezcla de solventes, y a continuación fueron colocados dentro de la cámara de cromatografía, se dejó saturar la atmósfera interna de la cámara por un lapso de 10 minutos, antes de iniciar el corrimiento.

El corrimiento se detuvo cuando el frente de solventes se encontraba a un centímetro de la altura máxima de la placa.

La placa se seco con corriente de nitrógeno, para posteriormente revelarla con vapores de yodo.

Una vez revelada la placa se identificarón los puntos concernientes a ácidos grasos, Mono, Di y Triacilgliceridos, comparando las alturas (Rf) de los estándares con las de la muestra problema, posteriormente se sumaron las áreas representadas en las placas de cromatografía, para obtener la concentración aproximada de mono, di y triacilgliceridos, para cada uno de los diferentes puntos de muestreo Sup, Med, y Fon.

D) Cuantificación de acidez (A.O.C.S., Da 4a-48).

Se pesaron por separado 5 grs. +/- 100 mg. de cada una de las muestras en un vaso de precipitado de 150 mL. y se agregaron aproximadamente 80 mL. de alcohol etílico neutro, se calentaron durante 5 minutos, a continuación fueron tituladas con NaOH 0.125 N, utilizando como indicador fenoftaleina, la titulación se dio por concluida en el momento que el color rosado persistió por 30 segundos

Cálculos:

(Vol. gastado de NaOH) (0.125 N) (0.269) (100)
----- = % DE ACIDEZ*
Peso de la muestra.

* La acidez se cuantificó tomando el peso promedio de los ácidos grasos presentes en la muestra, que es de 269.30

Análisis Microbiológico:

De los 438 mL. de aceite de cártamo restantes, de cada uno de los puntos de muestreo (Sup, Med y Fon) se tomaron 5 alícuotas de 80 mL. para extraer los microorganismos presentes y sembrarlos en cinco diferentes medios de cultivo. (Diagrama No. 3).

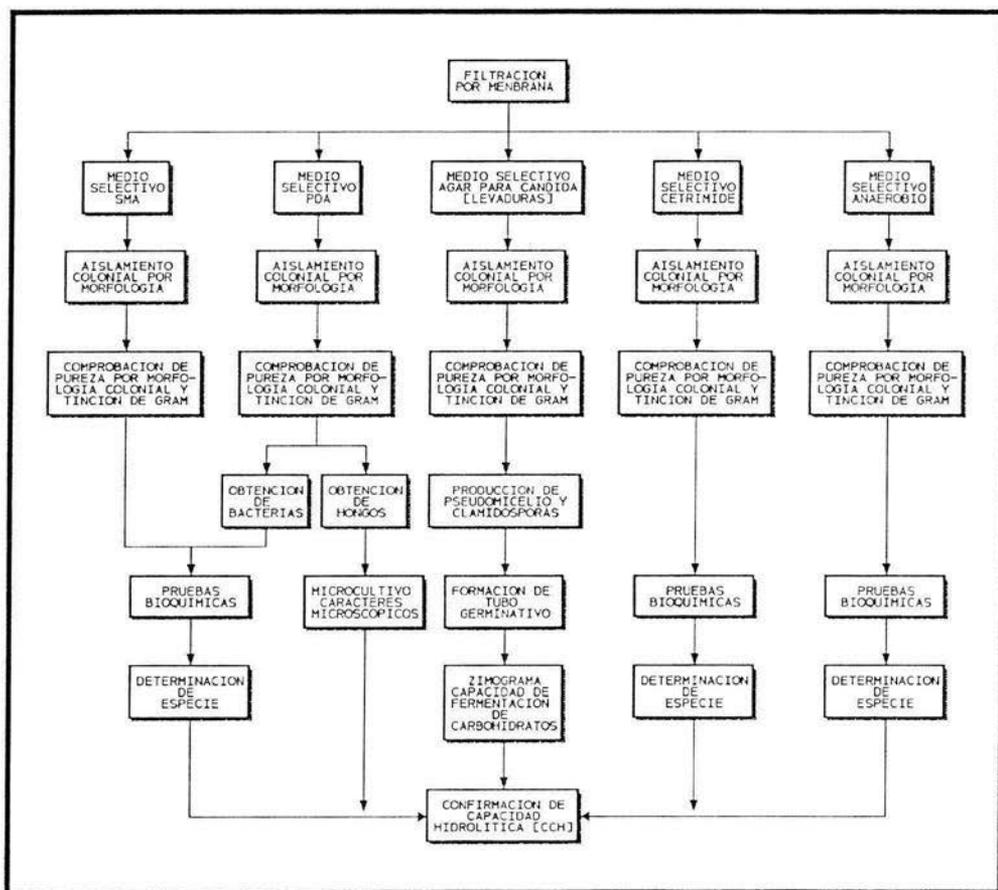


DIAGRAMA No. 3.- Diagrama de flujo de técnicas microbiológicas y bioquímicas para la obtención y purificación de los diferentes microorganismos.

A cada alícuota de 80 mL. de aceite se le agregaron 100 mL. de solución buffer pH 7 más un mL. de tritón X-100 (Farmacopea, Mex.1977) y fueron introducidos en un embudo de separación de 500 mL. con tapón esmerilado (ambos estériles), a continuación se agitaron 25 veces de manera manual para poder extraer los microorganismos en la fase acuosa.

La fase acuosa se filtró con una membrana de 47 mm. de diámetro, con un poro de 0.45 μm , al concluir la filtración se extrajo la membrana de manera aséptica se introdujo cada una de las membranas en una caja petrí estéril con agar selectivo, incubándose a 37 °C por 24 hrs.. Este proceso se repitió para cada uno de los diferentes medios de cultivo que son: SMA, PDA, Cándida, Centrimide y Anaerobio (este último se incubó en anaerobiosis). Posteriormente a la filtración en membrana y a la purificación de los microorganismos en diferentes medios de cultivo, se sembraron por estría, para aislarlos, respetando el agar de procedencia, en seguida se leyó la morfología colonial y se realizó tinción de Gram.

A continuación se procedió a su identificación por medio de las siguientes pruebas: Tinción de Gram, Citrato, Reducción de nitrato, Acido Sulhídrico, Motilidad, Indol, Descarboxilasas con Ornitina y Lisina, reacción de la Ureasa, Reacción de Voges-roskauer y Rojo de Metilo, Cianuro de Potasio,

Licuefacción de gelatina, Oxidasa, Catalasa y fermentación de Hidratos de Carbono con o sin producción de gas a partir de Glucosa, Lactosa, Maltosa y Sacarosa.

La Determinación de especie se hizo según criterio del Manual Bergey (1989), Mc Fadin (1984), Koneman (1983) y Holt (1989).

La caracterización de levaduras se llevó a cabo mediante las pruebas que se mencionaron anteriormente, además de la producción de pseudomicelio, clamidosporas, formación de tubo germinativo y fermentación de los carbohidratos dextrosa, galactosa, inositol, lactosa, maltosa, rafinosa y sacarosa.

Producción de pseudomicelio y clamidosporas: En el interior de una caja Petrí, se colocó sobre un triángulo de vidrio y un portaobjetos y se esterilizaron a 15 lbs de presión durante 15 minutos, después de lo cual se agregó en condiciones asépticas agar harina de maíz, hasta formar una capa homogénea sobre el portaobjetos. Solidificado el agar se sembró por medio de estría, colocando sobre un cubreobjetos previamente estéril, en el mismo momento se depositó un algodón con agua estéril y se incubó durante 24 hrs. a 37 °C.

Formación de tubo germinativo: En tubos de 13 X 80 previamente esterilizados se colocaron 0.5 mL. de suero humano más muestra de cada una de las levaduras a determinar, y se incubaron a 37 °C durante dos o tres hrs., transcurriendo este tiempo se procedió a tomar una muestra con una pipeta Pasteur estéril, la cual se colocó sobre un portaobjetos limpio, y a continuación se depositó sobre la muestra el cubreobjetos para poder observar la formación del tubo germinativo. (Castillo, J. M., 1989)

Para la fermentación de carbohidratos se colocaron 4 mL. de medio base de Wikerman en tubos de 13 X 100 más un mL. de azúcar al 6% (dextrosa, galactosa, inositol, lactosa, maltosa, rafinosa y sacarosa.) y una campana de Durham para detectar la producción de gas por medio del desplazamiento del líquido de la misma, esterilizándose en autoclave a 15 lbs durante 15 minutos ambos substratos. Una vez esterilizado el medio de fermentación con los azúcares, se sembraron las muestras a analizar con una asada pequeña y se incubaron durante 72 hrs. a 37 °C, haciendo lecturas cada 24 hrs. para observar la producción de ácido mediante un indicador (azul de bromotimol) en el medio, que detecta el cambio del pH, dando un vire de color verde o amarillo.

Con los hongos aislados, el procedimiento a seguir fue el siguiente:

Para la determinación del género en el caso de los hongos se realizaron microcultivos.

Después se procedió a observar al microscopio con los objetivos de 10X y 40X, la producción de clamidosporas, blastosporas y pseudomicelio.

A continuación de la determinación de especie y/o género en bacterias, levaduras y hongos, se procedió a realizar la prueba de confirmación de la capacidad hidrolítica o la utilización de aceite como única fuente de carbono en cada una de las cepas aisladas.

Prueba de la capacidad hidrolítica.

