



03072

16

28

Universidad Nacional Autónoma de México

Unidad Académica de los ciclos Profesionales y de Posgrado del
Colegio de Ciencias y Humanidades.

FACULTAD DE QUÍMICA

PRODUCCIÓN DE LIPASAS POR
Rhizopus delemar.

Tesis que presenta:

PATRICIA MARTÍNEZ CRUZ

Para obtener el grado de:

MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA.

México, D.F., Junio 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 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.

ESTE TRABAJO FUE REALIZADO EN LA FACULTAD DE QUIMICA BAJO LA ASESORIA DE LA DOCTORA AMELIA FARRES GONZALEZ-SARAVIA.

SE EXTIENDE UN AGRADECIMIENTO AL ING. ABEL BLANCAS, JEFE DE LA UNIDAD DE ESCALAMIENTO DE BIOTECNOLOGIA EN EL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS, POR EL APOYO TECNICO PRESTADO DURANTE EL DESARROLLO DE ESTE PROYECTO.

AGRADECIMIENTOS.

*La verdadera riqueza está más allá de lo tangible;
en cada sonrisa, en cada palabra de aliento, en todo momento.*

*En la ayuda y el apoyo que cada uno de ustedes me ha brindado,
me ha confirmado que Dios siempre estará conmigo,*

*y que solo existe una pequeña gran palabra
que cuando se dice con Amor, dice mucho:*

GRACIAS.

A mis padres, Estela y Miguel*, por ser ejemplos de optimismo, amor y apoyo.

A mis hermanas, Vero, mi chispita de alegría y a Mary, mi inyección de buen humor.

A mi esposo, compañero y mejor amigo, Ofir, por su amor, paciencia y calidad humana.

A Alex, porque me ha enseñado lo que significa la amistad y el apoyo incondicionales.

A Amelia, quien no solo es una excelente asesora, sino una gran amiga y consejera.

A Horacio, por sembrar en mí el amor a la investigación.

Y un agradecimiento muy especial a mis compañeros y profesores de la maestría, de la planta piloto en Biomédicas, de la UAM, a Pierre y al Dr. Sánchez, con quienes aprendí y me divertí mucho.

ÍNDICE

	Pag
• Resumen	II
• Introducción	III
• Objetivos	V
• Generalidades	1
Enzimas	1
Enzimas lipolíticas	1
Diseño experimental	6
Materiales y métodos	9
Organismo	9
Medio de cultivo	9
Cosecha de esporas	10
Inmovilización de esporas	10
Condiciones de fermentación	11
Determinación de actividad lipolítica	12
Selección de fuentes de carbono y de nitrógeno	14
Optimización del medio de cultivo	14
• Resultados y discusión	
Elección de la técnica de medición de actividad lipolítica	15
Selección del pH de trabajo	18
Selección de fuentes de carbono y nitrógeno industriales	19
Optimización del medio de cultivo	22
Inmovilización de esporas de <i>Rhizopus delemar</i> en gel de alginato	26
Producción de lipasas de <i>R. delemar</i> en fermentadores instrumentados de 5 l	31
• Conclusiones	37
• Recomendaciones y perspectivas	38
• Bibliografía	39
• Artículo publicado	43

RESUMEN

La producción de enzimas hidrolíticas es actualmente una actividad muy difundida debido a la gran variedad de enzimas que existen (proteasas, carbohidrasas y lipasas principalmente) y a la versatilidad de usos de éstas en diferentes industrias.

Las lipasas (EC 3.1.1.3) son enzimas que atacan triglicéridos generando ácidos grasos libres y gliceroles. El producto de la reacción depende tanto de la especificidad como de la fuente de la enzima (animal, vegetal o microbiana) y ha permitido utilizarlas en una gran variedad de áreas: desde la industria alimentaria hasta la de detergentes, síntesis orgánica y análisis químico entre otras.

Ya que las enzimas lipolíticas utilizadas en México son importadas, en el presente trabajo se estudiaron ciertas condiciones para la producción de las mismas por *Rhizopus delemar* que abarcaron desde la optimización del medio de cultivo hasta su obtención en fermentadores instrumentados de 5 l.

Fue necesario estandarizar una técnica de medición de la actividad lipolítica ya que no existe un método óptimo para ello. Se encontró que el método titulométrico de Nahas, además de ser sencillo de llevar a cabo, permite obtener resultados reproducibles. En cuanto a las condiciones de producción, al mantener el pH a 7.0 durante la fermentación, la actividad lipolítica se incrementa. Por otro lado, la inmovilización de las esporas de *R. delemar* en alginato, permitió una duplicación de la actividad lipolítica.

Para el mejoramiento del medio de cultivo se probaron diferentes substratos industriales entre los que se seleccionaron a la dextrina amarilla y a la pasta de soya como fuentes de carbono y de nitrógeno respectivamente ya que con éstas fue posible aumentar la producción de lipasas. Posteriormente el medio de cultivo fue optimizado mediante un diseño factorial fraccionado con lo que se incrementó la producción 12 veces con respecto al control. Se concluyó que la relación de las fuentes de carbono-nitrógeno es muy importante (debe ser 1:2) y que el uso de inductores (aceite de oliva) y surfactantes (Tween 80) en concentraciones bajas estimulan la producción enzimática.

La producción de lipasas en fermentadores instrumentados fue baja en comparación a la obtenida a nivel matraz. Los resultados indican que existen ciertos problemas que ejercen un efecto negativo en ésta tales como: el suministro insuficiente de oxígeno, efecto negativo del bióxido de carbono y de las fuerzas de corte, además de que las condiciones de operación (aireación y agitación) no han sido estandarizadas aún.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad las enzimas son ampliamente utilizadas en los procesos alimenticios. Las proteasas y amilasas son las de mayor impacto siendo el mercado de lipasas más restringido. Sin embargo, su diversificación de usos ha hecho que el interés en ellas crezca, ya que se aplican en áreas como panadería, lácteos, carnes, detergentes, farmacia y síntesis orgánica, entre otras (Adler-Niessen, 1987. Neidleman, 1991). Todas estas aplicaciones se basan en la capacidad de las lipasas en hidrolizar específicamente los triglicéridos produciendo ácidos grasos libres y mono o diglicéridos (Harwood, 1989). La especificidad de las enzimas lipolíticas depende de su origen y puede ser animal, vegetal o microbiano. Desde hace unos años las microbianas representan mayor ventaja debido a que pueden controlarse las condiciones de producción, se requiere menos espacio para su obtención y los microorganismos son susceptibles a mejorarse genéticamente para aumentar la productividad (Faith, 1971).

Un estudio de mercado realizado en marzo de 1990 demostró que tanto a nivel nacional como internacional el mercado de lipasas tiende a aumentar. Tienen gran aplicación en la obtención de ingredientes utilizados como saborizantes a partir de productos lácteos y ofrece grandes perspectivas en el tratamiento de residuos. En México, la producción de enzimas lipolíticas es prácticamente nula por lo que en su mayoría se importan. Debido a ello, nuestro equipo de trabajo ha planteado la importancia de contribuir al desarrollo de tecnología para la producción de lipasas microbianas con el fin de obtener productos adecuados a las necesidades locales y disminuir el costo de la enzima.

No existe un método óptimo para la detección de lipasas. La medición de la actividad lipolítica es difícil ya que la enzima actúa en una interfase aceite-agua. Vorderwülbecke (1992) realizó diferentes ensayos basados en actividades hidrolíticas y sintéticas de las lipasas, llegando a la conclusión de que no existe un ensayo universal que dé resultados con todas las preparaciones de diferentes enzimas lipolíticas. Este autor probó que incluso las preparaciones del mismo organismo pero de diferente proveedor, lote o edad de almacenaje, muestran distintas actividades enzimáticas y diferentes condiciones de ensayo. Debido a lo anterior, una parte de este proyecto involucra la elección de una técnica de medición de la actividad lipolítica que sea reproducible.

En un inicio nuestro grupo de trabajo seleccionó de 19 microorganismos productores de lipasas únicamente a 3: *Rhizopus delemar*, *Penicillium candidum* y *Penicillium caseicolum*, debido a que con ellos se obtuvo una mayor producción de enzimas lipolíticas. Se eligió a *R. delemar* para este estudio ya que su producción de lipasas es la más alta en fermentación sumergida; por otro lado, al llevar a cabo pruebas de modificación de crema con estas enzimas, al utilizar la lipasa de *R. delemar* se obtuvo un producto con un sabor suave lo cual pensamos que satisface el gusto local teniendo una buena oportunidad en el mercado nacional (Tobalina, 1990) (Rivera-Muñoz, 1991).

Entre los antecedentes experimentales se encuentra el estudio de los factores nutricionales que afectan la producción de lipasas por *R. delemar*, probándose diferentes fuentes de carbono y de nitrógeno así como la utilización de inductores. Se observó que la utilización de substratos industriales como dextrina y extracto de levadura al 1% así como de Tween 80 al 0.2% como inductor, incrementan la producción enzimática (Espinoza, 1990). Kawasaki (1991), estudió el efecto que ejerce la glucosa sobre la síntesis de lipasas de *R. delemar*, observando que a concentraciones altas de glucosa se ejerce un efecto negativo (aparentemente represión) en la síntesis de dichas enzimas. Klekner (1989), llevó a cabo estudios sobre los requerimientos de oxígeno de *R. delemar* a nivel matraz, observando que la aireación superficial es sumamente importante para la producción de la enzima. Sin embargo, no se habían realizado la optimización del medio de cultivo ni la producción a mayor escala de la enzima por lo que esto constituye el objetivo del presente trabajo, en el que se incluye la inmovilización de las esporas de *R. delemar* ya que esto permite un incremento en la actividad lipolítica.

OBJETIVO GENERAL.

INCREMENTAR LA PRODUCCIÓN DE LIPASAS POR *Rhizopus delemar* A NIVEL LABORATORIO UTILIZANDO UN MEDIO DE CULTIVO OPTIMIZADO Y OBTENER LA ENZIMA LIPOLÍTICA EN FERMENTADORES INSTRUMENTADOS DE 5 l.

OBJETIVOS PARTICULARES.

- I. Estandarizar las condiciones experimentales:
 - a) Elegir una técnica confiable para la medición de la actividad lipolítica.
 - b) Seleccionar el pH de trabajo.
 - c) Inmovilizar las esporas de *R. delemar* en gel de alginato.
- II. Seleccionar las fuentes de carbono y de nitrógeno industriales mas adecuadas para la producción de lipasas por *R. delemar*.
- III. Optimizar el medio de cultivo para la producción de lipasas por *R. delemar*.
- IV. Producir la lipasa de *R. delemar* en fermentadores instrumentados de 5 l.

GENERALIDADES.

ENZIMAS.

Las enzimas son un grupo de proteínas con actividad catalítica producidas por células vivas y que son las mediadoras y promotoras de los procesos químicos de vida (Moo-Young, 1985).

Las dos características más notables de las enzimas son su eficiencia catalítica y su alto grado de especificidad. De esta manera, es posible emplear enzimas para hacer productos de alto valor agregado, siendo esta producción más eficiente en comparación a la llevada a cabo mediante síntesis química (Parkinson, 1990).

A excepción de su uso en procesos alimenticios y, más recientemente, en detergentes, la utilización de enzimas había sido prácticamente nula en la industria de procesos químicos. Sin embargo, actualmente este perfil está cambiando ya que sus aplicaciones se han extendido a la manufactura a gran escala de sustancias químicas y farmacéuticas (Parkinson, 1990).

El uso de enzimas en procesos alimenticios se remonta a tiempos primitivos en donde las tribus preparaban bebidas y alimentos fermentados; sin embargo, a partir de 1894 se generaron algunas patentes que las aplicaban en la industria alimentaria. Inicialmente, las enzimas más utilizadas eran las amilasas y las proteasas; entre 1951 y 1964 no se consideraban a las lipasas como enzimas de uso potencial en la industria (Neidleman, 1991). En 1983, las proteasas abarcaban el 59% del mercado mundial, las carbohidrasas el 28%, las lipasas el 3% y otras el 10% (Goodfrey, 1983). Hacia 1993, la producción nacional de enzimas alcanzó los 900 millones (Stroh, 1994).

Inicialmente, las enzimas se obtenían de fuentes animales y vegetales. Posteriormente fueron utilizadas las de origen microbiano, siendo éstas en la actualidad la mayor fuente de enzimas tanto en volumen como en variedad, debido a las ventajas que ha representado el desarrollo de fermentaciones en tanques agitados así como la manipulación genética en cultivos microbianos para sobreproducción de productos o para la producción de aquéllos que de manera normal no producían. Por otro lado, las enzimas microbianas tienen la ventaja de que su manufactura no se asocia con las variaciones estacionales o con la disponibilidad de las especies animales o vegetales.

ENZIMAS LIPOLÍTICAS.

Las lipasas (EC 3.1.1.3) pueden definirse como enzimas que atacan triglicéridos para producir ácidos grasos libres y glicerol y actúan en una interfase aceite-agua. Actualmente se

mayor cantidad de lipasas mediante este sistema en comparación con la fermentación sumergida al realizar experimentos en donde la única diferencia entre ambos sistemas fue el nivel de agua; el volumen final fue igualado para permitir una comparación de los datos (Rivera-Muñoz, 1991).

En algunos casos estos cultivos de superficie pueden ser más rentables en cuestión de costos que las fermentaciones sumergidas ya que por lo general no requieren de sistemas de agitación ni de aireación (equipo menos costoso y menor gasto de energía eléctrica). Debido a que este es un sistema heterogéneo de cuatro fases (soporte, agua, biomasa y aire), tiene limitaciones para el mejoramiento del mismo ya que los parámetros de cultivo son difíciles de controlar y de medir; en consecuencia, el escalamiento de estos procesos es más difícil que el de fermentaciones sumergidas.