Las diferentes cepas obtenidas se cultivaron en tubos de ensaye de 13 X 100, los cuales contenían 20 mL. de caldo rojo fenol, 15% de aceite de cártamo y el 0.15% de tritón X-100, a continuación se incubaron a 37 °C por 48 hrs., posteriormente se tituló la acidez con la técnica antes mencionada, y de esta manera se determinó la capacidad hidrolítica de cada uno de los microorganismos estudiados. (Garza Caballero., 1983)

Resultados químicos:

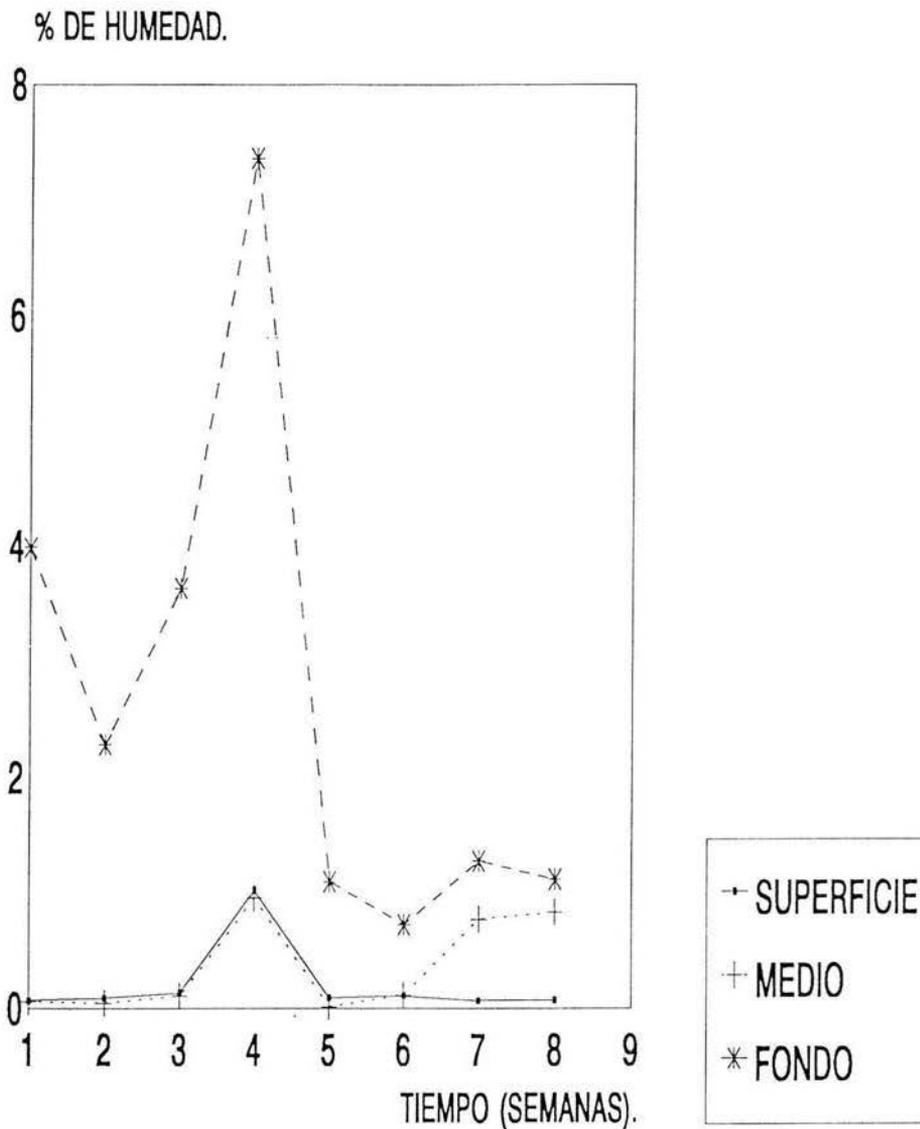
a) Determinación de humedad:

De las determinaciones realizadas durante las diferentes etapas de muestreo se puede apreciar que la zona de mayor concentración de humedad fue el fondo, situación que resulta obvia si se toma en cuenta la diferencia de densidades que hay entre el agua y el aceite, observándose además incremento de humedad en la cuarta etapa de muestreo, ocasionando este aumento la precipitación pluvial que se registró la noche anterior al día de muestreo. Los valores alcanzados en esta etapa son del orden de 1.014, 0.950 y 7.360, para la Sup, Med, y Fon respectivamente tabla 1.

Etapa de muestreo	% Humedad Superficie	% Humedad Medio.	% Humedad Fondo.
1	0.066	0.057	3.990
2	0.088	0.045	2.283
3	0.135	0.107	3.635
4	1.014	0.950	7.360
5	0.091	0.016	1.090
6	0.110	0.113	0.728
7	0.066	0.077	1.268
8	0.072	0.083	1.110

Tabla 1.- Contenido de humedad en las tres zonas de muestreo.

PORCIENTO DE HUMEDAD EN SUPERFICIE, MEDIO Y FONDO.



GRAFICA No. 1.- Representacion grafica del porcentaje de humedad durante los ocho periodos de muestreo, en las diferentes zonas analizadas.

B).- Cuantificación del contenido de ácidos grasos por cromatografía de gases:

Los resultados alcanzados para la concentración de ácidos grasos fueron obtenidos por normalización de área de los diferentes picos registrados en los cromatogramas (Figura No. 7), donde se encontraron los siguientes datos: ..

§ Ac. grasos	Inicial.	Superficie.	Medio.	Fondo.
Mirístico (1)	0.18	0.44	0.75	0.86
Palmitico (2)	9.64	22.28	17.27	20.15
Esteárico (3)	2.90	9.17	6.43	7.60
Araquídico (4)	0.70	1.69	1.61	1.86
Behenico (5)	1.58	1.31	0.79	2.17
Palmitoleico (6)	0.21	5.65	1.53	2.38
Oleico (7)	16.81	34.92	26.58	29.68
Linóleico (8)	66.44	12.88	40.35	28.88
Linolenico (9)	0.59	2.29	0.90	0.78
Heptadecanoico (10)	0.46	4.12	1.52	1.91
Palmitolenico (11)	0.21	4.51	1.64	2.95

Tabla 2.- Porcentaje de ácidos grasos en las diferentes zonas de muestreo.

1000 x 1000
 1000 x 1000
 1000 x 1000
 1000 x 1000

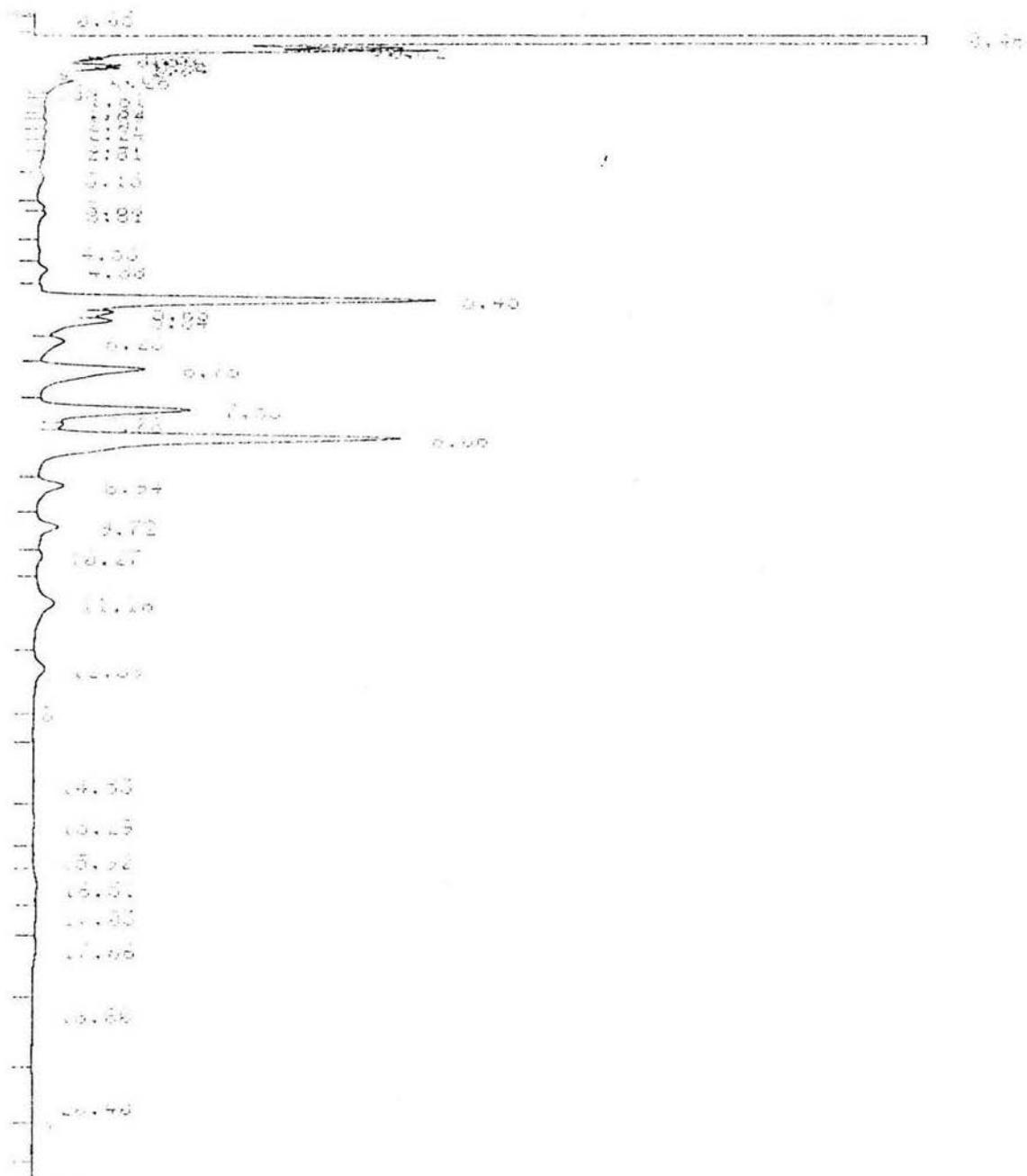
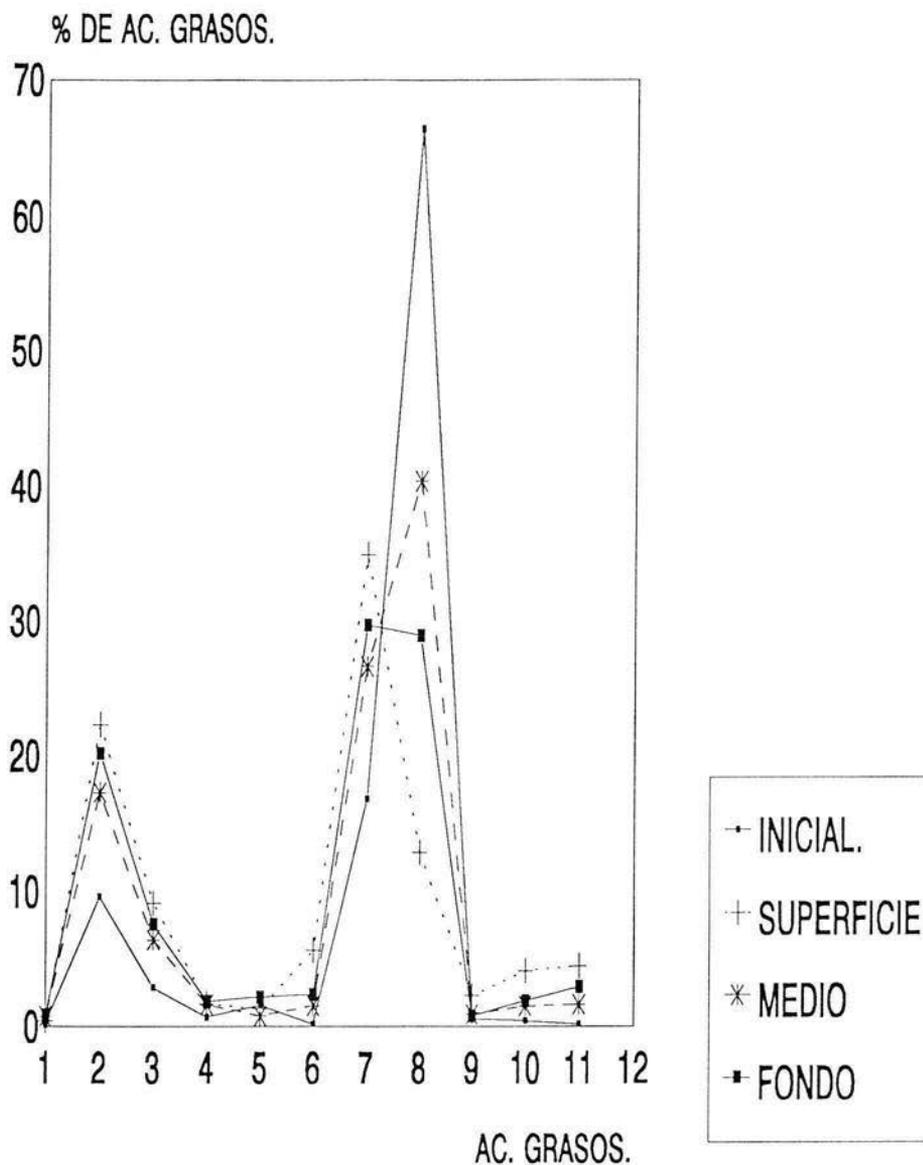


Figura No. 7.- Cromatograma de ácidos grasos, por
Cromatografía de Gases.

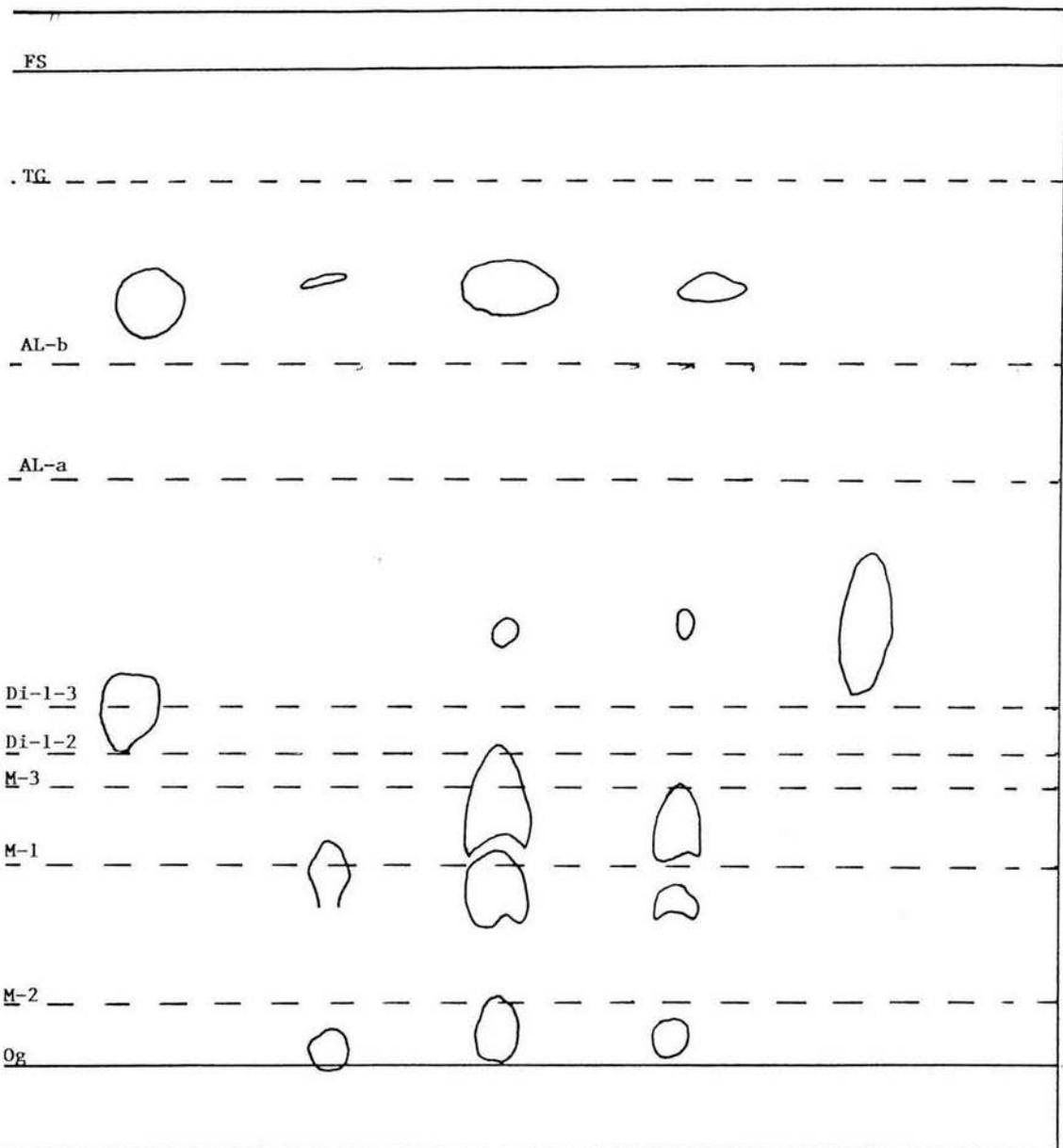
DIFERENCIACION PORCENTUAL DE AC. GRASOS INICIALES Y FINALES PARA SUPERFICIE, MEDIO Y FONDO.



GRAFICA No. 2.- Diferencia porcentual de los acidos grasos iniciales, con respecto a la concentracion final en las tres diferentes zonas de muestreo (Sup, Med, y Fon.).

C).- Determinación de Mono, Di y Triacilgliceridos por cromatografía en capa fina (CCF).

Los resultados expresados en las placas de cromatografía fueron examinados por comparación directa con estándares, además de obtener los Rf promedio para cada uno de los distintos gliceridos (mono, di y triacilglicerido), donde se pudo observar que en las tres zonas de muestreo predominaron los 1 monoglicerido con un 46.9%, siguiendole en concentración el 1,3 diglicerido para las tres puntos de muestreo (Sup, Med y Fon) con 36.2% y por ultimo el 1,2 diacilglicerido, con el 17.4% para las tres zonas de muestreo. Figura 8 Y 9.



FS Frente del solvente

TG Triglicerido

AL-b Acidos grasos libres de polaridad similar con "a"

AL-a Acidos grasos libres de polaridad similar con "b"

Di-1-3 Digliceridos en posición 1-3

Di-1-2 Digliceridos en posición 1-2

M-3 Monoglicerido en posición 3

M-1 Monoglicerido en posición 1

M-2 Monoglicerido en posición 2

Og Origen del solvente

FIGURA NO 8.- Cromatografía en Placa Fina mostrando los Rf promedio de Mono, Di y Triacilgligeridos. Fs, Frente del solvente; Tr, triglicerido; AL-b, Acidos grasos libres de polaridad semejante con "a"; AL-a, Acidos grasos libres de polaridad semejante a "b"; Di-1-3. Digliceridos en posición 1-3; Di-1-2, Digliceridos en posición 1-2; M-3, monogliceridos en posición 3; M-1, monoglicerido en posición 1; M-2, monoglicerido en posición 2; Og, Origen del solvente.

Fs.

Tr

AL-b

AL-a

Di-1-3-

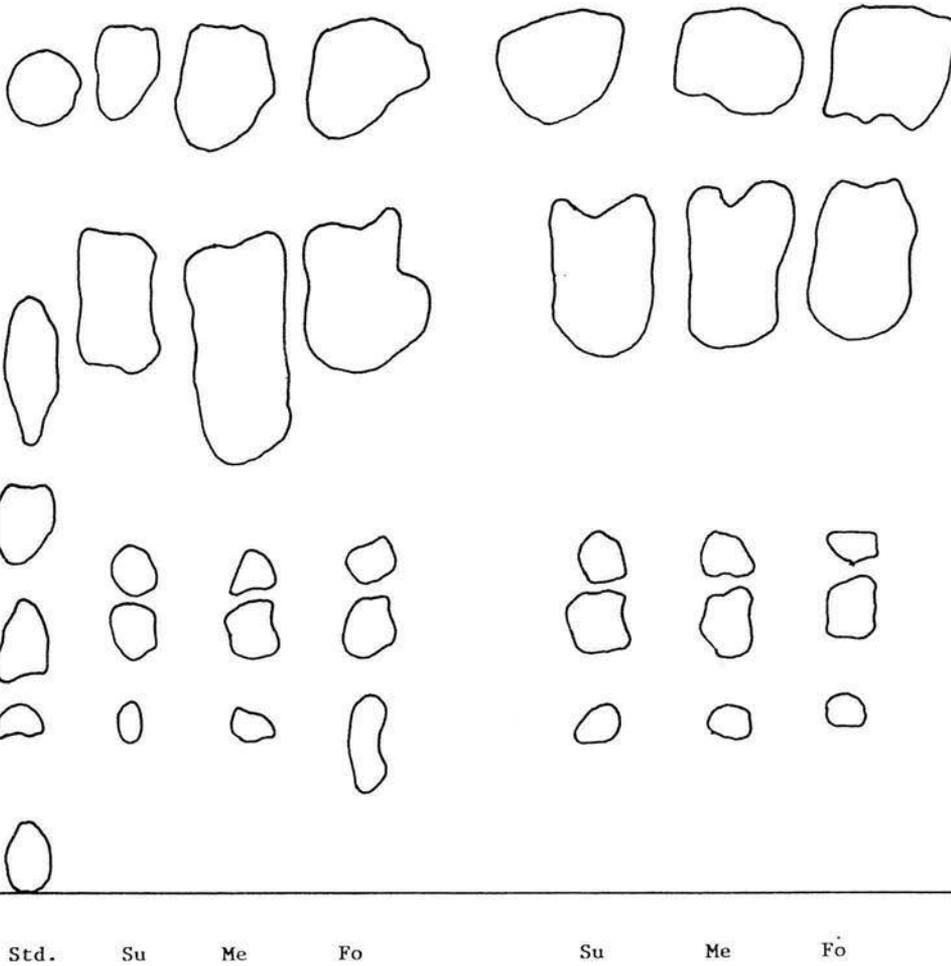
Di-1-2

M-3

M-1

M-2

Og



Std.