Tabla 1. Aplicaciones propuestas de las lipasas

INDUSTRIA	APLICACIÓN	REFERENCIA
Síntesis orgánica	Síntesis de ésteres, interesterificación	Mustranta (1993), Parkinson (1990), Rees (1991)
Detergentes	Eliminación de manchas de grasa	Ergan (1991), Zamost (1991)
Confitería	Producción de sustitutos de aceites de costo elevado mediante transesterificación	Bloomer (1990) Harwood (1989)
Cosmetología	Remoción de lípidos	Borgström (1984)
Lácteos	Producción de saborizantes y aromas	Langrand (1990), Neidleman (1991)
Papelera	Manufactura del papel	Fischer (1993)
Química clínica	Análisis de triglicéridos y fosfolípidos en suero	Borgström (1984)
Análisis químico	Resolución de mezclas racémicas y alcoholes	Mitsuda (1992), Yoshimitsu (1991)

Fermentación sumergida. Las fermentaciones en matraces o tanques agitados han sido utilizadas para producir lipasas exitosamente. La mayoría de las enzimas lipolíticas son producidas extracelularmente. Esta producción puede llevarse a cabo: a) en lote como es el caso de *Candida rugosa* (Valero, 1991, Nakashima, 1989 e Ishihara, 1989) y c) cultivo continuo

como el caso de *Rhizopus delemar* (Giuseppin, 1984) y *Pseudomonas alcaligenes* y *Enterobacter intermedius* (Lie, 1991), el cual en primera instancia tiene la desventaja de generar un producto muy diluido, pero tiene la ventaja de que la velocidad específica de crecimiento se limita por la concentración de un componente del medio de tal modo que es posible realizar estudios fisiológicos de algunos microorganismos.

FACTORES QUE AFECTAN LA PRODUCCIÓN DE LIPASAS.

La producción de las enzimas lipolíticas es afectada por la composición de los nutrientes del medio de cultivo. A nivel industrial son usualmente compuestos de materias primas baratas, típicamente de subproductos de la agricultura. Es de gran importancia, por lo tanto, seleccionar el medio de cultivo y optimizarlo para una sobreproducción de la enzima (Gaiger, 1991). Actualmente, el diseño experimental es muy utilizado para realizar dichas optimizaciones (ver mas adelante). En general, la relación carbono-nitrógeno es fundamental para la producción de enzimas lipolíticas (Valero, 1991). Los productos complejos derivados de agricultura pueden servir en ocasiones como fuentes de nitrógeno y de carbono al mismo tiempo. La harina de soya, por ejemplo, es una fuente de proteína relativamente económica (45% del peso es proteína) y tiene un contenido de carbohidratos variado. Otras harinas incluyen las de girasol, pescado y gluten de trigo (Arora, 1992).

La inmovilización de las lipasas suele utilizarse para incrementar su termoestabilidad, por lo que se ha difundido su uso en columnas. *M. miehei*, por ejemplo, tiene una lipasa cuya temperatura óptima se incrementa de 40°C a 70°C una vez inmovilizada mientras que la enzima de *C. antarctica* tiene un incremento de 70°C a 90°C (Zamost, 1991). En estos sistemas, las enzimas pueden ser inmovilizadas fijándolas en la superficie de un material macroscópico o atrapándolas en el interior de una matriz permeable al sustrato de la enzima (Kolot, 1988).

En los últimos años, se han desarrollado sistemas de inmovilización de células microbianas vivas para la producción de enzimas. En la producción de lipasas por *Rhizopus arrhizus*, por ejemplo, se adicionan sólidos de maíz al medio de cultivo y así se dispersa el crecimiento ya que son usados por el hongo como centros de crecimiento de tal modo que se generan "pellets" pequeños (Byrne, 1989). En algunas ocasiones es necesario inmovilizar las células del hongo en soportes insolubles para promover la formación de "pellets", como el caso de la producción de lipasas por *Rhizopus chinensis* en fermentadores instrumentados utilizando poliuretano como partícula de soporte (Nakashima, 1989). En la tabla 2 se ejemplifican los métodos de inmovilización microbiana

En el presente trabajo se seleccionó un método de atrapamiento para la inmovilización de esporas de *R. delemar* debido a que la producción de enzimas lipolíticas disminuye en fermentadores instrumentados cuando se inoculan las esporas directamente, muy probablemente debido a los problemas reológicos ocasionados por la morfología del microorganismo en crecimiento. Se utilizó alginato de sodio como soporte; cuándo éste se

encuentra disuelto y entra en contacto con una solución acuosa de iones metálicos bi o trivalentes (agente gelificante), se lleva a cabo la formación del gel cuya consistencia depende de dicho agente y del buffer utilizados. Los geles de alginato proveen una pequeña barrera para la difusión de substratos neutrales, pero el método es extremadamente barato (Kolot, 1988).

Tabla 2. Métodos de inmovilización microbiana

MÉTODO:	SIN SOPORTE	ADSORCIÓN	ENLAZAMIENTO COVALENTE	ATRAPAMIENTO
Fundamento:	Interacciones hifa-hifa	Interacción electrostática entre células cargadas y soporte	Formación de enlace covalente entre el soporte y las células	Polimerización radical
Soporte usado:	No hay	Vidrio, plástico, cerámica, sílica	Carbohidratos, proteínas, aminas	Alginato, carragenina, poliacrilamida
Ventajas:	Se evita la introducción de mas reactivos al sistema	Puede ser en el interior o exterior del soporte	La difusión no está limitada	Soporte inerte, fácil de realizar
Desventajas:	Problemas reológicos en el caso de hongos	La afinidad depende de la edad celular	Agente enlazante tóxico	Difusión limitada
Referencias:	Byrne (1989), Kolot (1988)	Malcata (1992), Kolot (1988), Mustranta (1993)	Kolot (1988), Manjón (1991)	Chen (1992), Kolot (1988), Telefoncu (1990)

En la producción de lipasas por fermentación es importante evitar la represión catabólica por presencia de glucosa. Por esta razón, los substratos que contienen glucosa tienen que ser alimentados por ciclos o adicionados inicialmente en concentraciones que no lleven a cabo tal represión (Arora, 1992). Se ha encontrado que a concentraciones altas de glucosa (mayor al 4%) se ejerce un efecto negativo sobre la síntesis de lipasas producidas por *Rhizopus delemar* (Kawasaki, 1991).

Para algunas funciones metabólicas como la síntesis de enzimas por microorganismos, pequeñas cantidades de iones metálicos, surfactantes y vitaminas actúan en algunos casos como inductores (Banerjee, 1993). El Tween 80, por ejemplo, se adiciona

al medio de cultivo en una concentración del 1% (v/v) para producir lipasas por *Acremonium strictum* (Okeke, 1990) o al 0.2% para aumentar la producción de la enzima por *Rhizopus delemar* (Espinosa, 1990). En algunas ocasiones el inductor es el sustrato principal que utiliza la enzima.

Existen otros factores independientes de los nutricionales que influyen en la producción de las enzimas durante el proceso fermentativo. Entre éstos se incluyen la temperatura, pH y tamaño del inóculo (Okeke, 1990). El valor óptimo de cada uno de ellos para la producción de lipasas varía de especie a especie. La utilización de enzimas termoestables disminuye la posibilidad de contaminación microbiana y permite el uso de reactivos que podrían ser insolubles a bajas temperaturas (Zamost, 1991). Por último, es importante estudiar las condiciones de operación a nivel planta piloto que involucran la velocidad de agitación y aireación entre otras, las cuales pueden determinar, en el caso de fermentaciones miceliales, la morfología del hongo y la producción de metabolitos por el mismo (Banerjee, 1993 y Park, 1993).

La producción de enzimas industriales ofrece grandes perspectivas; las tendencias a futuro estarán dirigidas hacia la disminución en los costos de manufactura de los productos enzimáticos ya existentes. La disminución de costos podría ser realizada incrementando la productividad de las fermentaciones mediante: 1) la selección y uso de cepas más productivas (Valero, 1991); 2) por la optimización de los medios de cultivo mediante una preselección adecuada de las fuentes industriales de carbono, nitrógeno e inductores que afectan a la producción (Christen, 1991); 3) el uso de solventes orgánicos para promover la producción o la actividad enzimática (Parkinson, 1990) y 4) el estudio de las condiciones de fermentación en reactores instrumentados ya que es importante determinar la aireación y la agitación adecuadas para la producción del metabolito disminuyendo con esto los problemas reológicos o de formación de espuma (Byrne, 1989).

DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño experimental estadístico involucra una serie de experimentos pequeños y cuidadosamente diseñados. Cada experimento explora un espacio experimental mientras estudia muchas variables usando un pequeño número de observaciones. Es posible responder preguntas definidas al usar métodos estadísticos simples.

Si estamos empezando un experimento, tendremos una lista larga de variables o factores que podrían afectar el proceso. Existen tres estados de experimentación en el diseño estadístico que son:

1) *Selección*. Estos son pequeños experimentos que incluyen muchas variables por lo que existe un conocimiento impreciso del proceso. No proporcionan mucha información por factor. Su objetivo es identificar las variables importantes del proceso.

2) *Optimización*. El propósito de un experimento de optimización es construir un modelo matemático que pueda ser usado para predecir la conducta del proceso que se está investigando.

Requiere de un lote de información sobre cada factor por lo que los experimentos de optimización usualmente incluyen pocos factores seleccionados anteriormente. Su objetivo es obtener los valores óptimos específicos para cada variable.

3) *Verificación*. Utilizada cuando concluye la optimización con el objetivo de confirmar que los resultados son reproducibles. Para llevarla a cabo se realizan algunas corridas experimentales con las condiciones estandarizadas anteriormente.

Existen una gran variedad de diseños experimentales que pueden elegirse de acuerdo a cada experimento en particular. Una lista de éstos se presenta en la tabla 3.

Tabla 3. Listado de diferentes diseños experimentales (Haaland, 1989).

No. factores	Diseño de 8 corridas	Diseño de 12 corridas	Diseño de 16 corridas	Diseño de 24 corridas	Diseño de 32 corridas
3	FF	MF	-	-	-
4	FF	IF ó MF	FF	MF	-
5	FF	IF ó MF	FF	MF	FF
6	FF	IF	FF	IF	FF
7	FF	PB	FF	PB	FF
8	-	PB	FF	PB	-
9	-	PB	FF	PB	-
10	-	PB	FF	PB	-
11	-	PB	FF	PB	-

FF = Factorial fraccionado de 2 niveles

MF = Factorial fraccionado mezclado de 2 o 3 niveles

IF = Factorial fraccionado de dos niveles irregular

PB = Plackett Burman

Si nosotros diseñamos los experimentos en base a variar un factor a la vez, nos encontraremos con las siguientes desventajas: se requieren demasiados experimentos, los cuales consumen tiempo y son caros, además de que no es posible determinar las interacciones entre las variables. Debido a esto se ha ideado el diseño factorial 2^k (2 representa el número de niveles y k el número de variables) en donde las condiciones experimentales se eligen en base a un número fijo de niveles de cada variable, después de lo cuál, los experimentos se corren en todas las posibles combinaciones (Haaland, 1989).

El diseño factorial ha permitido el desarrollo de un diseño factorial fraccionado de 2 niveles 2^{k-p} (p representa la fracción utilizada del factorial completo, por ejemplo p=1 corresponde a $\frac{1}{2}$ fracción, p=2 corresponde a $\frac{1}{4}$, etc.), el cuál es una técnica mas corta debido a que el número de experimentos requeridos es menor. El método es llamado fraccional para indicar que solo una porción de todo el diseño factorial completo es llevado a cabo (Haaland,

Requiere de un lote de información sobre cada factor por lo que los experimentos de optimización usualmente incluyen pocos factores seleccionados anteriormente. Su objetivo es obtener los valores óptimos específicos para cada variable.

3) *Verificación*. Utilizada cuando concluye la optimización con el objetivo de confirmar que los resultados son reproducibles. Para llevarla a cabo se realizan algunas corridas experimentales con las condiciones estandarizadas anteriormente.

Existen una gran variedad de diseños experimentales que pueden elegirse de acuerdo a cada experimento en particular. Una lista de éstos se presenta en la tabla 3.

Tabla 3. Listado de diferentes diseños experimentales (Haaland, 1989).

No. factores	Diseño de 8 corridas	Diseño de 12 corridas	Diseño de 16 corridas	Diseño de 24 corridas	Diseño de 32 corridas
3	FF	MF	-	-	-
4	FF	IF ó MF	FF	MF	-
5	FF	IF ó MF	FF	MF	FF
6	FF	IF	FF	IF	FF
7	FF	PB	FF	PB	FF
8	-	PB	FF	PB	-
9	-	PB	FF	PB	-
10	-	PB	FF	PB	-
11	-	PB	FF	PB	-

FF = Factorial fraccionado de 2 niveles

MF = Factorial fraccionado mezclado de 2 o 3 niveles

IF = Factorial fraccionado de dos niveles irregular

PB = Plackett Burman

Si nosotros diseñamos los experimentos en base a variar un factor a la vez, nos encontraremos con las siguientes desventajas: se requieren demasiados experimentos, los cuales consumen tiempo y son caros, además de que no es posible determinar las interacciones entre las variables. Debido a esto se ha ideado el diseño factorial 2^k (2 representa el número de niveles y k el número de variables) en donde las condiciones experimentales se eligen en base a un número fijo de niveles de cada variable, después de lo cuál, los experimentos se corren en todas las posibles combinaciones (Haaland, 1989).

El diseño factorial ha permitido el desarrollo de un diseño factorial fraccionado de 2 niveles 2^{kp} (p representa la fracción utilizada del factorial completo, por ejemplo p=1 corresponde a $\frac{1}{2}$ fracción, p=2 corresponde a $\frac{1}{4}$, etc.), el cuál es una técnica mas corta debido a que el número de experimentos requeridos es menor. El método es llamado fraccional para indicar que solo una porción de todo el diseño factorial completo es llevado a cabo (Haaland,

1989). Una vez obtenidos ciertos resultados de un bloque de experimentos, estos son interpretados incluso utilizando cierto empirismo. Sin embargo, es posible determinar cuáles son las variables importantes y sus interacciones y llevar a cabo otro bloque experimental para acercarnos a las concentraciones adecuadas de cada variable. Actualmente su uso está muy difundido, como es el caso de Guan (1993) para optimizar el medio de cultivo de bacterias que remueven material tóxico de basura orgánica o para producir aromas por *Ceratocystis frimbriata* (Christen, 1991).