Su

Me

Fo

Su

Me

Fo

Pr

Pa

- Fs Frente del solvente
- Tr Triglicerido
- AL-b Acidos grasos libres de polaridad semejante con "a"
- AL-a Acidos grasos libres de polaridad semejante con "b"
- Di-1-3 Digliceridos en posición 1-3
- Di-1-2 Digliceridos en posición 1-2
- M-3 Monoglicerido en posición 3
- M-1 Monoglicerido en posición 1
- M-2 Monoglicerido en posición 1
- Og Origen del solvente

FIGURA NO 9.- Cromatografía en Placa Fina, presentando los Rf de las muestras Principal (Pr) y Paralela (Pa), de las diferentes zonas de muestreo. Fs, Frente del solvente; Tr, Triglicerido; AL-b, Acidos grasos libres de polaridad similar con "a"; Al-a, Acidos grasos libres de polaridad semejante a "b"; Di-1-3, Digliceridos en posición 1-3; Di-1-2, Digliceridos en posición 1-2; M-3, Monoglicerido en carbono 3; M-1, Monoglicerido en carbono 1; M-2, Monoglicerido en carbono 2; Og, Origen del solvente.

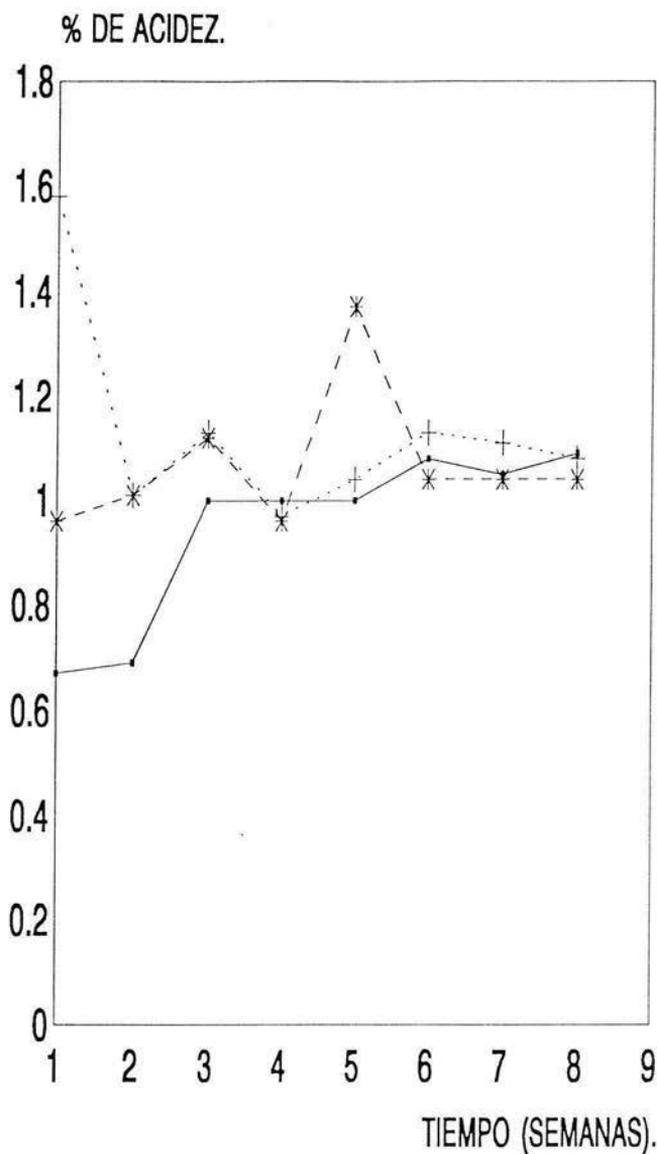
D) Cuantificación de acidez.

La determinación se realizó por el método descrito en material y método. Los cálculos se hicieron en base al peso de las moléculas promedio con el que se obtuvieron los siguientes resultados para los diferentes puntos de muestreo (Sup, Med y Fon) así como para las muestras Principal (Pr) y paralela (Pa).

Sup.	Pr.	Pa.	Med.	Pr.	Pa.	Fon.	Pr.	Pa.
0.67	1.58	0.96	0.92	1.09	0.95	3.90	6.92	3.92
0.69	1.01	1.01	1.01	1.04	0.99	2.49	3.05	2.41
1.00	1.13	1.12	1.01	1.04	1.06	3.22	4.74	3.57
1.00	0.97	0.96	1.01	1.37	1.06	1.46	1.60	1.77
1.00	1.04	1.37	0.96	1.06	1.05	1.65	2.17	1.73
1.08	1.13	1.04	1.02	1.14	1.13	1.58	2.16	1.67
1.05	1.11	1.04	1.04	1.22	1.12	1.73	2.73	2.11
1.09	1.08	1.04	1.20	1.29	1.11	1.85	3.30	2.53

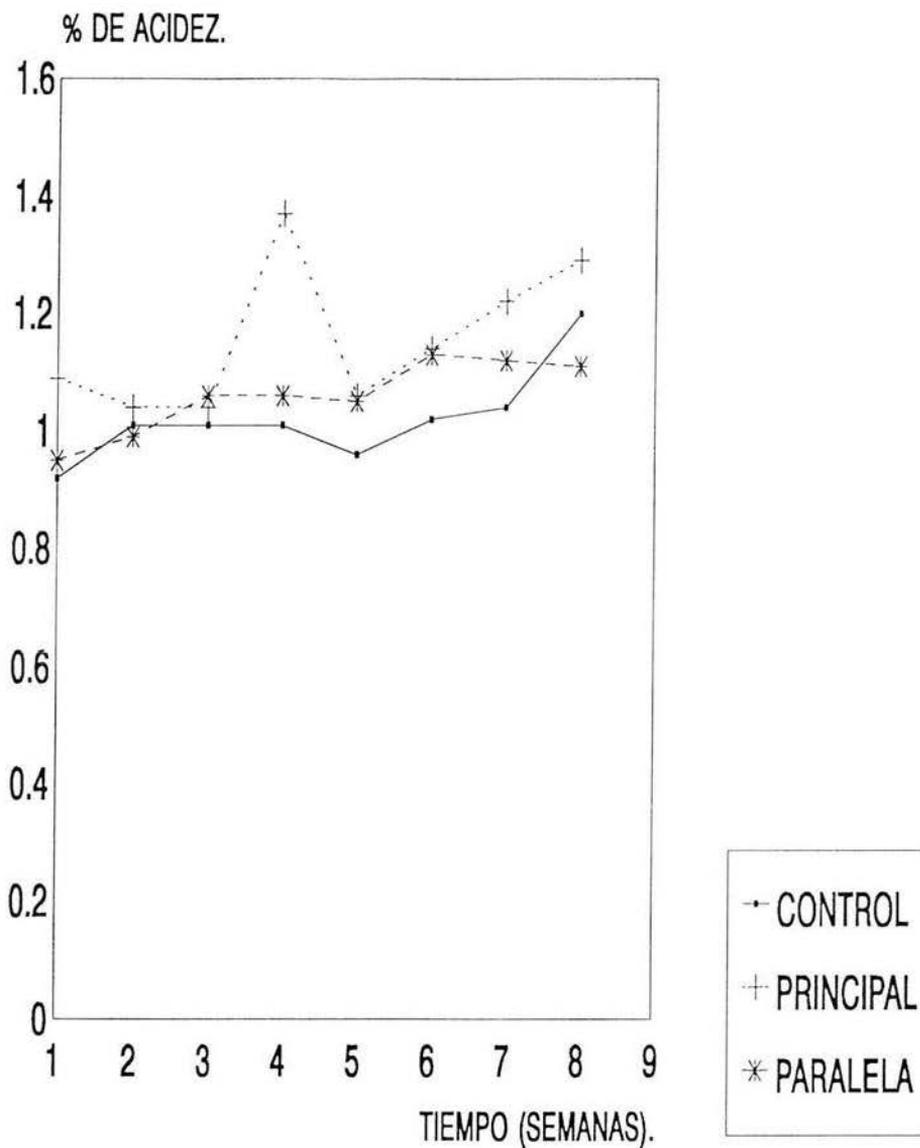
Tabla 3 .- Por ciento de acidez libre para las diferentes zonas de muestreo, de las muestras Principal (Pr) y Paralela (Pa).

PORCIENTO DE ACIDEZ LIBRE EN LA REGION DE LA SUPERFICIE PARA LAS MUESTRAS Pr. y Pa.