El diseño Plackett-Burman permite la investigación de muchos factores usando un número menor de mediciones, se considera un diseño multifactorial. Es muy utilizado en la selección de uno o dos de los factores mas importantes de una larga lista de candidatos, tal es el caso de la optimización del medio para la producción de pioverdina por *Pseudomonas fluorescens* (Kisaalita, 1993) o para la producción de ácido láctico por *Lactobacillus delbrueckii* (Monteagudo, 1993).

Los diseños factoriales de fracciones irregulares permiten una alternativa a las fracciones estándar las cuales proveen una alta resolución con tamaños de muestra mas pequeños. Los diseños mezclados de 2 y 3 niveles son similares a los factoriales fraccionados de dos niveles. Sin embargo, estos diseños permiten que un factor tenga 3 niveles (Haaland, 1989).

En el presente trabajo se seleccionó un modelo factorial fraccionado para la optimización del medio de cultivo para la producción de lipasas por *R. delemar* debido a que:

- 1.- El número de experimentos que se realizan es pequeño.
- 2.- Es un modelo que puede llevarse a cabo en poco tiempo debido al tamaño de muestras reducido.
- 3.- Generalmente es suficiente con realizar dos bloques experimentales para obtener una información certera del valor más adecuado de las variables.
- 4.- Lo anterior permite un ahorro en tiempo y dinero.
- 5.- Es posible conocer las variables importantes del proceso así como sus interacciones en caso necesario.

MATERIALES Y MÉTODOS.

1.- ORGANISMO.

La cepa utilizada fue *Rhizopus delemar* CDB H313 proveniente del Cepario del Departamento de Biotecnología del CINVESTAV del Instituto Politécnico Nacional.

La conservación de la cepa se hizo en tubos con medio de papa-dextrosa-agar (DIFCO) cubiertos con aceite de parafina estéril (Sigma). Estos tubos inclinados se mantuvieron a 4°C.

2.- MEDIO DE CULTIVO.

El medio de cultivo utilizado fue el medio D descrito por Celerin y Fergus (1971) suplementado con casaminoácidos cuya composición es la siguiente (composición porcentual):

Glucosa (Baker)	1.0
Casaminoácidos (Merck)	1.0
Nitrato de potasio (KNO_3 , Baker)	0.2
Sulfato de magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Baker)	0.05
Fosfato dibásico de potasio (K_2HPO_4 , Baker)	1.0
Elementos traza (Baker)*	0.1
Aceite de olivo (Ybarra)	2.0

*ELEMENTOS TRAZA (g/L):

Sulfato de zinc ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	439.8
Nitrato de hierro ($\text{Fe}(\text{NO}_3)_2$)	723.5
Sulfato de manganeso ($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	203.0

y se siguen estos pasos para su preparación:

- Disolver los componentes del medio (a excepción de los elementos traza y del aceite de olivo) en agua destilada y adicionar el agua destilada hasta el volumen requerido.
- Ajustar el pH a 7.0
- Adicionar los elementos traza y agitar.
- Adicionar el aceite de olivo al final y por separado en cada matraz.
- Esterilizar a 121°C durante 15 min.

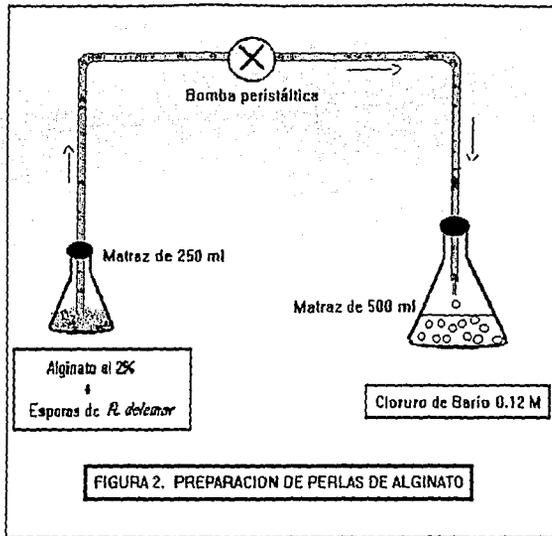
3.- COSECHA DE ESPORAS.

- a) Preparar matraces Erlenmeyer de 500 ml con 60 ml de medio PDA e inocular con micelio de *R. delemar*. Incubar a 29°C durante 6 días, suficientes para una adecuada producción de esporas.
- b) Mediante un asa y en condiciones estériles, tomar el micelio de cada matraz e incorporarlo en otro que contenga glicerol al 50% estéril. Agitar este en un vórtex para lograr que las esporas se desprendan del micelio hasta lograr una densidad óptica de 0.06 a 540 nm.
- c) Retirar el micelio del matraz.
- d) Colocar la suspensión de esporas obtenida en tubos con tapón de rosca estériles y mantenerlos a 4°C.

4.- INMOVILIZACIÓN DE ESPORAS.

* NOTA: las cantidades de cada solución que se especifican a continuación corresponden a las necesarias para preparar el inóculo de una fermentación de 5 l.

- a) Montar el sistema para preparación de perlas conectando 2 matraces Erlenmeyer entre sí (de 250 ml y de 500 ml) con una manguera Tygon #13 como se indica en la figura 2. En el extremo de la manguera que se introduce al matraz de 500 ml se colocará un capilar cuya punta debe quedar a la altura que ocuparía un volumen de 400 ml. Colocar dentro de cada matraz un magneto. Esterilizar este sistema a 121°C durante 15 min.
- b) Preparar 150 ml de una solución de alginato de sodio (Sigma) al 2% en buffer 0.120 M (de acetatos o de fosfatos como se mencionará posteriormente). El total de buffer a preparar es de 350 ml. Esterilizar a 121°C durante 15 min. Vaciar la solución de alginato en el matraz de 250 ml que se muestra en la Figura 2.
- c) Tomar la cantidad necesaria de una suspensión de esporas de *Rhizopus delemar* de acuerdo a la densidad óptica obtenida (ver condiciones de fermentación posteriormente) y centrifugar a 4,000 r.p.m. durante 15 min. Decantar y adicionar 5 ml de buffer estéril. Agitar y vaciarla en condiciones estériles en el matraz de 250 ml. Mantenerla en agitación mecánica constante.
- d) Preparar una solución de BaCl₂ 0.120 M (solución gelificante) y esterilizarla a 121°C durante 15 min. En condiciones estériles, vaciarla en el matraz de 500 ml. Mantener en agitación mecánica constante.
- e) Mediante la acción de una bomba peristáltica, adicionar gota a gota la suspensión de esporas en la solución de BaCl₂ para que se forme el gel de alginato. Una vez formadas todas las perlas, mantenerlas en refrigeración en la solución de BaCl₂ durante 24 hr.
- f) Decantar la solución gelificante y lavar las perlas 2 veces con agua destilada



5.- CONDICIONES DE FERMENTACIÓN.

a) **A nivel matraz.** Matraces Erlenmeyer de 250 ml con 50 ml de medio de cultivo esterilizados a 121°C durante 15 min.

* Inóculo: 1 ml de la suspensión de esporas ($DO_{540}=0.06$).

* Temperatura: 29°C.

* Agitación: 150 r.p.m.

b) **En fermentador.** Reactores instrumentados New Brunswick de 5 l con 2 impulsores de turbina y 4 deflectores. Se utilizaron electrodos para medir la concentración de oxígeno disuelto (OD) y el pH. El volumen de operación fue de 3 l. Se esterilizaron a 121°C durante 15 min.

* Inóculo: 60 ml de la suspensión de esporas ($DO_{540}=0.06$) inoculadas directamente o inmovilizadas en gel de alginato.

* Temperatura : 29°C.

* Agitación: 400 r.p.m.

* Aireación: 1 vvm.

* pH: 7.0 (se controló el pH a 7.0 mediante la adición automática de NaOH 10%).

6.- DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD LIPOLÍTICA.

- a) Filtrar la biomasa mediante un sistema Millipore con filtros Whatman No. 1, con diámetro de 4.25 cm.
- b) Dializar en frío 10 ml del filtrado en agua destilada durante 24 hr.
- c) Determinar la actividad lipolítica en el filtrado dializado.

Los métodos estudiados para la medición de dicha actividad fueron los siguientes:

- A) Método de Menassa (Menassa, 1982).
- B) Método titulométrico de Sigma^{MR} (Kit SIGMA, 1994).
- C) Método titulométrico de Nahas (Nahas, 1988).

A) MÉTODO DE MENASSA. Adaptado por Espinoza (1990)

Se basa en la cuantificación de los ácidos grasos liberados al actuar la enzima en una emulsión de tributirina, mediante la caída de pH. La actividad se reporta como micromoles de ácido butírico liberados por mililitro de enzima en un minuto.

PROCEDIMIENTO:

- a) Preparar un baño con temperatura constante a 37°C.
- b) Colocar en un tubo, 7 ml de amortiguador (buffer tris-maleatos 2.5 mM pH 6.0), 2 ml de una emulsión de tributirina (Merck) al 5% en agua destilada y 1 ml de enzima (filtrado dializado); este último previamente incubado durante 5 min a 37°C.
- c) Agitar de manera continua. Leer el pH inicial así como la caída de este cada minuto durante 5 min.
- d) Calcular los micromoles de ácido butírico liberados utilizando una curva patrón de dicho ácido al 5%.

B) MÉTODO TITULOMÉTRICO DE SIGMA^{MR}.

Se fundamenta en la acción de la enzima sobre el aceite de oliva generándose ácidos grasos libres y diglicéridos cuya concentración es proporcional a la cantidad de sosa que se adiciona para neutralizar la muestra.

PROCEDIMIENTO:

- a) Adicionar en cada tubo las cantidades especificadas en la tabla que se encuentra a continuación según sea el caso:

VOLUMEN (ml)	INCUBACIÓN 3 hr		INCUBACIÓN 6 hr	
	Prueba	Blanco	Prueba	Blanco
H ₂ O	2.5	2.5	2.5	2.5
Sustrato	10	10	3	3
Buffer	1	1	1	1
Enzima	1	-	1	-

- b) Agitar vigorosamente durante 5 segundos.
- c) Incubar los tubos a 37°C durante 3 ó 6 hr según sea el caso.
- d) Inmediatamente después de terminado el tiempo de incubación, colocar los tubos a temperatura ambiente y pipetear 1 ml de suero en un matraz Erlenmeyer. Marcar el matraz como blanco y guardar en refrigeración (2-6°C).
- e) Después del periodo de incubación:
 - * Colocar el contenido del tubo blanco en el matraz Erlenmeyer del blanco.
 - * Colocar el contenido del tubo de prueba en otro matraz limpio. Marcarlo como prueba.
 - f) Dentro de cada uno de los 2 tubos (blanco y prueba), pipetear 3 ml de etanol al 95%. Agitar hasta enjuagar y adicionar dentro de sus frascos respectivos.
 - g) Adicionar a cada frasco una solución del indicador timoftaleína (6 gotas para incubación de 3 hr y 4 gotas para incubación de 6 hr).
 - h) Titular cada frasco con una solución de NaOH 0.05 N hasta un color azul claro definido.
 - i) Calcular las unidades de lipasa sustrayendo el volumen de sosa usado para el blanco al de prueba.

C) MÉTODO TITULOMÉTRICO DE NAHAS.

Se basa en la acción de la enzima sobre un sustrato de tributirina al 5% generándose ácidos grasos libres cuya concentración es proporcional a la cantidad de sosa que se adiciona para neutralizar la muestra. Se define una unidad de lipasa como un micromol de ácido graso por mililitro de enzima en un minuto.

Procedimiento.

- a) Preparar un baño con temperatura constante a 37°C.
- b) Colocar en un tubo grande, 6 ml del sustrato (tributirina al 5% en buffer tris-maleatos 25 mM, pH 6.0) y 4 ml de la enzima (filtrado dializado); este último incubado previamente a 37°C durante 5 min.
- c) Agitar de manera continua. Una vez hecha la reacción, el pH tiene una variación de ± 0.02 por lo que se recomienda tomar este valor como pH inicial.
- d) Después de tener una variación de 2-3 centésimas de unidad de pH, ajustarlo al pH inicial adicionando NaOH 50 mM iniciando con ello el tiempo de reacción.
- e) Anotar el volumen de NaOH requerido para mantener el pH constante durante 5 min.
- f) Calcular los micromoles de ácido generado en base al gasto de NaOH 50 mM.

Para estandarizar esta técnica se probaron 2 lipasas comerciales: Palatasa de NOVO y lipasa pregástrica de carnero de Productos Nutricionales.

7.- SELECCIÓN DE LAS FUENTES DE CARBONO Y DE NITRÓGENO.

Se seleccionaron diferentes sustratos industriales como fuentes de carbono y de nitrógeno con base en su costo y en la disponibilidad en México. En la tabla 7 se muestran los probados en este estudio. Los controles fueron reactivos de grado laboratorio: glucosa (Merck) como fuente de carbono y casaminoácidos (Difco) como fuente de nitrógeno.

El primer bloque de experimentos se realizó sustituyendo el tipo de fuente de nitrógeno en el medio de cultivo para seleccionar la más adecuada para la producción de lipasas; en un segundo bloque se probaron las diferentes fuentes de carbono y se seleccionó la mejor en cuanto a producción de enzimas lipolíticas.

8.- OPTIMIZACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO.

La optimización del medio de cultivo se llevó a cabo utilizando un diseño factorial fraccionado en 2 etapas. En la primera de ellas se utilizó un diseño experimental 2^{7-4} en el cual se determinaron los componentes que tienen un efecto significativo en la producción de lipasas. En la segunda etapa se empleó un diseño experimental 2^{6-3} en el cual se estudió el efecto de un ingrediente adicional y se ajustaron las concentraciones de los constituyentes del medio de cultivo. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado.

Tanto la actividad lipolítica como los coeficientes de contraste fueron calculados en ambos diseños experimentales lo cual permitió la determinación del efecto de cada constituyente. La fórmula utilizada para dicho fin es la siguiente (Haaland, 1989):

$$b_j = \frac{1}{4} \sum_{i=1}^8 A_j Y_i$$

en donde:

b_j = coeficiente de contraste del constituyente j

A_j = nivel del constituyente j (+ ó -)

Y_i = actividad lipolítica para la corrida i en unidades de lipasa (U/ml).

En cada diseño experimental se calculó un valor promedio de actividad lipolítica denominado Y_o .

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

1.- ELECCIÓN DE LA TÉCNICA DE MEDICIÓN DE ACTIVIDAD LIPOLÍTICA.

A) **MÉTODO DE MENASSA.** Se llevaron a cabo mediciones de actividad lipolítica de la lipasa de *R. delemar*, y pese a que este método es el que se había estado utilizando anteriormente por nuestro grupo de trabajo presenta los siguientes inconvenientes:

1.- El pH durante el curso de la medición no se regula al valor de máxima actividad (pH=6.0), por lo que la disminución de éste a lo largo de la reacción podría afectar la actividad enzimática.

2.- A pHs inferiores a 5.0 no es posible obtener una respuesta lineal (Ver figura 3) por lo que abajo de este valor de pH la actividad lipolítica calculada no es confiable.

Por lo anterior fue necesario probar otros métodos para cuantificar adecuadamente la actividad lipolítica.

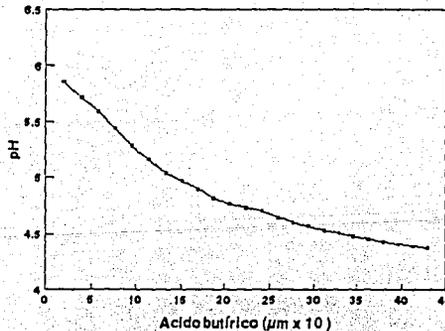


Figura 3: Curva estándar de ácido butírico en buffer tris-maleato 2.5 mM, pH 6.0

B) MÉTODO TITULOMÉTRICO DE SIGMA^{NR}. El costo de los reactivos de Sigma necesarios para este análisis es elevado (buffer, indicador y emulsión de aceite de oliva). Esto nos llevó a tratar de prepararlos en el laboratorio y comparar la actividad lipolítica detectada en ambos casos utilizando como estándar una lipasa de Sigma.

Fue posible preparar en el laboratorio una emulsión muy parecida a la producida por Sigma (Ver tabla 4, emulsión F) la cual no presentó separación de fases debido al uso de surfactantes (20% de Span 80 y 6% de Tween 80) y con una emulsión de tipo aceite en agua (o/w). La preparación en el laboratorio tanto del buffer como del indicador fue realizada sin problemas.

Se llevaron a cabo las titulaciones con este método de dos lipasas comerciales (de Sigma y de Productos Nutricionales) utilizando los reactivos de Sigma y los preparados en el laboratorio. Los resultados (tabla 5) muestran que la enzima de Sigma no presenta actividad lipolítica lo cual puede atribuirse a un lote defectuoso; esto impidió su utilización para estandarizar la técnica. Por otro lado, al emplear la lipasa de Productos Nutricionales, se observó que los resultados obtenidos entre los reactivos de Sigma y los preparados en el laboratorio no son duplicables y que la actividad lipolítica registrada difiere considerablemente (ver tabla 5, experimento 2 y 3).

Tabla 4. Emulsiones aceite de oliva/agua (50:50) preparadas en el laboratorio.

Muestra	Tipo de emulsión	Estabilidad	Emulsificante (%)
A	w/o	No es estable	No tiene
B	w/o	No es estable	0.1% Tween 80
C	w/o	Regular	10% Tween 80
D	o/w	Regular	30% Tween 80
E	o/w	No es estable	13% Span 80 y 13% Tween 80
F	o/w	Estable	20% Span 80 y 6% Tween 80
G	o/w	Regular	13% Span 80 y 6% Tween 80
SIGMA	o/w	Estable	Si contiene

o/w = emulsión aceite en agua. w/o = emulsión agua en aceite.

Los resultados obtenidos permitieron descartar la posibilidad de utilizar los reactivos preparados en el laboratorio para determinar la actividad lipolítica con el método de Sigma. Lo anterior nos imposibilitó a utilizar esta técnica para la determinación de la actividad lipolítica debido al costo de los reactivos originales.

Tabla 5. Resultados de la titulación con el método de Sigma.

Experimento	1	2	3	4
Sustrato	Sigma	Sigma	Sigma	Emulsión F
Buffer	Sigma	Sigma	Preparado	Preparado
Enzima	Sigma	PN*	PN*	PN*
Indicador	Sigma	Sigma	Preparado	Preparado
Actividad**	0	84	190	210

* PN= lipasa pregástrica de Productos Nutricionales

** Act. lipolítica en UI de lipasa/ml

C) MÉTODO TITULOMÉTRICO DE NAHAS. Se seleccionó la Palatasa de NOVO como estándar ya que su solubilidad es total mientras que la de Productos nutricionales sólo es parcial. Posteriormente se probaron 8 diluciones de la palatasa de NOVO (1.6, 1.0, 0.89, 1.67, 0.5, 0.25, 0.1 y 0.05 mg/ml) para determinar las concentraciones en las cuales es posible cuantificar la actividad lipolítica con este método, sobre todo porque al no contar con el equipo automatizado para la titulación de la muestra, fue necesario realizarla manualmente.

Los resultados observados en la tabla 6 indican que entre la dilución 1 y la 6 la actividad lipolítica es detectable. Por otro lado, de acuerdo a la figura 4, el comportamiento de la curva es lineal entre estos rangos, ya que los puntos se acercan de tal modo a la línea que marca la tendencia, que presenta un coeficiente de correlación de 0.988. Lo anterior indica que, mientras la actividad lipolítica de la enzima de *R. delemar* se encuentre en estos rangos (pudiendo diluirse en caso necesario), la medición mediante la técnica de Nahas es adecuada.

TABLA 6. Actividad lipolítica de las diluciones de la palatasa de NOVO

DILACIÓN	ACTIVIDAD LIPOLÍTICA (U/ml)	mg/ml DE ENZIMA
1	13.13	1.6
2	9.09	1.0
3	6.21	0.89
4	3.83	0.67
5	2.50	0.30
6	1.25	0.25
7	ND*	0.10
8	ND*	0.05

*ND = no se detectó actividad lipolítica.

Al medir la actividad lipolítica de la enzima producida por *R. delemar* al 2º día de fermentación, se obtuvo un valor de 1.37 U/ml, el cual se encuentra en el rango de las diluciones 5 y 6.

En base a los resultados anteriores, se seleccionó el método de Nahas para la cuantificación de lipasas en los experimentos posteriores.

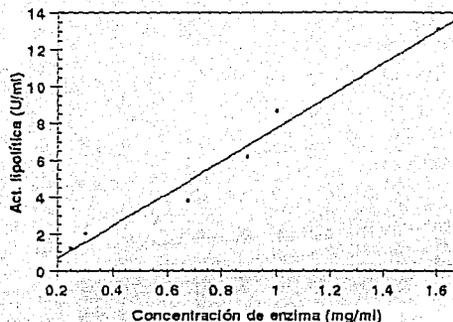


Figura 4. Actividad lipolítica de la palatasa de NOVO detectada con el método de Nahas. Coeficiente de correlación (r) = 0.988

2.- SELECCIÓN DEL pH DE TRABAJO.

Estudios anteriores en nuestro grupo de trabajo demostraron que si el pH inicial del medio de cultivo se ajustaba a 7.0 la producción de lipasas aumentaba. El efecto notable del pH inicial llevó a analizar el del pH a lo largo de la fermentación. Se llevaron a cabo cinéticas de fermentación de 96 hr a nivel laboratorio ajustando el pH a 7.0 cada 24 hr y comparando la producción de enzima lipolítica contra un control en el cuál únicamente se ajustó el pH a 7.0 al inicio de la fermentación.

De acuerdo a los resultados (ver Figura 5), en ambos casos se obtiene una máxima producción de enzima a las 48 hr de fermentación. Al ajustar el pH a 7.0 cada 24 hr se duplica la actividad lipolítica en relación al control. Es importante destacar que la enzima presenta mayor estabilidad en el primer caso ya que la actividad se mantiene prácticamente

constante entre las 48 y 72 hr mientras que en el control se obtiene un pico único de mayor actividad a las 48 hr.

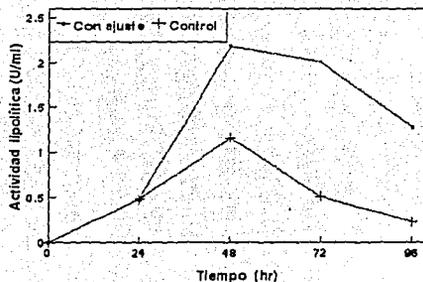


Figura 5. Comparación de la actividad lipolítica de la lipasa de *Rhizopus delemar* al ajustar el pH a 7.0 cada 24 hr y al ajustarlo únicamente al inicio de la fermentación (control)

Lo anterior sugiere que la actividad lipolítica podría incrementarse aún más si el pH se mantuviera constante a 7.0 durante toda la fermentación. Por ello, en los experimentos posteriores realizados en fermentadores instrumentados se llevó a cabo el ajuste automático y continuo del pH a 7.0 con sosa.

3.- SELECCIÓN DE LAS FUENTES DE CARBONO Y DE NITRÓGENO INDUSTRIALES PARA LA PRODUCCIÓN DE LIPASAS.

Espinoza (1991), estudió los factores nutricionales que afectan la producción de lipasas por *R. delemar*, demostrando que la producción de enzimas lipolíticas se incrementa al utilizar ciertos substratos complejos (dextrina al 1% como fuente de carbono y extracto de levadura al 1% como fuente de nitrógeno), en lugar de glucosa y casaminoácidos respectivamente. Esto condujo a probar diferentes fuentes de carbono y de nitrógeno industriales para seleccionar aquellas que aumentarían la producción de la enzima, así como para disminuir los costos de producción. La tabla 7 muestra los diferentes substratos empleados en este estudio, en el que se

utilizó como base el medio D (Celerin y Fergus, 1971) a las concentraciones especificadas en materiales y métodos, variando las fuentes de nitrógeno o de carbono (ver posteriormente) pero manteniendo constantes el resto de los ingredientes.

Tabla 7. Substratos industriales utilizados para la selección de las fuentes de carbono y de nitrógeno.

FUENTES DE CARBONO	PROVEEDOR	PRECIO ^b (N \$/TON)
Glucosa industrial	Arancia	2,010
Dextrina amarilla	Aranal S.A.	1,938
Amidex	Arancia	1,836
Glucosa ^a	Merck	-
FUENTES DE NITRÓGENO		
Caseinato de sodio	Ind. de Alimentos	24,675
Pasta de soya	Ind. de Alimentos	1,710
Harina de soya	Arancia	2,025
Extracto de levadura	Arancia	12,000
Casaminoácidos ^a	Merck	-

^a Substratos grado reactivo usados como control

^b en 1991.

El primer bloque de experimentos se realizó por triplicado para la selección de la fuente de nitrógeno más adecuada. Se sustituyeron los casaminoácidos del medio D con las diferentes fuentes de nitrógeno industriales y se llevaron a cabo fermentaciones de 48 hr. La fuente de carbono utilizada en este caso fue la glucosa.

Los resultados de la Tabla 8 muestran que el uso de fuentes de nitrógeno industriales (exceptuando la harina de soya), incrementa considerablemente la actividad lipolítica, especialmente utilizando caseinato de sodio y pasta de soya, con las cuales hubo un incremento de 4.6 y 5.6 veces más, respectivamente. Se observa que los casaminoácidos (control) y la harina de soya son las fuentes de nitrógeno más deficientes. No existen diferencias significativas entre la pasta de soya y el caseinato de sodio pero se seleccionó la primera debido a que: 1) es mucho más barata que el caseinato y 2) se promueve el crecimiento en forma de pellets al ser usada como soporte. De manera similar a lo descrito anteriormente, Byrne (1989) utilizó sólidos de carbono para evitar el crecimiento micelial en la producción de lipasas por *R. arrhizus*.

Tabla 8. Resultados experimentales para la selección de la fuente de nitrógeno industrial.

Fuentes de nitrógeno	Y_o ^a (U/ml)	Desviación estándar
Caseinato de sodio	3.004	0.575
Pasta de soya	3.675	0.591
Harina de soya	0.623	0.144
Extracto de levadura	2.418	0.492
Casaminoácidos ^b	0.682	0.255

^a Promedio de la actividad lipolítica. ^b Substrato grado reactivo utilizado como control.
Fuente de carbono utilizada: glucosa grado reactivo. Experimentos realizados por triplicado.

El segundo bloque experimental se llevó a cabo por duplicado para la selección de la fuente de carbono. Como fuente de nitrógeno se utilizó la pasta de soya y se sustituyó la glucosa del medio D con las diferentes fuentes de carbono industriales. Se llevaron a cabo fermentaciones de 48 hr.

La Tabla 9 muestra que las mejores fuentes de carbono son la dextrina amarilla y el Amidex 20, con un incremento en actividad lipolítica de 1.5 y 1.3 veces respectivamente, en comparación al control con glucosa. Se seleccionó la primera ya que es una fuente de carbono barata además de que, al ser un ingrediente poco soluble, podría colaborar con la pasta de soya para formar un soporte que promueva un crecimiento en forma de pellets. En los experimentos subsecuentes de optimización, la pasta de soya y la dextrina amarilla se utilizaron como fuente de nitrógeno y de carbono respectivamente.