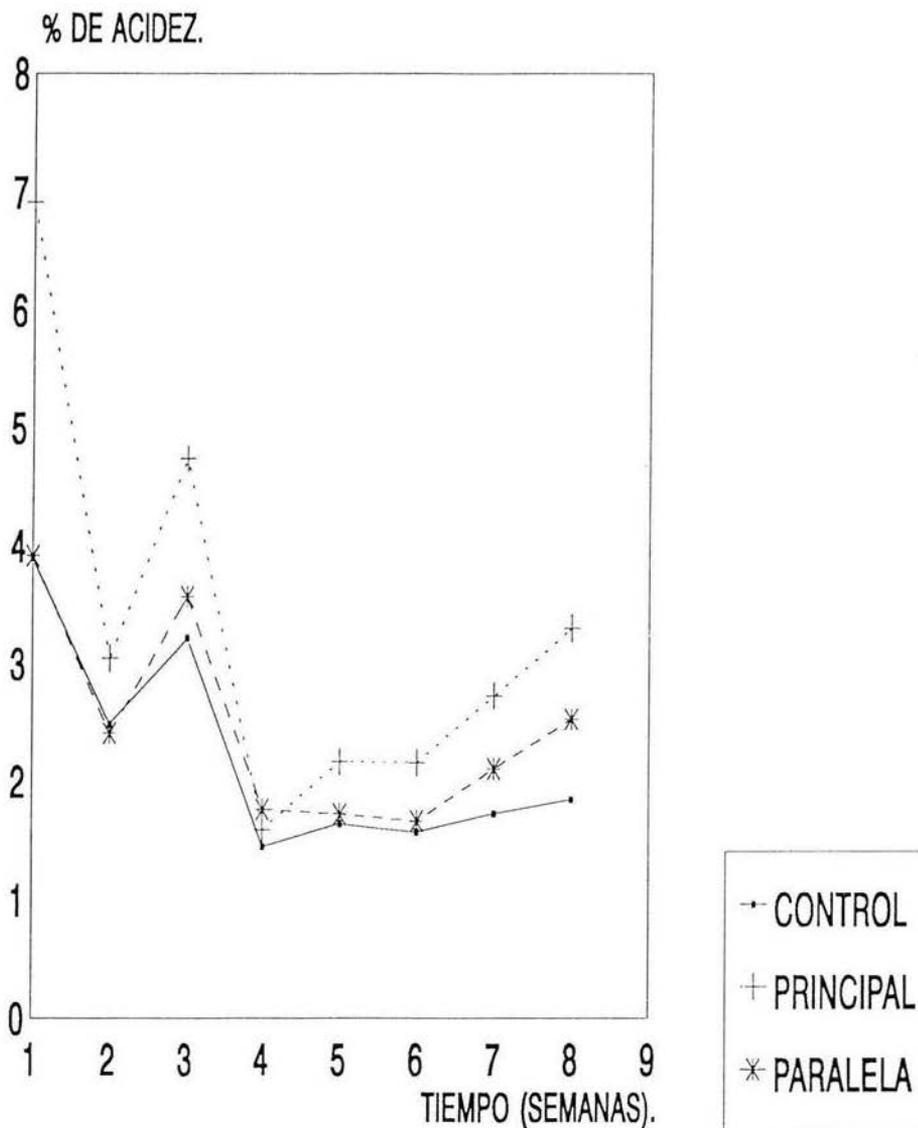
GRAFICA No. 3.A.- Representacion gráfica de la diferencia en el grado de hidrólisis (Pr.), a la química (Pa.), por medio de acidez libre.

PORCIENTO DE ACIDEZ LIBRE EN LA REGION MEDIA PARA LAS MUESTRAS Pr. y Pa.



GRAFICA No. 3.B.- Representa la diferencia en el grado de hidrólisis de origen microbiológica con respecto a la química por medio del porcentaje en acidez libre.

PORCIENTO DE ACIDEZ LIBRE EN LA REGION DEL FONDO PARA LAS MUESTRAS Pr. y Pa.



GRAFICA No. 3 C.- La siguiente gráfica representa las diferencias porcentuales de acidez libre, del control con respecto a las muestras principal (Pa.), y paralela (Pr.).

Resultados microbiológicos:

De la identificación de las cepas que se obtuvieron, pueden, estas dividirse en tres grupos que son: bacterias, levaduras (hongos levaduriformes) y hongos, y que de acuerdo a la siguiente tabulación se indica el estrato en que fueron localizadas. Las pruebas bioquímicas, así como los resultados de las mismas se encuentran en los cuadros siguientes.

ORGANISMO. NOMBRE CIENTIFICO.	ESTRATO.			
	SUP.	MED.	FON.	TOTAL.
<i>Acetobacter liquefaciens.</i>	1	0	0	1
<i>Acetobacter pasteurianus.</i>	4	1	2	7
<i>Acinetobacter calcoaceticus.</i>	1	0	1	2
<i>Bacillus alcalophilus.</i>	1	1	2	4
<i>Bacillus badius.</i>	8	6	6	20
<i>Bacillus brevis.</i>	0	2	5	7
<i>Bacillus circulans.</i>	0	0	6	6
<i>Bacillus globisporus.</i>	0	1	0	1
<i>Bacillus laterosporus.</i>	2	0	1	3
<i>Bacillus lentus.</i>	1	0	0	1
<i>Bacillus megaterium.</i>	1	3	1	5
<i>Enterobacter agglomerans. biogrupo 5</i>	0	0	1	1
<i>Micrococcus agilis.</i>	1	2	0	3
<i>Micrococcus roseus.</i>	2	2	2	6
<i>Obesumbacterium proteus. bio-organismo 2</i>	0	3	0	3
<i>Pseudomonas syringae. var. pathovars.</i>	10	6	1	17
<i>Pseudomonas viridiflava.</i>	5	5	11	21
<i>Yersenia enterocolitica.</i>	8	4	0	12
	45	36	39	120

Con respecto a las bacterias se encontraron un total de 120 organismos los cuales se distribuyen en 8 géneros y 19 especies de la siguiente manera un 37.50% (45 organismos) corresponden a el estrato de la superficie, un 30% (36 organismos) que corresponden a el estrato medio y por último al 32.50% (39 organismos) localizados en el estrato del fondo.

Las pruebas bioquímicas realizadas para su identificación se pueden ver en el cuadro No. 1.

NOMBRE DEL ORGANISMO LIPOFILICO.	GRAM	CIT	NIT	LAC	GLU	H2S	GAS	MOT	IND	ORN	LYS	MAL	SAC	URE	MR.	VP.	KCN	GEL	CAT	OXI	PRUEBA DE LIPASA.	PIG.FLUO (UV)
<i>Acetobacter liquefaciens.</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	0.19	-
<i>Acetobacter pasteurianus.</i>	-	V-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	V-	V-	-	V-	-	V-	V-	V	-	0.28	+AZ/VER.
<i>Acinetobacter calcoaceticus.</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	V	+	V	-	-	-	V	-	-	-	V	-	0.38	V
<i>Bacillus alcalophilus.</i>	+	-	+	V	V	-	-	V	V	+	V	+	+	-	+	-	-	-	V	-	0.00	V VER.
<i>Bacillus badius.</i>	+	-	V-	-	-	-	-	+	-	+	+	V-	V+	-	V-	-	V-	V	+	-	1.50	+AZ/VER/AMA.
<i>Bacillus brevis.</i>	+	-	+	-	-	-	-	V-	-	+	+	-	V	-	-	-	-	V	+	-	0.65	+AZ/VER.
<i>Bacillus circulans.</i>	+	-	V+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	0.00	+AMARILLO.
<i>Bacillus globisporus.</i>	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	V+	-	-	+	-/+POCO	-	0.19	+VERDE.
<i>Bacillus laterosporus.</i>	+	-	+	V	-	-	-	V	V	+	+	-	-	-	V	-	V	V	+	-	0.00	+AZ/VER.
<i>Bacillus lentus.</i>	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+POCO.	0.56	+SOLUBLE.
<i>Bacillus megaterium.</i>	+	+	V+	V-	V-	-	V-	V+	V-	+	+	V	-	-	V-	-	V	+	+	-	1.03	+AZ
<i>Enterobacter agglomerans Biogrupo 5</i>	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	0	0	-	+	-	-	0	-	-	0.00	+VERDE
<i>Micrococcus agilis.</i>	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	V-	-	-	-	-	+	+	-	0.38	+VERDE.
<i>Micrococcus roseus.</i>	+	V-	V+	V-	-	-	-	+	-	V+	+	-	V-	-	-	-	V-	-	+	-	0.93	+VERDE.
<i>Obesumbacterium proteus Biorg. 2</i>	-	-	V+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	0.18	+SOLUBLE.
<i>Pseudomonas syringae pathovars.</i>	-	V	V	-	-	-	-	V+	-	+	+	V-	V-	-	-	-	V-	-	V+	-	1.50	+VERDE.
<i>Pseudomonas viridiflava.</i>	-	V-	V	-	-	-	-	V	-	V+	+	-	V-	-	V-	V-	V	V+	+	-	2.71	+VER/AMA.
<i>Yersenia enterocolitica.</i>	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	V+	-	-	-	+	-	0.18	+AMARILLO.

CUADRO 1.- Pruebas bioquímicas de bacterias.

Para el caso de los organismos levaduriformes, se aislaron 23 organismos observandose que todos corresponden al género conocido como *Candida* donde se agruparon en 12 especies diferentes.

ORGANISMO. NOMBRE CIENTIFICO.	ESTRATO.			
	SUP.	MED.	FON.	TOTAL.
<i>Candida sp.</i> 1.	0	0	3	3
<i>Candida sp.</i> 2.	1	0	0	1
<i>Candida sp.</i> 3.	0	0	2	2
<i>Candida sp.</i> 4.	1	0	0	1
<i>Candida sp.</i> 5.	2	0	0	2
<i>Candida sp.</i> 6.	1	0	0	1
<i>Candida sp.</i> 7.	1	1	0	2
<i>Candida sp.</i> 8.	0	2	0	2
<i>Candida sp.</i> 9.	0	1	1	2
<i>Candida sp.</i> 10.	1	0	1	2
<i>Candida sp.</i> 11.	0	0	3	3
<i>Candida sp.</i> 12.	1	0	1	2
	8	4	11	23

Las pruebas bioquímicas realizadas para su identificación se pueden ver en el cuadro No. 2

NOMBRE DEL ORGANISMO LIPOFILICO	MORF	CIT	NIT	LAC	GLU	H2S	GAS	MOT	IND	ORN	LYS	MAL	SAC	URE	MR.	VP.	KCN	GEL	CAT	OXI	PRUEBA DE LIPASA	PIG. FLUO.(UV)	T.GERM.	CLAM	DEX	GAL	INO	LAC	MAL	RAF	SAC
<i>Candida sp. 1</i>	LEV	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+L	-	0,18	+ VERDE.	-	-	+	+	-	-	+	-	+
<i>Candida sp. 2</i>	LEV	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	0,09	+ VERDE.	-	-	+GAS	-	-	-	-	-	+
<i>Candida sp. 3</i>	LEV	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+P	-	0,84	+ VERDE.	+ POCO	+	+GAS	+	-	-	-	-	+
<i>Candida sp. 4</i>	LEV	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	V+	-	-	-	+L/P	-	0,00	+ VERDE.	-	-	+	-	-	-	-	-	+
<i>Candida sp. 5</i>	LEV	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	V+	-	-	-	+	-	0,00	+ VERDE.	+	+	+GAS	-	-	-	-	-	+
<i>Candida sp. 6</i>	LEV	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	V+	-	-	-	+	-	0,00	+ VERDE.	-	-	+	-	-	-	-	-	+
<i>Candida sp. 7</i>	LEV	V+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+L/P	-	0,00	+ VERDE.	-	-	+GAS	-	-	-	+	-	+GAS
<i>Candida sp. 8</i>	LEV	V+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+P	-	0,18	+ VERDE.	-	-	+	-	-	-	-	-	+
<i>Candida sp. 9</i>	LEV	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	0,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida sp. 10</i>	LEV	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	0,56	+ VERDE.	+	+	+GAS	-	-	-	-	-	+
<i>Candida sp. 11</i>	LEV	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,87	-/+ VERDE.	+	+	+GAS	-	-	-	-	-	+
<i>Candida sp. 12</i>	LEV	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,37	+ VERDE.	+	+	+GAS	+	-	-	-	-	+

Cuadro 2.- Pruebas bioquímicas de hongos levaduriformes.