Tabla 9. Resultados experimentales para la selección de la fuente de carbono industrial.

Fuentes de carbono	Y_o ^a (U/ml)	Desviación estándar
Glucosa industrial	4.05	0.099
Dextrina amarilla	4.94	0.317
Amidex	4.43	0.226
Glucosa ^b	3.34	0.030

^a Promedio de la actividad lipolítica. ^b Substrato grado reactivo utilizado como control.
Fuente de nitrógeno utilizada: pasta de soya. Experimentos realizados por duplicado.

4.- OPTIMIZACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO.

La optimización del medio de cultivo se llevó a cabo utilizando un modelo factorial fraccionado en dos pasos: en el primero, se determinaron los componentes del medio de cultivo que tienen un efecto significativo en la producción de lipasas y en el segundo se ajustaron las concentraciones y se estudió el efecto del Tween 80 en la producción de la enzima.

Esta sección corresponde a la cita publicada en el Journal of Fermentation and Bioengineering (ver artículo al final de la tesis).

Tabla 10. Niveles de los ingredientes para DE 1.

Constituyente	Concentración (g/l)		
	Nivel +	Nivel original	Nivel -
A) Dextrina amarilla	15.0	10.0	5.00
B) Pasta de soya	15.0	10.0	5.00
C) KNO ₃	3.00	2.0	1.00
D) MgSO ₄	0.75	0.5	0.25
E) K ₂ HPO ₄	1.50	1.0	0.50
F) Solución de elementos traza (ml/l)	1.50	1.0	0.50
G) Aceite de oliva (ml/l)	30.0	20.0	10.0

Tabla 11. Diseño Experimental No. 1 (DE 1)

Corrida	A	B	C	D	E	F	G	Y(U/ml)
1	-	-	-	+	+	+	-	12.52
2	+	-	-	-	-	+	+	1.51
3	-	+	-	-	+	-	+	8.77
4	+	+	-	+	-	-	-	10.74
5	-	-	+	+	-	-	+	6.39
6	+	-	+	-	+	-	-	4.05
7	-	+	+	-	-	+	-	7.87
8	+	+	+	+	+	+	+	3.84
b	-3.85	1.69	-2.85	2.82	0.67	-1.05	-3.67	Y ₀ =6.96

Actividad lipolítica (Y) determinada en un cultivo de 48 hr. Se muestran los coeficientes de contraste de cada componente (b) así como el promedio de la actividad lipolítica del diseño (Y₀).
Actividad lipolítica del control (medio D) = 1.37 U/ml.

Diseño experimental No. 1 (DE 1). Se realizó un diseño experimental 2^{7-4} el cual consiste de 8 corridas que permiten el estudio de 7 parámetros como se muestra en la Tabla 11 (Haaland, 1989). La concentración de cada constituyente al nivel + y - se especifican en la Tabla 10, los cuáles se eligieron con un tamaño de paso del 50%, es decir, del valor original se aumentó o disminuyó cada concentración en un 50%.

En la tabla 11 se muestran los valores obtenidos de actividad lipolítica (Y) para el DE 1. Para la interpretación de los resultados se utiliza el valor del coeficiente de contraste (b): si éste es mayor a cero, el componente tiene un efecto positivo por lo que su concentración se debe aumentar de acuerdo al criterio del investigador. Si el valor de b es menor a cero, su concentración deberá disminuirse debido al efecto negativo que tiene. Si b presenta un valor de 0 ó, a criterio del investigador muy cercano a éste, la concentración del componente debe dejarse como está. De acuerdo a los coeficientes de contraste obtenidos en el DE 1, se concluye que la pasta de soya y el sulfato de magnesio tienen un efecto positivo en la producción de la lipasa, por ello, su concentración inicial se aumenta en el próximo paso de optimización (se aumenta en un 24.3% y 40% respectivamente. Ver tabla 13). La dextrina amarilla, el nitrato de potasio y el aceite de oliva ejercen un efecto negativo en la producción enzimática por lo que es necesario disminuir su concentración en un 54%, 41% y 53% respectivamente). En cuanto al fosfato de potasio y los elementos traza, dado que su coeficiente de contraste es cercano a cero, no se modificaron sus concentraciones en las siguientes pruebas.

El DE 1 mostró que la actividad lipolítica es incrementada 5 veces en comparación con la actividad (1.37 U/ml) obtenida a las 48 hr en el control (medio D).

Diseño experimental No. 2 (DE 2). Se utilizó un diseño experimental 2^{6-3} , que permitió el estudio de 6 parámetros en 8 corridas (Tabla 13): 5 parámetros cuya concentración se modificó de acuerdo a los resultados del DE 1 (Dextrina amarilla, pasta de soya, KNO_3 , MgSO_4 , y aceite de oliva) y se introdujo un surfactante (Tween 80) como sexto ingrediente, ya que en estudios anteriores se demostró que estimula la liberación de la enzima al medio extracelular (Espinoza, 1990). En la Tabla 12 se muestra la concentración de cada constituyente. Estos valores se eligieron con un tamaño de paso del 20%.

De acuerdo a los coeficientes de contraste obtenidos en el DE 2, las concentraciones de la pasta de soya, el sulfato de magnesio y el aceite de oliva se disminuyen ligeramente (entre un 4 y un 10%), mientras que las de la dextrina amarilla, el nitrato de potasio y el tween 80 se incrementan un poco (en un 9%, 13% y 3% respectivamente), de tal modo que fue posible obtener los valores adecuados (concentraciones optimizadas) de cada ingrediente, los cuáles se muestran en la figura 6, en donde se comparan los componentes y sus concentraciones entre el medio de cultivo original y el optimizado. No se realizó un tercer diseño experimental ya que muy probablemente las concentraciones que se obtendrían a partir de éste, serían muy cercanas a las optimizadas.

Como se muestra en las Tablas 11 y 13, el DE 2 permitió un incremento del 100% en la actividad lipolítica de acuerdo a los valores promedios de ésta (Y_o): $Y_o=13.6$ U/ml en DE 2 y $Y_o=6.96$ U/ml en DE 1. En cuanto a la actividad original (1.37 U/ml), la optimización incrementó su valor 10 veces ($Y_o = 13.6$ en DE 2).

Tabla 12. Niveles de los ingredientes para DE 2.

Constituyente	Concentración (g/l)		
	Nivel +	Nivel original	Nivel -
A) Dextrina amarilla	6.00	5.0	4.0
B) Pasta de soya	14.4	12.0	9.6
C) KNO_3	1.44	1.2	0.96
D) $MgSO_4$	0.84	0.7	0.56
E) Aceite de oliva (ml/l)	12.0	10.0	8.0
F) Tween 80	2.40	2.0	1.6

Tabla 13. Diseño experimental No. 2 (DE 2).

Corrida	A	B	C	D	E	F	$Y(U/ml)$
1	-	+	-	-	-	-	12.67
2	+	-	+	+	-	-	15.96
3	-	-	+	-	+	-	13.98
4	+	+	-	+	+	-	10.96
5	+	+	+	-	-	+	14.82
6	-	-	-	+	-	+	12.11
7	+	-	-	-	+	+	15.08
8	-	+	+	+	+	+	13.19
b	1.22	-1.37	1.78	-1.08	-0.59	0.41	$Y_o = 13.6$

Actividad lipolítica (Y) determinada en un cultivo de 48 hr. Se muestran los coeficientes de contraste de cada componente (b) así como el promedio de la actividad lipolítica del diseño (Y_o).

El Tween 80 es el único ingrediente que fue adicionado a la formulación del medio por lo que su efecto en la producción de lipasas es significativo, de manera análoga a los resultados

obtenidos por Okeke (1990) con *Acremonium strictum*, la incorporación del Tween 80 en el medio de cultivo estimuló la producción enzimática. En cuanto al aceite de oliva, fue necesario reducir su concentración a la mitad, lo que puede explicarse con base en que este componente en bajas concentraciones (10 ml/l o menos) actúa como efector de la enzima, pero a niveles elevados podría interferir con la transferencia de oxígeno. Okeke (1990) también observó que la incorporación de lípidos a concentraciones de 10 ml/l (entre ellos el aceite de oliva), incrementa la actividad lipolítica. Por otro lado, es evidente que la relación fuente de carbono-fuente de nitrógeno es muy importante para la producción de lipasas ya que el resultado final indica que debe modificarse de 1:1 a 1:2.

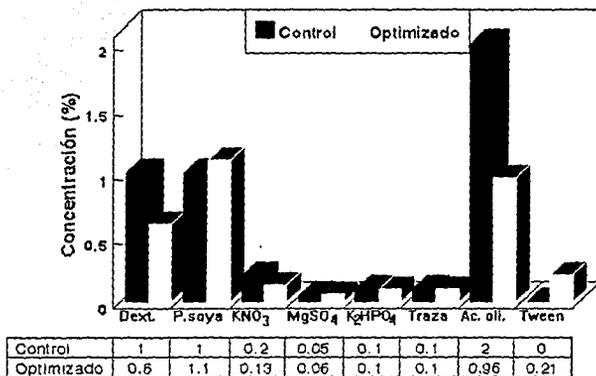


Figura 6. Concentración del medio de cultivo antes y después de su optimización.

Cinéticas de producción. En la figura 7 se presenta el perfil de producción de la lipasas de *R. delamar* a nivel matraz entre el medio D y el medio optimizado. En ambos casos, la producción máxima se alcanza a las 48 hr de fermentación, sin embargo, el medio de cultivo optimizado permite un incremento de 12 veces la producción enzimática con respecto al control.

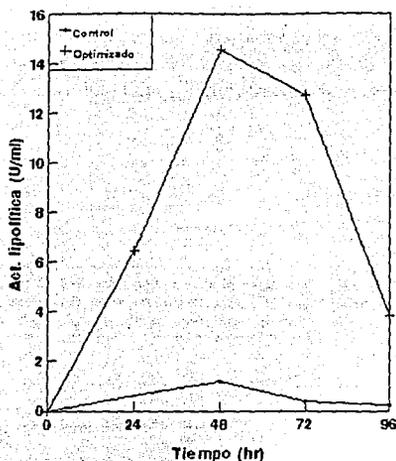


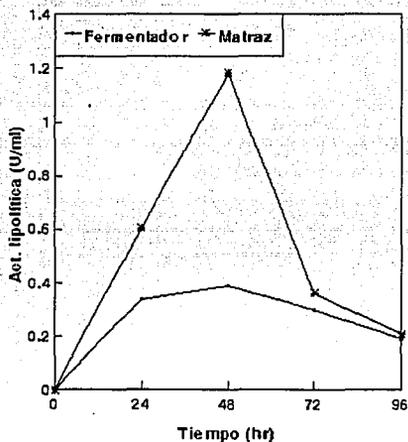
Figura 7. Producción de lipasas por *R. delemar* a nivel matraz entre el medio D y el medio optimizado ajustando el pH a 7.0 al inicio de la fermentación

4.- INMOVILIZACIÓN DE ESPORAS DE *Rhizopus delemar* EN GEL DE ALGINATO

Se llevaron a cabo estudios sobre la producción de lipasas de *R. delemar* en fermentadores instrumentados de 5 l, en donde se observó que con el medio control la producción de enzimas lipolíticas baja a una tercera parte cuando se inoculan las esporas directamente en comparación a la producción obtenida a nivel matraz (Figura 8). Esto podría atribuirse a problemas reológicos severos, ya que el crecimiento micelial en el fermentador (ver figura 9) muy probablemente dificulta la disponibilidad de los nutrientes del medio de cultivo hacia el microorganismo, lo que repercute en una baja producción de enzimas lipolíticas. Byrne (1989) obtuvo resultados similares con *R. arrhizus*, en donde el micelio se desarrolló sobre las paredes del fermentador, impulsores y deflectores, creando problemas operacionales. Por su parte, Olsvik (1992), confirma que las propiedades reológicas en fermentaciones miceliales están determinadas por la concentración y el estado morfológico del micelio. Una alternativa para aumentar la producción de lipasas es la inmovilización de las esporas ya que esta técnica permite un crecimiento en forma de pellets con los que la viscosidad del medio permanece baja y consecuentemente el mezclado y la transferencia de masa son mejores en comparación al

comportamiento reológico obtenido cuando existe un crecimiento micelial (Prosser, 1991). La inmovilización de esporas implica el estudio de parámetros como la selección del soporte, del agente gelificante y del buffer para la obtención de esferas con un tamaño y resistencia adecuadas. En el presente trabajo, como se mencionó anteriormente, se utilizó alginato de sodio como soporte debido a que su uso está muy difundido y la preparación de las perlas es sencilla.

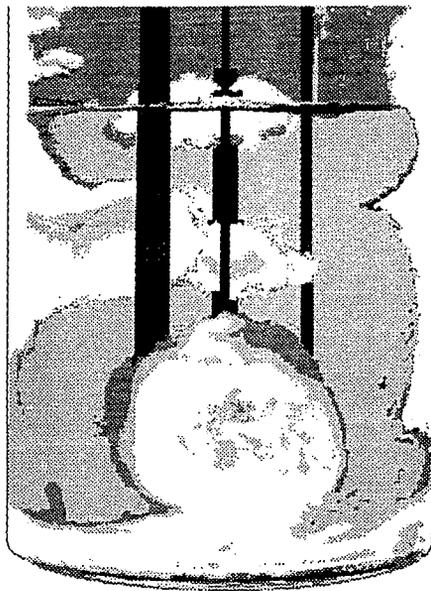
Figura 8: Comparación entre la producción de lipasas por *R. delemar* en matraz y fermentador de 5 l utilizando el medio D (control).



Nivel matraz: agitación = 150 rpm.
Fermentador: agitación = 400 rpm. Aireación = 1 vvm.

Elección del agente gelificante. De acuerdo a Byrne (1989), los iones calcio promueven la formación del micelio por lo cual existe una probabilidad alta de que las perlas formadas con éste se fraccionen muy rápido debido al crecimiento micelial del microorganismo. Por lo tanto, se seleccionó cloruro de bario como agente polimerizante.