ORGANISMO. NOMBRE CIENTIFICO.	ESTRATO.			
	SUP.	MED.	FON.	TOTAL.
<i>Aspergillus flavus.</i>	1	2	5	8
<i>Aspergillus fumigatus.</i>	2	3	1	6
<i>Aspergillus niger.</i>	10	2	9	21
<i>Aspergillus terrus.</i>	2	0	3	5
<i>Cladosporium sp.</i>	1	0	0	1
	16	7	18	41

Por último encontramos, 41 cepas de hongos filamentosos diferentes, los cuales corresponden a dos géneros que son: *Aspergillus* y *Cladosporium* distribuidos en cuatro especies y un género al que no se le determino la especie.

NOMBRE DEL ORGANISMO LIPOFILICO.	PRUEBA DE LIPASA.
<i>Aspergillus flavus.</i>	0,00
<i>Aspergillus fumigatus.</i>	0,00
<i>Aspergillus niger.</i>	57,10
<i>Aspergillus terrus.</i>	12,70
<i>Cladosporium sp.</i>	0,60

Cuadro 3.- Prueba de actividad lipolitica en Hongos filamentosos.

A continuacion se separaron los microorganismos por su incidencia en cada uno de los estratos.

ORGANISMOS DE MAYOR INCIDENCIA EN EL ESTRATO DE SUPERFICIE.		
ORGANISMO. (NOMBRE CIENTIFICO.)	INCIDENCIA	PORCIENTO
Bacterias.		
<i>Acetobacter liquefaciens.</i>	1	100.0
<i>Acetobacter pasteurianus.</i>	4	66.7
<i>Bacillus badius.</i>	8	40.0
<i>Bacillus laterosporus.</i>	2	66.7
<i>Bacillus lentus.</i>	1	100.0
<i>Pseudomonas syringae.</i>	10	58.2
<i>Yersenia enterocolitica.</i>	8	66.6
Hongos levaduriformes.		
<i>Candida sp. 2</i>	1	100.0
<i>Candida sp. 4</i>	1	100.0
<i>Candida sp. 5</i>	2	100.0
<i>Candida sp. 6</i>	1	100.0
Hongos filamentosos.		
<i>Aspergillus niger.</i>	10	47.6
<i>Cladosporium sp.</i>	1	100.0

Cuadro No. 4.- Los organismos que por sus características intrínsecas se desarrollan mas selectivamente en la superficie son: *Acetobacter liquefaciens*, *A. pasteurianus*, *bacillus laterosporus*, *B. lentus*, *Pseudomonas syringae*, *Yersenia enterocolitica*, *Candida sp. 2, 4, 5, 6*, *Cladosporium sp.*, en el caso particular de *Bacillus badius* y *Aspergillus niger*, son organismos que se localizan indistintamente en las tres zonas de muestreo.

ORGANISMOS DE MAYOR INCIDENCIA EN EL ESTRATO MEDIO.		
ORGANISMO. (NOMBRE CIENTIFICO.)	INCIDENCIA	PORCIENTO
Bacterias.		
<i>Bacillus globisporus.</i>	1	100.0
<i>Bacillus megaterium.</i>	3	60.0
<i>Micrococcus agilis.</i>	2	66.6
<i>Obesobacterium proteus. bio-organismo 2</i>	3	100.0
Hongos levaduriformes.		
<i>Candida sp. 8</i>	2	100.0
Hongos filamentosos.		
<i>Aspergillus fumigatus.</i>	3	50.0

Cuadro No. 5.- En el presente cuadro se enumeran los microorganismos que por sus requerimientos nutricionales y su necesidad de oxígeno, agua y pH se desarrollan preferentemente en el nivel medio a excepción de *Aspergillus fumigatus*, donde sus requerimientos nutricionales y medioambientales no se ven afectados, razón por la que se le localiza indistintamente en las 3 zonas de muestreo.

ORGANISMOS DE MAYOR INCIDENCIA EN EL ESTRATO DEL FONDO.		
ORGANISMO. (NOMBRE CIENTIFICO.)	INCIDENCIA	PORCIENTO
Bacterias.		
<i>Bacillus alcalophilus.</i>	2	50.0
<i>Bacillus brevis.</i>	5	71.4
<i>Bacillus circulans.</i>	6	100.0
<i>Enterobacter agglomerans. biogrupo 5</i>	1	100.0
<i>Pseudomonas viridiflava.</i>	11	52.4
Hongos levaduriformes.		
<i>Candida sp. 1</i>	3	100.0
<i>Candida sp. 3</i>	2	100.0
<i>Candida sp. 11</i>	3	100.0
Hongos filamentosos.		
<i>Aspergillus flavus.</i>	5	62.5
<i>Aspergillus terrus.</i>	3	60.0

Cuadro No. 6.- En esta zona de muestreo se observan factores ambientales más selectivos para el desarrollo microbiano, encontrándose por ello los microorganismos que poseen una mayor capacidad lipofílica además de ser los que presentan un alto grado de adaptabilidad.

Los organismos que en esta zona se localizan son:

B. brevis, *B. circulans*, *E. agglomerans*, *P. viridiflava*, *Candida sp. 1*, *3* y *11*, *A. flavus*, *A. terrus*. En el caso particular de *B. alcalophilus*. se le localiza indistintamente en las tres zonas de muestreo.

Discución:

Las grasas y aceites son propensas a alteraciones de origen químico y microbiano.

Dentro de las alteraciones que sufren las grasas se tienen, la hidrólisis causada por lipasas presentes originalmente en el aceite y las procedentes de microorganismos contaminantes externos o de origen. La presencia o ausencia de microorganismos en el aceite se ve influenciada por factores tales como humedad, pH, tensión de oxígeno y sustancias químico-biológicas que pueden funcionar como nutrimentos o bacteriostáticos (Trager y col.1992, Sokoloff y col.1959). Estas sustancias o contaminantes incluyen gomas, fosfolípidos, polvos, fragmentos de semillas, harina y material proteínico (Horvat, 1939). Dichas sustancias al combinarse optimamente con factores tales como humedad, oxígeno disuelto, pH y temperatura promueven el crecimiento microbiano así como la actividad enzimática de los mismos, aunada está a las enzimas lipolíticas provenientes de fragmentos de semillas y tejido celular, es de hacer notar que el aceite extraído por solventes es menos propenso a dicho deterioro.

Los resultados que a continuación se discuten y se analizan, se circunscriben a la evaluación de los parámetros fisicoquímicos presentes en las tres diferentes zonas de muestreo (Sup, Med y Fon), del tanque de almacenamiento estudiado. Además de la caracterización de los microorganismos aislados, así como su capacidad hidrolítica.

Al observar los cuadros de distribución se puede advertir que existe una mayor incidencia de hongos filamentosos y bacterias en la superficie, donde encontramos valores del 50% para ambos grupos, no así en el fondo donde localizamos con mayor frecuencia los hongos del tipo levaduriforme, registrándose valores del orden del 53%.

Los porcentos antes registrados se calcularon en base al mayor grado de incidencia.

En cuanto a los microorganismos aislados en la superficie, los que mayor capacidad lipolítica presentaron fueron los siguientes: *Bacillus badius*, *Pseudomonas syringae*, *Candida sp.* No.2, *Aspergillus terrus* y *Aspergillus niger*, con valores de acidez libre porcentual del orden de 1.50, 1.50, 0.09, 12.7 y 57.10 respectivamente.

Para el caso de los organismos encontrados en la parte media del tanque tenemos a *Bacillus megaterium* con una acidez de 1.03% y *Candida sp.* No. 8 con 0.18%

de acidez libre, ambas como organismos de mayor capacidad lipolítica en esta zona.

Las especies aisladas en el fondo del tanque fueron: *Pséudomonas viridiflava*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terrus*, *Candida sp.* No.3 y 11, con los siguientes porcentajes de acidez libre, 2.71, 57.10, 12.7, 0.84 y 1.87 respectivamente, valores que se asemejan a los reportados por Koritala (1987).

Después de analizar la distribución de los microorganismos se encontró que además de la densidad intrínseca de cada grupo, así como su tamaño existen otros factores que intervienen en dicho comportamiento. Uno de ellos es la humedad, si se considera que los organismos levaduriformes poseen una gran actividad lipolítica (Senez, 1976), y por ello requieren de una mayor concentración de humedad, por otro lado estos organismos dentro de su desarrollo no producen micelio, lo cual facilita una mayor precipitación al encontrarse inmersos en las proximidades de las gotas de agua, mientras que en el caso de los hongos filamentosos, aunque estos requieren igualmente de la presencia de humedad (Horvath, 1939), su producción de micelio les proporciona un soporte que junto con la tensión superficial existente en la interface aceite-agua les retrasa el hundimiento.

En el caso de las bacterias es importante considerar su tamaño y forma de agragación y agrupación, pudiendo ser estos algunos de los factores que influyen en su distribución dentro de las tres zonas de muestreo del tanque de almacenamiento.

Por lo anterior podemos inferir que la humedad juega un papel de vital importancia en el desarrollo microbiano, como lo podemos corroborar con el estudio realizado por Horvath (1939), quien menciona que las esporas de hongos filamentosos, que desdoblan grasas germinan solamente con un contenido de humedad superior al 0.2% y crecen bien a niveles de humedad superior al 2%.

t300R Dentro de nuestros resultados observamos que en el fondo encontramos valores mínimos de 0.728% y máximos de hasta 7.36%, por consiguiente en esta última encontramos altos índices de acidez libre, con títulos de hasta un 3%, sin tomar en cuenta la acidez de origen químico.

Antes de hacer el análisis de los resultados obtenidos de acidez libre, es conveniente conocer la distribución y contenido total de ácidos grasos en las zonas de muestreo.

Al realizar dicho estudio encontramos que en la zona de Superficie, se conserva una relación de ácidos grasos muy cercana a la reportada por Castanedo (1989),

en semillas de cártamo de la variedad I. Si se toman como controles los ácidos grasos más abundantes: Oleico y Linoleico, donde inicialmente tenemos una relación de 1:4, para la zona media contamos con una relación de 2:3, mientras que en la superficie se tiene una relación de 1:3 y en el fondo de 1:1, se puede apreciar que en la superficie la relación de ácidos grasos se acerca más a la inicial, no así en el fondo donde dicha relación decrece considerablemente. Por otro lado podemos observar que el contenido promedio de ácidos grasos saturados se ve incrementado con un 109.73% en promedio, a diferencia de los insaturados que tienen un decremento del 17.99% en promedio.