Figura 9. Crecimiento micelial de *Rhizopus delemar* en el fermentador instrumentado de 5 l [Fotografía escaneada].
Aireación = 1 vvm. Agitación = 400 r.p.m.



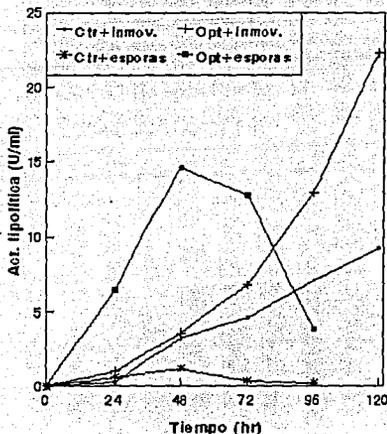
Selección del buffer. Para la selección del buffer se probaron tanto el buffer de fosfatos como el de acetatos y se comparó la resistencia de las perlas al producirlas con ambos.

De acuerdo a los resultados, se observó que aunque el diámetro de las perlas obtenidas con ambos buffers es el mismo (2 mm), la dureza es diferente ya que con el buffer de fosfatos son lábiles mientras que con el de acetatos son rígidas. Al comparar el tiempo de ruptura entre ambos sistemas al someter las perlas a agitación mecánica continua, se encontró que al utilizar el buffer de fosfatos, a las 4 horas de agitación las perlas empiezan a fragmentarse mientras que a las 24 hr se desintegran. Con el buffer de acetatos, se empiezan a fraccionar a las 72 hr y a las 96 hr empiezan a desintegrarse.

El buffer de acetatos permite obtener perlas con una resistencia mayor que con el de fosfatos por lo que se seleccionó el primero para elaborar las perlas de alginato en los experimentos posteriores.

Cinéticas de producción de lipasas. En la figura 10 se presenta el perfil de producción (a nivel matraz), de la lipasa de *R. delemar* al inocular las esporas libres e inmóviles tanto en el medio control como en el optimizado.

Figura 10. Comparación de la producción de lipasas por *R. delemar* a nivel matraz entre el medio D y el optimizado inoculando las esporas libres e inmóviles.

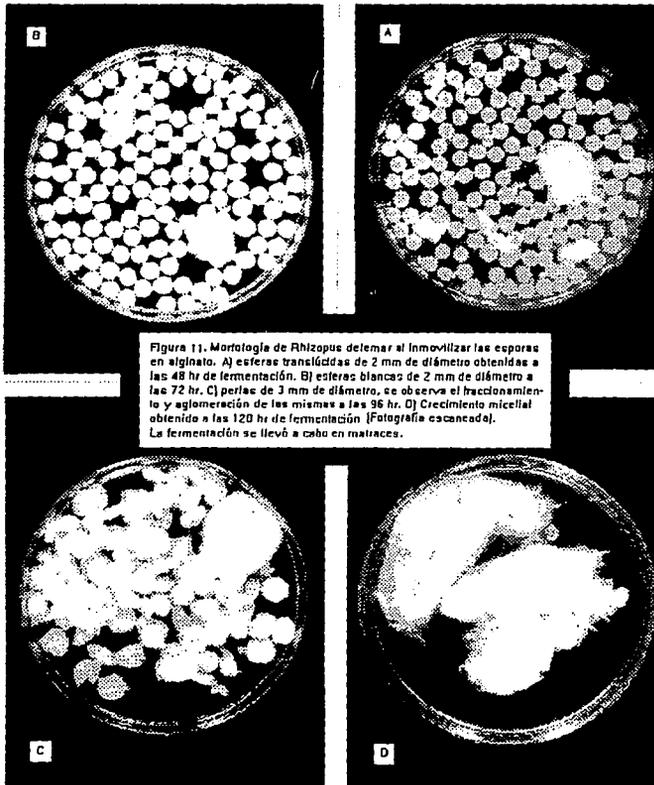


Ctr = medio D (control). Opt = medio optimizado.

Cuando se inoculan las esporas directamente en ambos medios, la máxima producción se alcanza a las 48 hr de fermentación. Al inmóvilizar las esporas, este perfil presenta un desfase que puede atribuirse a que el alginato genera una barrera permeable que ocasiona una difusión mas lenta de los nutrientes hacia las esporas atrapadas en él. En la figura 11 se presentan los cambios morfológicos que sufre *R. delemar* al inmóvilizar las esporas; de acuerdo a las figuras 10 y 11, el aumento en la producción de lipasas debe estar asociada a la formación de

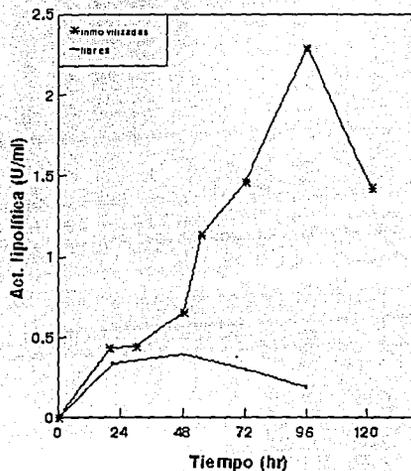
pellets ya que hasta las 96 hr el microorganismo presenta un crecimiento en forma de pellets que permite una mayor transferencia de masa en comparación al crecimiento micelial, por lo que es capaz de aprovechar mejor los nutrientes del medio de cultivo para crecer y empezar a producir la enzima, aumentando esta producción considerablemente a partir de las 72 hr. Cuando se inoculan las esporas directamente, el microorganismo crece en forma micelial desde las 24 hr (fotografía no incluida) lo cual parece repercutir en la producción de lipasas ya que la actividad lipolítica obtenida es menor en comparación con obtenida al inmovilizar las esporas. Estos resultados coinciden con Byrne (1989) quien menciona que la formación de productos en fermentaciones fúngicas puede estar influenciada por la morfología de crecimiento, de tal modo que el crecimiento micelial a menudo limita la difusión tanto de nutrientes como del oxígeno.

Los resultados anteriores mostraron que la inmovilización de esporas en gel de alginato incrementa la producción de lipasas por *R. delemar*, por lo que es una mejor alternativa para la obtención de estas enzimas a nivel fermentador que la inoculación directa de las esporas.



5.- PRODUCCIÓN DE LA LIPASA DE *R. delemar* EN FERMENTADORES INSTRUMENTADOS DE 5 l.

Figura 12. Comparación de la producción de lipasas por *R. delemar* en el reactor de 5 l entre las esporas libres y las inmovilizadas utilizando el medio D (control).

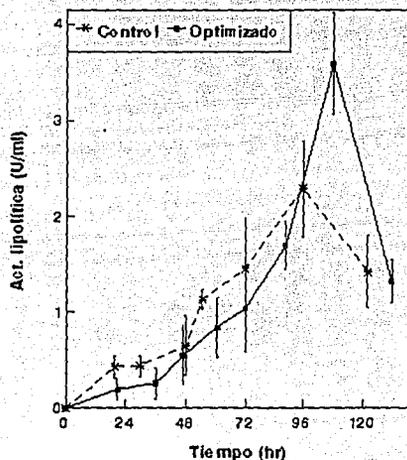


Agitación = 400 rpm. Aireación = 1 vvm.

La figura 12 muestra el perfil de producción de lipasas de *R. delemar* en el fermentador de 5 l con el medio control, entre fermentadores inoculados con las esporas libres y las inmovilizadas. Con las esporas libres se obtiene una actividad lipolítica máxima de 0.4 U/ml a las 48 hr, mientras que con las esporas inmovilizadas el perfil se desfasa obteniéndose la máxima actividad (2.3 U/ml) a las 96 hr. Como se mencionó anteriormente, este desfase puede atribuirse a la barrera que presenta el gel para la difusión de los nutrientes por lo que la producción enzimática se atrasa con respecto a las esporas libres. Sin embargo, al inmovilizar las esporas se promueve un crecimiento en forma de pellets que favorece la disponibilidad de los nutrientes ya que los problemas reológicos disminuyen y, en

consecuencia, se produce una mayor cantidad de enzima. Es así como la inmovilización permite un incremento en la actividad de 5.7 veces en relación a las esporas libres. Olsvik (1992), confirma que las propiedades reológicas en fermentaciones miceliales están determinadas por la concentración y el estado morfológico del micelio.

Figura 13. Comparación de la producción de lipasas por *R. delemar* en el reactor de 5 l entre el medio D (control) y el optimizado, inoculando las esporas inmovilizadas.



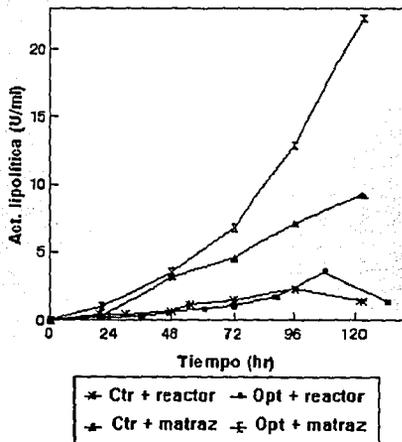
Agitación = 400 rpm. Aireación = 1 vvm.

La cinética de producción de lipasas por *R. delemar* en fermentadores instrumentados de 5 litros entre el medio control y el optimizado, utilizando esporas inmovilizadas, se observa en la figura 13. Se realizaron 3 repeticiones de los experimentos con el medio D (control) y 2 con el medio optimizado. En la figura se muestra la desviación estándar entre las repeticiones de cada condición.

La producción máxima de lipasa se obtiene prácticamente al mismo tiempo entre el medio control y el optimizado, sin embargo, la actividad es 1.7 veces mayor con el medio optimizado: la máxima actividad del control se alcanza a las 96 hr (2.4 U) mientras que con el medio optimizado se obtiene a las 101 hr (4.12 U).

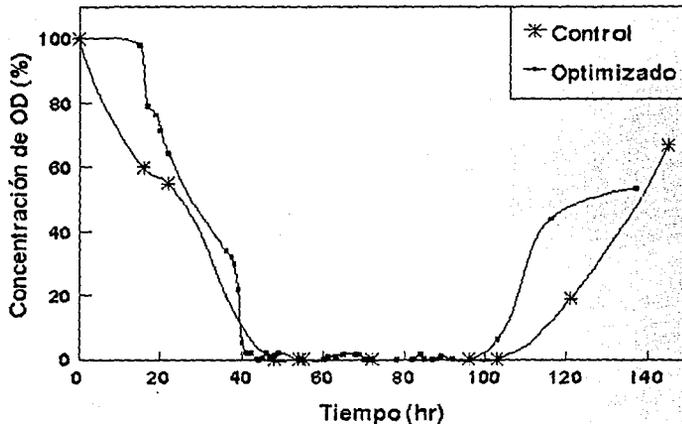
En la figura 14 se compara la producción de lipasas por *R. delemar* a nivel matraz y en el fermentador utilizando el medio control y el optimizado. Se observa que los valores de actividad lipolítica obtenidos en el fermentador no corresponden a aquellos a nivel matraz (4.8 veces más baja en relación al medio optimizado). Lo anterior no es lógico si pensamos que teóricamente debería haber una mejor transferencia de masa en un fermentador que en un matraz ya que aquel cuenta con sistemas de aireación (difusor) y agitación (impulsores) mas eficientes. Seguramente existen ciertos factores a nivel fermentador los cuales ejercen un efecto negativo en la producción de lipasas, entre los que se encuentran: a) limitación por oxígeno, b) efecto del bióxido de carbono, c) esfuerzos de corte y d) condiciones de operación no estandarizadas.

Figura 14. Comparación de la producción de lipasas por *R. delemar* a nivel matraz y en fermentador entre el medio D (control) y el optimizado.



Agitación = 400 rpm. Aireación = 1 vvm.
Se utilizaron esporas inmovilizadas.

FIGURA 15. Comparación de la Concentración de oxígeno disuelto (OD) en el reactor de 5 l entre el medio D (control) y el optimizado inoculando las esporas inmovilizadas.