Lo anterior se explica si se toma en cuenta que los organismos presentan una asimilación selectiva de los ácidos grasos, por ejemplo en el trabajo realizado por Koritala (1987), se menciona que *Aspergillus flavus* cataboliza selectivamente al ácido linoleico, citando también que *Amylomyces sp.* transésterifica al mismo ácido.

El trabajo realizado por El-Sadany (1986) nos muestra que en semillas de algodón infectadas por *Aspergillus flavus* la concentración de ácidos grasos saturados es cuatro veces menor que en las semillas sanas.

Dentro de la misma línea de investigación tenemos el estudio realizado por Conte y col. (1989) donde al analizar semillas de girasol infectadas por *Sclerotium baticola* encontraron decrementos en el ácido oleico del 12% e incrementos en ácido linoleico de hasta 5%.

Von Johnson y col. (1992) por su parte, al infectar el coco con *Rhodotorula glutinis II p-30*, antes de extraerle el aceite observaron que hay un decremento en los ácidos laurico y mirístico, mientras que los ácidos oleico y linoleico se ven incrementados.

Por lo anterior se puede apreciar que la actividad lipolítica de los microorganismos juega un papel preponderante en el contenido inicial y final de los ácidos grasos.

La actividad lipolítica de los microorganismos sobre el aceite de cártamo, se cuantificó indirectamente al titular la acidez libre del aceite, al principio y al final de cada periodo, donde cada uno consta de siete días, siendo un total de ocho periodos.

De los resultados encontrados se observó que los microorganismos participan con 0.06% de acidez en la Superficie, 0.1% en la parte Media y 0.8% en el Fondo, representando una acidez promedio de 0.32% del total general.

Al realizar el análisis comparativo de los resultados de acidez por medio del estadístico "t" de student, se advirtió que es significativa la diferencia de acidez de origen biológica de la química, en la parte Media y Fondo de las zonas de muestreo donde se encontraron valores del 16.34 y 2.83 con 7 grados de libertad, lo cual corresponde a una probabilidad inferior al 0.02 y 0.001, no así para la zona de muestreo de Superficie donde la probabilidad es superior al 0.05 ,por lo que en este caso no resulta una diferencia significativa.

Es importante señalar que la actividad lipolítica además de los cambios que ocasiona en el triacilglicerido, también proporciona un decremento de pH en la muestra de aceite siendo este último un medio natural de selección y/o de distribución de la población microbiana dentro del tanque estudiado.

Para explicar la relación del pH con los otros parámetros encontramos el trabajo realizado por García y Col. (1992) quienes mencionan que *Micrococcus sp.* en plena actividad lipolítica infiere cambios en el pH, de 5.6 a 5.4 en un periodo de 30 días, más sin embargo si se utiliza un cultivo mixto de *Micrococcus sp.* *Lactobacillus sp.* se aprecia un decremento en el pH de 5.6 a 4.8 dentro de los tres primeros días.

Por otra parte Bühler y col.(1987) realizaron un trabajo muy interesante al combinar parametros tales como pH, temperatura y área de contacto señalando que a un pH de 5.6, con una temperatura de 30 °C y un área de contacto en la interface de 12 cm², los organismos *Candida cylindarcea* y *Pseudomonas sp.*, en una hora alcanzan valores de hidrólisis de hasta 89% de forma independiente.

Mientras que Warner y col.(1984) reportan que *Aspergillus niger* presenta una actividad lipólitica de hasta el 90% en medios de cultivo con un pH de 5.4 .

Dentro de los trabajos hechos sobre la acción del pH en poblaciones microbianas encontramos el realizado por Andreeva y col. (1985) donde cuantifican el efecto del pH sobre una población de *Candida utilis*, por examen espectrofotométrico reportan que a un pH de 2.2 la densidad optica (d.o.) para la población es de 0.3, mientras que a un pH de 4.5 alcanza rangos de 14 d.o.

Otra de las causas que intervienen en la distribución poblacional microbiana son los ácidos grasos libres, por ejemplo Sokoloff y col. (1959) reportan que con una concentración minima de 1.28% de ácido oleico e igual concentración para el ácido linoleico, como ácidos grasos libres, inhiben el desarrollo de *Candida albicans*.

Hugo (1971), informa que un alto contenido de ácido oleico, palmítico y esteárico pueden favorecer la esporulación de *Clostridium botulinum*.

Una limitante más que interviene en la presencia o en su defecto ausencia de microorganismos es la disponibilidad de O₂, (Trager y col.1992) ya que en algunos casos, se encontrarán microorganismos anaerobios facultativos. La disponibilidad de O₂ se ve afectada por la tención superficial y contenido de oxígeno disuelto en el agua, explicándose así la reducida población microbiana en la parte media del tanque. El estudio realizado por Bati y col. (1984) podría explicar, el alto número de organismos levaduriformes en el fondo, del tanque de almacenamiento estudiado, ya que en su trabajo reportan que *Candida lipolytica* requiere de bajas concentraciones de oxígeno.

Para poder designar los posibles mecanismos de degradación del triacilglicerido por efecto enzimático microbiano, es necesario analizar los resultados obtenidos por cromatografía en capa fina.

En primer termino, tenemos que en la superficie predominan los 1,3 monoglicéridos con un 37.1% respecto a las dos zonas restantes, en la parte media del tanque, sobresalen en concentración los 1,2 diglicéridos con un 38% y los triacilglicéridos con un 34.6% en relación al fondo y superficie, mientras

que en el fondo resaltan los ácidos grasos con un 35.3% y los 1,3 diglicéridos con un 35.7% en proporción a la superficie y zona media. La alta concentración de ácidos grasos libres en el fondo se explica si tomamos en cuenta que el mayor índice de acidez se localiza en esta zona y por consiguiente la más alta actividad lipolítica, sumándose a lo anterior que los ácidos grasos son más miscibles al agua que una grasa neutra (Bhagavan, 1978), mientras que en la parte media por ser la zona de mayor estabilidad físicoquímica hablando, localizamos el más alto porcentaje de acilglicéridos.

Por otro lado para poder explicar las diferencias entre mono y diglicéridos es menester estudiar otra capacidad que poseen las lipasas, además de ser lipolíticas, refiriéndonos en particular a su habilidad de esterificación. Por ejemplo Schmid (1987), menciona que a 25 °C *Aspergillus niger* y *Pséudomonas fluorescens* hidrolizan el triglicérido en la posición 1,3 mientras que *Candida sp.* es inespecífica.

Warner y col. (1984), por su parte reportan que *Candida rugosa* esterifica en una hora a 25 °C el ácido oleico, en 1,2 monoglicérido, 1,2 diglicérido y triacilglicérido formando de esta manera trioleína.

Jack R. (1965) al realizar estudios concernientes a la formación de fosfogliceridos encuentra que *Lipomyces lipofarus*, transésterifica digliceridos con ácidos grasos del tipo 18:1 y 18:2 en concentraciones de 76.7 y 2.8 respectivamente los cuales son precursores de la molécula fosfoglicerídica, quedando demostrada su alta afinidad.

Mazuelos V. (1981) trabajando con lipasa pancreática descubre que en forma natural se esterifican en los carbonos 1,3 del triglicerido ácidos grasos saturados y en el carbono 2 del triglicerido ácidos grasos insaturados, dando valores de esterificación para el aceite de cártamo del 82.97% con el ácido linóleico, en el carbono 2 y para el oleico de 16.38% en la misma posición.

Niedelman y col.(1984) al trabajar con *Rhizopus arbizus* determinan que esté, esterifica oleico en el carbono 1 del monoglicerido, en las posiciones 1,2 / 1,3 del diglicerido, para posteriormente formar trigliceridos y de igual manera para *Rhizopus delemar*, mientras que *Geotrichum candidum* interesterifica principalmente linoleico.

Por hidrólisis parcial Park y col. (1988) al mezclar lipasas de *Rhizopus delemar* y *Rhizopus niveus*, encuentran 1,2,3 monogliceridos y 1,2 digliceridos.

En resumen podemos mencionar que aunque por bibliografía y por resultados, en nuestro sistema, encontramos lipasas del tipo no específicas y lipasas 1,3 específicas, también es cierto que la acción de las lipasas no se restringe tan solo a una actividad lipolítica sino que también existe una interesterificación al encontrarse en el medio ácidos grasos libres, sin olvidar que estos pueden ser oxidados para formar peróxidos e hidroperóxidos.

Conclusión:

En base a los resultados presentados podemos sugerir que sí es importante un control microbiológico, así como la eliminación de residuos orgánicos, ya que ambos contienen lipasas.

Por ejemplo si tomamos en cuenta el volumen de aceite crudo de un solo tanque con una capacidad de 790,953 lts. el 0.34% (como triglicerido) representa una pérdida de 384.18 lt. diarios por tanque.

En el caso de los ácidos grasos libres, estos no merman la calidad del aceite, ya que son eliminados en el proceso de neutralización.

Por otra parte, dada la versatilidad de las enzimas podemos sugerir la utilización de ellas en procesos tales como: Esterificación, epoxidación, hidrólisis total o parcial de las grasas, interesterificación y modificación de grasas entre otras.

Como ejemplo podemos mencionar que al realizar la hidrólisis de una grasa neutra via enzimática hay un decremento energético, de costos, residuos, subproductos y color, si se piensa en la obtención de glicerina.

Al interésterificar las grasas se pueden obtener mono, di y triacilglicéridos con un solo tipo de ácidos grasos. Compuestos que son altamente utilizados en la industria de cosméticos, tensoactivos y alimentaria.

El proceso de modificación y emulsificación de grasas puede ser utilizado para producir derivados lácteos, modificar su textura e impartir sabores diferentes a dichos derivados.

Bibliografía:

1.- Andreeva E. A., Blinova O. P., Rabotnova I. L., 1985, Isolation and preservation of acid-resistant yeast strains. *Microbiologica*. 54: (6): 1011-1014.

2.- Bati, N., Hammond, E., Glatz, B., 1984, Biomodification of fats and oils: Trails with *Candida lipolitica*; *J. Amer Oil Chem. Soc.*, 61: (11): 1743-1746.

3.-Bhagavan N. V., 1978, *Bioquímica*, Ed. Interamericana, México, 583-587.