Aireación = 1 vvm. Agitación = 400 rpm.

a) *Limitación por oxígeno.* Giuseppin (1984) demostró que el oxígeno es un sustrato limitante que a concentraciones bajas afecta el metabolismo de *R. delemar* (específicamente a valores de oxígeno disuelto inferiores al 30% se obtiene una producción de enzima deficiente), de hecho, la limitación de algún nutriente o del oxígeno puede causar una reducción en el crecimiento y la autólisis del pellet (Prosser, 1991). En el presente trabajo se monitoreó la concentración de oxígeno disuelto (OD) a lo largo de la fermentación. La figura 15 compara la concentración de OD en el fermentador de 5 l entre el medio D y el optimizado utilizando esporas inmovilizadas. Para el caso del medio D, se observa que desde el inicio de la fermentación la concentración de OD disminuye, tal parece ser que éste es consumido de manera inmediata por el microorganismo en crecimiento. En el caso del medio optimizado, el consumo de oxígeno empieza después de 20 hr, lo que sugiere que el crecimiento del microorganismo es más lento en un inicio que con el medio D, probablemente debido a que al contener componentes más complejos como la pasta de soya, ésta necesita ser degradada en el medio para que pueda difundirse a través del alginato y así

ser aprovechada por el microorganismo para crecer. Podría pensarse que en ambos casos el microorganismo utiliza el oxígeno para su crecimiento y reproducción, de tal modo que agota casi todo el que se encuentra disuelto en el medio llegándose a registrar concentraciones de OD de hasta un 2% (el cultivo se encontraba limitado por oxígeno) entre las 40 y las 96 hr. Al comparar las figuras 13 y 15, se observa que la producción de enzimas lipolíticas con ambos medios es baja a concentraciones mínimas de OD (antes de las 90 hr). La máxima producción de lipasas se alcanza a las 96 hr en donde la concentración de OD empieza a incrementarse hasta alcanzar posteriormente valores entre 60 y 70%. De manera similar a los resultados obtenidos por Valero (1991) con *C. rugosa*, la escasez de oxígeno en el medio de fermentación restringe la producción de lipasas.

b) *Efecto del bióxido de carbono.* La aireación es un parámetro crítico para obtener un adecuado suministro de oxígeno y así mantener las condiciones de aerobiosis y remover el exceso de bióxido de carbono durante una fermentación (Demain, 1986). En base a ello, el agotamiento del oxígeno que se llevó a cabo en el medio de cultivo para la producción de lipasas por *R. delemar* en el fermentador, repercute en un aumento en la concentración de bióxido de carbono en el mismo por lo que se puede pensar que esto influye en los bajos rendimientos de la enzima. Como menciona Villegas (1993), las presiones parciales de oxígeno y de bióxido de carbono influyen en el microambiente gaseoso que rodea al microorganismo y afectan su sistema regulatorio. Estudios realizados por Bajrachaya (1980) sugieren que ambientes gaseosos controlados pueden regular la producción de metabolitos primarios y secundarios en fermentaciones aeróbicas y ser dirigidos a un proceso de optimización de la formación de productos.

c) *Fuerzas de corte.* Las fuerzas de corte ocasionan ruptura o fragmentación del micelio y de los pellets (Prosser, 1991). En experimentos realizados anteriormente, se observó que a nivel matraz con agitación mecánica continua, a las 72 hr las perlas empezaron a fraccionarse. Las fuerzas de corte en el reactor (ocasionadas por la acción de los impulsores), son mayores que en el matraz ya que se observó que hacia las 48 hr las perlas se encontraban fraccionadas. Al fragmentarse las perlas se promueve la liberación de las esporas y por lo tanto es probable que el microorganismo empiece a crecer en forma micelial lo que ocasiona una limitación de oxígeno debido a los problemas reológicos. Después del tercer día de fermentación, se observó crecimiento micelial en las superficies internas del reactor y fijación del mismo en el impulsor y tubo de muestreo. En este punto podría pensarse que las fuerzas mecánicas provocan un daño en la célula al fraccionarla lo que ocasiona una producción de la enzima baja en comparación a la obtenida a nivel matraz.

d) *Condiciones de operación no estandarizadas.* La velocidad de aireación y de agitación tienen un efecto directo en la concentración de oxígeno disuelto en fermentaciones miceliales (Yong, 1993). En el presente trabajo solo se probó una velocidad de agitación (400 r.p.m.) y una de aireación (1 vvm) que muy probablemente no son las más adecuadas para mantener la concentración de OD y de CO₂ a los valores requeridos para una producción adecuada de lipasas.

En base a lo anterior, el oxígeno parece desempeñar un papel sumamente importante en la producción de lipasas, por lo que sería necesario llevar a cabo una serie de estudios para conocer la concentración adecuada de éste (ver posteriormente en recomendaciones y perspectivas), los cuales involucrarían desde el estudio de las condiciones operacionales (aireación y agitación), así como de la fisiología de las perlas de alginato, y estudios de regulación y secreción de estas enzimas.

CONCLUSIONES

La determinación de la actividad lipolítica de *R. delemar* se puede llevar a cabo de manera confiable mediante el método titulométrico de Nahas, ya que es una técnica sencilla de realizarse y pueden obtenerse resultados reproducibles. Por otro lado, se analizó el efecto del pH en la producción enzimática, llegando a la conclusión de que es importante regularlo a 7.0 durante el transcurso de la fermentación para aumentar la producción de lipasas por este microorganismo.

La utilización de fuentes de carbono y nitrógeno industriales (dextrina amarilla y pasta de soya respectivamente), incrementan considerablemente la producción de enzimas lipolíticas. Lo anterior representa la ventaja de la disminución en los costos de producción ya que dichos substratos son mucho más económicos que los reactivos grado laboratorio. Una vez seleccionadas los substratos industriales más adecuados, se llevaron a cabo estudios para la optimización del medio de cultivo, con lo que el diseño factorial fraccionado utilizado con este fin, permitió un incremento en la producción de 12 veces con respecto al control. La relación de las fuentes de carbono-nitrógeno es muy importante para la producción de lipasas (en este caso se encontró una relación óptima de 1:2), así como el uso de inductores y surfactantes en concentraciones bajas como el aceite de oliva (al 1%) y el Tween 80 (al 0.23%) respectivamente.

La inmovilización de esporas de *R. delemar* en alginato de sodio incrementa la producción de lipasas a nivel matraz. En este caso el microorganismo se desarrolla en forma de pellets que parecen permitir una mejor transferencia de masa en comparación al crecimiento micelial (esporas sin inmovilizar), aún cuando la producción enzimática es más lenta debido a la barrera permeable que genera el gel para la difusión de los nutrientes.

La producción de lipasas de *R. delemar* en fermentadores instrumentados de 5 l fue baja en comparación a la obtenida a nivel matraz (4.8 veces más baja en cuanto al medio optimizado). Esto se atribuye a que existen ciertos factores que inciden en el comportamiento en el reactor los cuáles son: 1) los valores de OD durante la mayor parte de la fermentación fueron muy bajos por los que parece ser que el cultivo se encontró limitado por oxígeno durante ésta, restringiendo la producción enzimática, 2) al existir baja concentración de oxígeno en el medio, la remoción de bióxido de carbono fue deficiente por lo que éste pudo haber afectado el metabolismo del microorganismo, 3) aún cuando el microorganismo fue inmovilizado, hacia el 2° día de fermentación las esferas se empezaron a fraccionar, por lo que se promovió el crecimiento micelial. Esta morfología de crecimiento dificulta la difusión de los nutrientes y genera una gran susceptibilidad del microorganismo a las fuerzas de corte lo que ocasiona lisis celular, y, en ambos casos, una disminución en la producción de la enzima y 4) únicamente se trabajó con una velocidad de agitación (400 r.p.m.) y de aireación (1 vvm), por lo que probablemente estas condiciones de operación no son las más adecuadas para la producción de lipasas por *R. delemar*.

RECOMENDACIONES Y PERSPECTIVAS

1.- En el presente trabajo no se determinó la concentración celular de *Rhizopus delemar* a lo largo de las fermentaciones, ya que el método que podía llevarse a cabo en el laboratorio (cuantificación de biomasa por peso seco), no era el adecuado en este caso, ya que el medio de cultivo industrial contiene substratos insolubles que interfieren en los resultados. Sin embargo, sería importante llevar a cabo este tipo de estudios mediante otras técnicas, ya que estos datos permitirían analizar la relación entre crecimiento, producción y consumo de oxígeno.

2.- En base a que el uso de aceite de oliva al 1% incrementa la actividad lipolítica, pueden plantearse estudios regulatorios sobre el efecto del mismo como inductor de la enzima. Por otro lado, ya que el Tween 80 en concentración baja (0.2%) aumenta la actividad, sería importante llevar a cabo estudios sobre la secreción de las enzimas lipolíticas de *R. delemar*.

3.- Al inmovilizar las esporas de *R. delemar* en alginato se aumenta la producción de lipasas, sin embargo, a nivel fermentador las perlas se fraccionan después de 70 hr. Debido a esto sería importante optimizar las condiciones para la inmovilización disminuyendo el tamaño de las perlas para aumentar el área de contacto por volumen y probando concentraciones de alginato mas bajas para mejorar la difusión de nutrientes. Podría probarse la utilización de soportes que les den mayor rigidez de tal modo que tengan una resistencia mayor a las fuerzas de corte.

4.- Las condiciones de operación del fermentador de 5 l necesitan estandarizarse para una adecuada producción de lipasas. Es necesario llevar a cabo fermentaciones en las que se varíe la velocidad de agitación no solo para homogeneizar el medio y favorecer una transferencia de masa mas eficientes, sino para minimizar el efecto negativo de las fuerzas de corte hacia las perlas de alginato. Por otro lado, se requiere hacer pruebas variando la velocidad de aireación para mantener la concentración de oxígeno disuelto en un rango que permita al microorganismo producir la enzima.

5.- Es importante estudiar mas a fondo el efecto y concentración adecuada del oxígeno para incrementar la producción de lipasas. Al respecto sería importante realizar fermentaciones en donde se mantenga la concentración de oxígeno disuelto constante a lo largo de ésta, probando valores de OD superiores al 50%. A futuro convendría pensar en realizar un escalamiento del proceso utilizando k_{la} como criterio ya que el oxígeno es un sustrato limitante en la producción de lipasas.

6.- Sería conveniente llevar a cabo fermentaciones en donde se variara la relación oxígeno-bióxido de carbono para evaluar el efecto del segundo y conocer la concentración máxima en la que no se afecta la producción de enzimas lipolíticas.

BIBLIOGRAFIA

- Adler-Nissen, Jens. Newer uses of microbial enzymes in food processing TIBTECH, 5 (6): 170-174 (1987).
- Arora, D.; Elander, R. y Mukerji, K. Handbook of Applied mycology. Vol. 4: Fungal Biotechnology. Marcel Dekker, Inc. New, york, U.S.A. (1992).
- Bajracharya, R. y Mudgett, R.E. Effects of controled gas environments in solid-substrate fermentations of rice. Biotechnol. and Bioeng. 22: 2219-2235 (1980).
- Banerjee, U.C., Effect of stirrer speed, aereation rate y cell mass concentration on volumetric oxygen transfer coefficients ($K_{sub(L)}$) in the cultivation of *Curvularia lunata* in a batch reactor. Biotechnol. Tech. 7(10): 733-738 (1993).
- Banerjee, R. y Bhattacharyya. Evolutionary operation (EVOP) to optimize three-dimensional biological experiments. Biotechnol. and Bioeng. 41: 67-71 (1993).
- Bloomer, S.; Adlercreutz, P. y Mattiasson, B. Triglyceride interesterification by lipases. I. Cocoa butter equivalents from a fraction of palm oil. JAOCS. 67 (8): 519-524 (1990).
- Borgström, B. y Brockman, H. (Eds). Lipases. Elsevier Science Publishers B.V. Netherlands, Amsterdam. (1984).
- Byrne, G. y Ward, O. Growth of *Rhizopus arrhizus* in fermentation media. J. of Industrial Microbiol. 4: 155-161 (1989).
- Celerin, E.M. y Fergus, C.L. Effects of nutrients, temperature and relative humidity on germination of the ascospores of *Chaetomium thermophile* var *coprophile*. Mycologia 63: 1030-1045 (1971).
- Cottle, W. Unraveling proteases' roles. Biotechnology 5(2): 108-110 (1987).
- Chen, J. y Yang, B. Enhancement of release of short-chain fatty acids from milk fat with immobilized microbial lipase. J. Food Sci. 57(3): 781-782 (1992).
- Christen, P. y Raimbault, M. Optimization of culture medium for aroma production by *Ceratocystis fimbriata*. Biotech. letters. 13(7): 521-526 (1991).
- Demain, A.L. y Solomon, N.A. (Eds). Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology. American Society for Microbiology. Washington, USA. 66-84 (1986).
- Ergan, F. y Trani, M. Effect of lipase specificity on triglyceride synthesis. Biotechnol. Lett. 13(1): 19-24 (1991).
- Espinosa, E.; Sánchez, S. y Farrés, A. Nutritional factors affecting lipase production by *Rhizopus delemar* CDBB H313. Biotechnol. Lett. 12(3): 209-214 (1990).
- Faith, W.T., Neubeck, C.E. y Reese, E.T. Production and Application of Enzymes. Adv. Biochem. Eng. I: 77-111 (1971).
- Fischer, K.; Puchinger, L.; Schloffer, K.; Kreiner, W. y Messner, K. Enzymatic pitch control of sulfite pulp on pilot scale. J. Biotechnol. 27(3):341-348 (1993).

Gaiger R.; Kakizono, T.; Takemoto, S.; Nishio, S. y Nagai, S. Medium optimization by an orthogonal array design for the growth of *Methanosarcina barkeri*. J. Fermentation and Bioeng. 72(1):20-25 (1991).

Giuseppin M. Effects of dissolved oxygen concentration on lipase production by *Rhizopus delemar*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 20: 161-165 (1984).

Goodfrey, T. and Reichelt, J. Industrial Enzymology. Nature Press. New York (1983).

Guan, L.; Petersen, J.N.; Johnstone, D. L.; Yonge, D.R. y Brouns, T.M. Equilibrium sorption of Cr super (6+) by a consortia of denitrifying bacteria. Biotechnol. Lett. 15(7): 727-732 (1993).

Haaland, Perry D. Experimental Design in Biotechnology. Marcel Dekker, Inc. New York, USA (1989).

Harwood, J. The versatility of lipases for industrial uses. Trends in Biochemical Sciences. 14(4): 125-126 (1989).

Ishihara, K.; Suzuki, T.; Yamane, T. y Shimizu, S. Effective production of *Pseudomonas fluorescens* lipase by semi-batch culture with turbidity dependent automatic feeding of both olive oil and iron ion. Appl. Microbiol. Biotechnol. 31: 45-48 (1989).

Kawasaki W. L. Efecto de glucosa sobre la producción de lipasas por *Rhizopus delemar* en fermentación sumergida. Tesis UNAM. Facultad de Ciencias. (1991).

Kisaalita, W., Slininger, P. y Bothast, R. Defined media for optimal pyoverdine production by *Pseudomonas fluorescens* 2-79. Appl. Microbiol. Biotechnol. 39(6): 750-755 (1993).

Kit SIGMA de diagnóstico para la determinación de lipasas mediante titulometría. Sigma Chemical Company, St. Lous, MO USA. Catálogo 1994. No de catálogo 800-A: 2222 (1984).

Klekner, Vaclav (1989). Comunicación personal.

Kolot, Frieda B. Immobilized microbial systems: principles, techniques and Industrial applications. Robert E. Krieger publishing company. Malabar, Florida (1988).

Langrand, G.; Rondot, N.; Triantaphylides, C. y Baratti, J. Short chain flavour esters synthesis by microbial lipases. Biotechnol. Lett. 12 (8): 581-586 (1990).