4.- Bhuler, M., Wandrey, Ch., 1987, Enzymatic hydrolysis of fats. *Henkel Referate 23/INT.*, 29-35.

5.- Boyce, C., 1984, Developing a new industrial enzyme application a strategy. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 61: (11); 1750-1753.

6.- Castanedo, Saint-Martin, R., 1989, Aplicaciones de la cromatografía en la Caracterización de aceites y grasas. V Simposium sobre optimización de procesos de refinación en aceites y grasas, 14-18.

7.- Castillo Romero, J. M., 1989, Incidencia de diferentes especies de *Candida* en infecciones faríngeas y vaginales con aplicación de una microtécnica en el laboratorio útil en el diagnóstico de candidosis. Tesis profesional, E.N.E.P.I. de U.N.A.M. México, 22-29.

8.- Conte L., Zazzerini A., Tosi L., 1989, Changes in composition of *Sunflower* oil extracted from achenes of *Sclerotium baticola* infected plants. J. Agric. Food Chem., 37: (1): 36-38.

9.- Coleman, M. 1961, Further studies on the pancreatic hydrolysis of some natural fats, J. Amer. Oil Chem. 38: (12); 685-688.

10.- Coleman, M. 1965, The pancreatic hydrolysis of natural fats. J. Amer. Oil Chem. 42: (9); 751-754.

11.- Dart, R. K., and Stretton, R. J., 1980, Microbiological Aspects of Pollution Control, Ed. Elsevier Scientific Publishing Co., 2a ed., N. Y, U.S.A., 547.

12.- El-Saddany, S. S. 1986. Chemical and physical properties of oil extracted from cotton seed by *Aspergillus flavus*. instituto de grasas y aceites 37: (3); 129-133.

13.- Fucikubsky, M., 1980. IX Conferencia Internacional de Girasol, Instituto Nacional de Investigaciones agrarias. Tomo 1. Torremolinos, Malaga España. 387-388.

14.- Garcia Ma. L., Selgas D. Fernandez M., Ordoñez, 1992, Microorganisms and lipolysis in the rapening of dry fermentated sausages. Inter. J. of Food Sc. and Tec., 27: 675-682.

15.- Garza Caballero, M., 1983, Manual de Laboratorio de Microbiología Sanitaria. Ed. I.P.N., México, D. F., 206, 254.

16.- Gomez Herrera, Carlos Dr., Manual para el Curso de Grasas y aceites de los años 1981-1982., Instituto de Sevilla, España.

17.- Holt, Jhon G., y col. 1989, The Shorter Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Ed. Williams and Wilkins Co., 8a ed., Baltimore, U.S.A. 77-97, 166-306.

18.- Horvat. 1939, Almacenamiento, manejo y estabilización, en: Erickson, D., List, G. 1990, Manual de procesamiento y utilización de aceite de soja. Asoc. Amer. de Soja., Madrid, España. 245-247, 310-313.

19.- Hugo W. B. 1971, Inhibition and destruction of the microbial cell. Ed. Academic Press, U.S.A., 318, 320, 322, 478, 707.

20.- Jack R., 1965, Relation of triglycerides to phosphoglycerides in fungi. J. Amer. Oil Chem. Soc. 42: (12); 1051-1053.

21.- I.N.E.G.I., 1993, Anuario Estadístico de los Estados Unidos Mexicanos.; 45-50.

-
-
- 22.- Ketan, M., 1984, Production of protein and fatty acids in the anaerobic fermentation of molasses by *E.ruminatium*. J. Amer. Oil Chem. Soc. 61: (11); 1728-1734.
- 23.- Kitara A., 1985, Enzyme modified lipid food ingredients. Process Biochemistry; April; 35-45.
- 24.- Koksho, Machida, H., Iwasaki, S. 1982, Studies on Alkaline lipase, isolation and identification of lipase producing microorganisms. Agr. Biol. Chem. 46: (5); 1159-1164.
- 25.- Koneman, E. W. Allen S. D., Dowel V. R., Sommers H. M., 1983. Diagnostico Microbiológico. Ed. Medica Panamericana. Argentina. 34-123, 218, 429-470.
- 26.- Koritala, S., Hesseltine C. W., Pryde E. H., Mounts T. L., 1987, Biochemical Modification of Fats by Microorganisms: A Preliminary Survey. J. Amer. Oil Chem. Soc.: 64: (4); 509-513.
- 27.- Lehninger, A., 1989, Bioquímica. Ed. Omega., 2a. ed., Barcelona, España. 223, 286-290.
- 28.- Lie E., Molin G. 1992, Esterification of polyunsaturated fatty acids with lipase from different sources. Inter. J. Food Sc. and Tec. 27; 73-76.

29.- Luddy, F., Barford, R., Herb, S., Magidman, P., Riemenschneider, R., 1964, Pancreatic lipase hydrolysis of triglycerides by a semimicrotechnique. J. Amer. Oil Chem. Soc. 41: (10); 693-696.

30.- Mac Fadin, J. F., 1984, Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Ed. Medica Panamericana. 284.

31.- Marcuse, R. 1962. The effect of some amino acids on the oxidation of linolic acid and its methyl ester. J. Amer. Oil Chem. Soc. 39: (2); 97-103.

32.- Mazuelos, V., 1981, La Determinación de aceites esterificados de cártamo por medio de lipasa pancreática., Instituto de grasas y aceites 32: (3); 143-146.

33.- Mazuelos, V. 1983, Aceites de algodón de producción nacional. Acidos grasos de la posición β de los glicéridos. Instituto de Grasas y Aceites 34: (3); 197-198.

34.- Mc Murray, W. C., 1975, Essentials of Human Metabolism. Ed. Harper and Row, Pu., 2a de., N. Y, U.S.A., 158-160.

35.- Niedelman, S.L., Geigert, J., 1984, Biotechnology and Oleochemical: Changing Patterns. J. Amer. Oil Chem. Soc. 61: (2); 290-297.

36.- NOVO-Ind. 1985-07-22, Enzimes R & D. Dinamarca, Copenage. pe 1 B O A-05924a.

37.- Official and Tentative Methods of The American Oil Chemists_Society. Section Da 4a-48 (1960).

38.- Official and Tentative Methods of The American Oil Chemists_Society. Da 2b-42 (1960).

39.- Okamura, S., Iwai, M., Tsujisaka, Y., 1976, Positional specificities of four kinds of microbial lipases. Agro. Biol. Chem. 40: (4); 655-660.

40.- Park, Y., Patore, G., Mitsui de Almeida, M., 1988, Hydrolysis of soybean oil by a combined lipase system. J. Amer. Oil Chem. Soc. 65: (2); 252-254.

41.- Pososrske, L., 1984, Industrial scale application of enzymes to the fats and oil industry. J. Amer. Oil Chem. Soc. 61: (11); 1758-1760.

42.- Privett, O., Blank, M., Lunderberg, W. 1961, Determination of Mono-, Di-, and Triglycerides by molecular destillation and thin layer chromatography. J. Amer. Oil Chem. Soc. 38: (1); 312-316.

43.- Rattray, J. B. 1984, Biotechnology and the fats and oils industry - An Overview. J. Amer. Oil Chem. Soc. 61: (11); 1701-1712.

-
-
- 44.- Ruiz, G. 1986, Toxicología de aceites y grasas comestibles II. Instituto de grasas y aceites 37: (2); 97-102.
- 45.- Schmidt, K., 1976, Fisiología Animal. Ed. Omega., 3a. ed., Barcelona, España. 230-231.
- 46.- Schmid, R., 1987, Biotechnology, application to oleochemistry. J. Amer. Oil Chem. Soc. 64: (4); 563-570.
- 47.- Secretaria de Salubridad y Asistencia. 1977,. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Ed. Impresores Mexicanos., 8a ed., México, D.F. 191.
- 48.- Seino, H., Uchibori, T., Nishitani, T., Inamasu S. 1984, Enzymatic synthesis of carbohydrate esters of fatty acid, esterification of sucrose, glucose, fructose and sorbitol. J. Amer. Oil Chem.Soc. (11); 1761-1765.
- 49.- Senez, J., 1976, Microbiología General. Ed. Alhambra., 3a. ed., Madrid, España. 162-163, 282-286.
- 50.- Sherwin, E. 1978, Oxidation and antioxidants in fat and oil processing. J. Amer. Oil Chem. Soc. 55: (11); 809-814.
- 51.- Sidney Bernard. 1977. Estructura y función de las enzimas. Ed. Blume., 3a. ed., Madrid, España.75-77.

52.- Sokoloff, B., Toyomizu, M., Trauner, W. 1959, The fungicidal activity of the unsaturated fatty acids and quaternary salts prepared from fish oils. J. Amer. Oil Chem. Soc. 36: (1); 234-237.

53.- Tamayo Legorreta, E. 1989, Caracterización microbiológica de cepas bacterianas capaces de producir enzimas lipasas para la elaboración de detergentes. Tesis profesional. E.N.E.P.I., de U.N.A.M. México, 10, 15, 17.

54.- Trager M., Qazi G., Buse R., Onken U., 1992, Influence of constant and Oscilating Disolved Oxygen concentration on *Aspergillus niger*. J. of Fermentation and Bioeng. 74: (5); 282-287

55.- Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAQ). Determination of Mono-, Di- and Triglycerides by column chromatography. Method II. C. 7. Fifth edition. 109-113.

56.- Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAQ). Determination of fatty acids in the 2-position in the triglycerides of oils and fats. Method II. D. 27. Fifth edition. 84-88.

57.- Von Johnson, Singh M., Yadau N. K., 1992, Transformation of vegetable oils by an oleaginus, yeast: *Rhodotorula glutinis* IIP-30, Biotechnology Letters; 14: (9): 801-804.

58.- Warner, L., Barauskas, R., Sivieri, L., Serota S.,
Stevenson R. 1984, Enzymatic fat hydrolysis and
synthesis. J. Amer. Oil Chem. Soc. 61: (2); 191-195.

59.- Warner, L., O'Brien D., Serota S., Barwskas R.,
1984, Lipid lipase interactions, fat splitting with
lipase from *Candida rugosa*. J. Amer. Oil Chem. Soc. 61:
(6); 1067-1071.

60.- Williams, S. T., y col. 1989, Bergey's Manual of
Systematic Bacteriology. Vol 1, Ed. Williams and
Wilkins Co., Baltimore, U.S.A., 35-36, 125-662.

61.- Williams, S. T., y col. 1989, Bergey's Manual of
Systematic Bacteriology. Vol 2, Ed. Williams and
Wilkins Co., Baltimore, U.S.A. 999-1434.