Lie, E.; Persson, A. y Molin, G. Screening for lipase-producing microorganisms with a continuous cultivation system. Appl. Microbiol. Biotechnol. 35: 19-20 (1991).

Malcata, F.; Hill, C. y Amundson, C. Hydrolysis of butteroil by immobilized lipase using a hollow-fiber reactor: Part II. Uniresponse kinetic studies. Biotechnol. Bioeng. 39(10): 984-1001 (1992).

Manjón, A.; Iborra, J. y Arocas, A. Short-chain flavour ester synthesis by immobilized lipase in organic media. Biotech. Lett. 13(5): 339-344 (1991).

Menassa, A. y Lamberet, G. Contribution a l'étude du système lipolytique de *Penicillium roqueforti*. Le Lait. 62: 32-43 (1982).

Mitsuda, S.; Matsuo, N. y Nabeshima, S. Preparation of (-)- Ethynyl alcohol moieties of pyrethroid insecticides by lipase-catalyzed enantioselective hydrolysis. Biosci. Biotech. Biochem. 56(2): 357-358 (1992).

Monteagudo, J.; Rincón, J.; Rodríguez, L.; Fuertes, J. y Moya, A. Determination of the best nutrient medium for the production of L-lactic acid from beet molasses. A statistical approach. *Acta Biotechnol.* 13(2): 103-110 (1993).

Moo-Young, M. *Comprehensive biotechnology. The principles of Biotechnology. Vol. 1: Scientific Fundamentals Vol. 2: Engineering considerations.* Pergamon Press. Great Britain. (1985).

Mustranta, A.; Forssell, P. y Poutanen, K. Applications of immobilized lipases to transesterification and esterification reactions in nonaqueous systems. *Enzyme Microb. Technol.* 15(2): 133-139 (1993).

Nahas, E. Control of lipase production by *Rhizopus oligosporus* under various growth conditions. *J. Gen. Microbiol.* 134: 227-233 (1988).

Nakashima, T.; Fukuda, H.; Nojima, Y. y Nagai, S. Intracellular lipase production by *Rhizopus chinensis* using biomass support particles in a circulating bed fermentor. *J. Fermentation and Bioeng.* 68(1): 19-24 (1989).

Neidelman, S. Enzymes in the food industry: a backward glance. *Food Technol.* 88-91 (1991).

Okeke, C. y Okolo, B. The effect of cultural condition on the production of lipase by *Acremonium strictum*. *Biotech. Letters* 12(10): 747-750 (1990).

Olsvik, E.S. y Kristiansen, B. Influence of oxygen tension, biomass concentration and specific growth rate on the rheological properties of a filamentous fermentation broth. *Biotech. Bioeng.* 40: 1293-1299 (1992).

Park, Yong Soo; Ohta, N. y Okabe, M. Effect of dissolved oxygen concentration and impeller tip speed on itaconic acid production by *Aspergillus terreus*. *Biotechnol. Lett.* 15(6): 583-586 (1993).

Parkinson, G. New uses are in the pipeline for enzymes. *Chemical Engin.* 30-35 (1990).

Prosser JI., Tough A. Growth mechanisms and growth kinetics of filamentous microorganisms. *Critical Rev. Biotechnol.* 10(4): 253-274 (1991).

Rees, G.; da Graca, M.; Jenta, T. y Robinson, B. Reverse enzyme synthesis in microemulsion-based organogels. *Biochem. et Biophys. Acta* 1073: 493-501 (1991).

Rivera-Muñoz, G.; Tinoco, J.; Sánchez, S. y Farrés, A. Production of microbial lipases in a solid state fermentation system. *Biotech. letters.* 13(4): 277-280 (1991).

Ruggeri, B.; Sassi, G.; Specchia, V.; Bosco, F. y Marzona, M. Alginate beads coated with polyacrylamide resin: potencial as a Biocatalyst. *Process Biochemistry.* 26: 331-335 (1991).

Stroh, William H. Trend in use of Industrial Bioprocessing enzymes for the 21st Century. *Genetic Eng. News* 14(16): 10,12 (1994).

Telefoncu, A.; Dinckaya, E. y Vorlop, K. Preparation and characterization of pancreatic lipase immobilized in Edragit-matrix. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 26(3): 311-318 (1990).

Tobalina, F. Generation of cheese flavours of fungal lipases. *International Dairy Congress. Montreal, Canada* (1990).

Valero, F.; del Rio, J.; Poch, M. y Sola, C. Fermentation behaviour of lipase production by *Candida rugosa* growing on different mixtures of glucose and olive oil. *J. of fermentation and Bioeng.* 72(5): 399-401 (1991).

Villegas, E., Aubague, L., Alcantara, L., Auria, R. y Revah, S. Solid state fermentation: acid protease production in controlled CO₂ and O₂ environments. *Biotech. Adv.* 11: 387-397 (1993).

Vorderwülbecke, T., Kieslich, K. y Erdmann, H. Comparison of lipases by different assays. *Enzyme Microb. Technol.* 14: 631-639 (1992).

Yong S.; Noriyasu, O. y Mitsuyasu Okabe. Effect of dissolved oxygen concentration and impeller tip speed on itaconic acid production by *Aspergillus terreus*. *Biotechnol. Lett.* 15(6): 583-586 (1993).

Yoshimitsu, Y.; Morohashi, N. y Hosono, K. Lipase-Mediated homotopic and heterotopic double resolutions of a planar chiral organometallic alcohol. *Biotechnol. Lett.* 13(2): 81-86 (1991).

Zamost, B.; Nielsen, H. y Starnes, R. Thermostable enzymes for industrial applications. *J. Industrial Microbiol.* 8: 71-82 (1991).

Medium Optimization by a Fractional Factorial Design for Lipase Production by *Rhizopus delemar*

PATRICIA MARTINEZ CRUZ,¹ PIERRE CHRISTEN,² AND AMELIA FARRÉS^{1*}

Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510,¹ and DRSTOM, Cicerón 609, Col. Los Morales, 11530,² México, D.F., México

Received 13 January 1993/Accepted 2 June 1993

The aim of the present work is to improve production of extracellular lipase by *Rhizopus delemar* using industrial grade carbon and nitrogen sources and performing statistical optimization of the production medium. Soya paste and dextrin were selected in the first phase of this work as the best carbon and nitrogen sources and were used in the following experiments. Optimization of the medium composition was carried out with a fractional factorial design in two steps. Lipolytic activity at 48 h was 12-fold greater than with the initial medium. The results show that it is necessary to modify the carbon source-nitrogen source ratio, to reduce olive oil concentration and to add Tween 80 to the medium to achieve maximum production.

Lipases are widely distributed enzymes that can be obtained from animals, plants and microorganisms. Their properties vary according to the source. The use of these enzymes has been constrained mainly to the food industry, the major market being flavor generation of dairy products (1, 2). Lately, transesterification and interesterification, together with the possibility of using the enzymes in organic solvents (3), have given rise to a very interesting market in the chemical synthesis sector.

One of the most widely used fungal lipases is produced by *Rhizopus delemar*. Applications include synthesis of esters (4), phospholipid acyl exchange (5), breadmaking (6), synthesis of food emulsifiers (7) and transesterification for fat modification (8); our group has used it in the development of dairy flavors. Iwai and Tsujisaka (1979) performed the first studies concerning enzyme production by this mold and detected the production of three enzymes (9).

In a previous paper (10) nutritional factors affecting enzyme production were explored to set the basis to improve enzyme production levels. Economic studies performed by this group have shown that at least a 10-fold increase in enzyme yield is necessary to consider industrial scale production of this lipase. The optimization method considered is a two level fractional factorial design (11). Some reports about the use of this method in fermentation procedures (12, 13) as well as for organic synthesis protocols are available (14). The results presented in these works show the great potential of this method to achieve optimization in a short number of experiments, allowing the test of many medium constituents.

The aim of this research is to overproduce lipase from this mold, using cheap and available industrial grade carbon and nitrogen sources.

MATERIALS AND METHODS

Organism *R. delemar* CDBB H313, utilized previously (10), obtained from CINVESTAV-IPN, Mexico, was used throughout this study. The stock culture was maintained on paraffin slants.

* Corresponding author.

Culture media Spores of *R. delemar* were produced on potato-dextrose agar in 300 ml Erlenmeyer 3 flasks for 6 d. They were collected in 1 : 1 glycerol-water mixture, till an $OD_{540} = 0.06$ was reached and then were stored at 4°C.

D growth medium was used (15) with the following composition (g/l): carbon source, 10; KNO₃, 2; MgSO₄·7H₂O, 0.5; K₂HPO₄, 1 and trace elements, 1. The composition of trace elements solution was (mg/l): ZnSO₄·7H₂O, 439.8; Fe(NO₃)₂, 723.5 and MnSO₄·4H₂O, 203.0. 10 g/l Casaminoacids (Difco, Michigan, USA) or the stated nitrogen source were used to supplement it, together with 20 g/l olive oil (10).

Fermentation conditions

Inoculum preparation The culture medium was sterilized at 121°C for 20 min and 2 ml of the previously collected spores were added to 250 ml Erlenmeyer flasks containing 50 ml of sterile culture medium.

Incubation conditions The flasks were incubated at 29°C for 2 d on a rotary shaker (150 rpm).

Enzyme preparation At the end of the incubation period the mycelium was filtered through Whatman #1 filter paper and used for enzyme activity assay. Each experiment was duplicated, except when mentioned.

Analysis Lipase activity was quantified by free fatty acid titration with NaOH 50 mM during 5 min (16). The assay mixture was modified to contain, 6 ml of substrate (a 5% tributyrin emulsion in 2.5 mM Tris-maleate buffer pH 6.0) and 4 ml of dialyzed filtrate sample (previously incubated at 37°C during 5 min). The reaction was carried out at 37°C. Lipolytic activity was expressed as μ M of free fatty acids released by ml. One unit (U) of Lipase activity was defined as the amount of enzyme releasing 1 μ M of free fatty acids in 1 min. Each enzymatic assay was duplicated.

RESULTS AND DISCUSSION

Selection of industrial nitrogen and carbon sources Industrial grade reagents were selected between different local vendors. The chosen brands are the most widely distributed in this country and are from those vendors that guarantee a better quality control. The selection of industrial grade reagents was carried out by altering the type of

TABLE 1. Industrial grade substrates used for the first selection step

Carbon sources	Purchaser	Price (US \$/ton) ^a
Glucose	Arancia	670
Yellow dextrin	Aranal S.A.	646
Amidex	Arancia	612
Glucose ^a	Merck	—
Nitrogen sources		
Sodium caseinate	Ind. de Alimentos	8225
Soya paste	Ind. de Alimentos	570
Soybean flour	Arancia	675
Yeast extract	Arancia	4000
Casaminoacids ^a	Merck	—

^a Laboratory grade substrates used as control in 1991.

nitrogen and carbon sources one at a time. Table 1 shows the different types of industrial sources tested in this study. The controls were laboratory grade reagents: glucose (Merck) as carbon source and casaminoacids (Difco) as nitrogen source.

Results illustrated in Table 2, which are the average values of fermentations performed by triplicate, show that casaminoacids (control) are the poorest nitrogen source. Lipolytic activity is significantly increased with industrial nitrogen sources (except with soybean flour), specially with sodium caseinate and soya paste, where the increments were 4.6 and 5.6-fold greater. There are no significant differences between the two higher yielding nitrogen sources. Soya paste was chosen because it is cheaper than sodium caseinate (US \$570/ton vs. U.S. \$8225/ton).

Table 2 shows that the best carbon industrial sources are dextrins, known locally as yellow dextrin and Amidex 20, where the increments in lipolytic activity were 1.5 and 1.3-fold when compared to the control. Yellow dextrin is a less soluble and less hydrolyzed dextrin than Amidex 20. These findings are similar to those reported previously (10) and might be explained by regulatory effects displayed by glucose as well as by the better growth the mold shows in dextrins, which serve as support and allow the formation of pellets. The results lead to the use of an economic carbon source (US \$646/ton). In the subsequent optimization experiments, soya paste and yellow dextrin were used as nitrogen and carbon sources.

Optimization Quantitative optimization of the medium was performed with a fractional factorial design in two steps: the first was used to determine which components have a significant effect on lipase production and the second to adjust their concentrations as well as to test

TABLE 2. Experimental results for carbon and nitrogen sources

Carbon sources	Mean activity Y_p (U/ml)	Standard deviation
Glucose	4.05	0.099
Yellow dextrin	4.94	0.317
Amidex	4.427	0.226
Glucose ^a	3.343	0.03
Nitrogen sources		
Sodium caseinate	3.004	0.575
Soya paste	3.675	0.591
Soybean flour	0.623	0.144
Yeast extract	2.418	0.492
Casaminoacids ^a	0.682	0.255

^a Same as Table 1.

TABLE 3. Eight run experimental design matrix no. 1 (ED 1)

Run	A	B	C	D	E	F	G	Y^* (U/ml)
1	—	—	—	+	+	+	—	12.52
2	+	—	—	—	—	+	+	1.51
3	—	+	—	—	+	—	+	8.77
4	+	+	—	+	—	—	—	10.74
5	—	—	+	+	—	—	+	6.39
6	+	—	+	—	+	—	—	4.05
7	—	+	+	—	—	+	—	7.87
8	+	+	+	+	+	+	+	3.84
b	-3.85	1.69	-2.85	2.82	0.67	-1.05	-3.67	

Lipolytic activity (Y^*) determined after 2 d of culture ($Y_0 = 6.96$ U/ml) and contrast coefficients (b) for each component.

the influence of another ingredient.

Experimental design no. 1 (ED 1) A 2^{7-4} experimental design was performed (17). It consists of 8 runs that allow the study of 7 parameters (see matrix in Table 3). The concentration of each constituent at level — and + is given in Table 4.

Lipolytic activity was determined for each experimental design and contrast coefficients, which allow the determination of the effect of each constituent, were calculated according to the following formula (13):

$$b_j = \frac{1}{4} \sum_{i=1}^8 A_{ij} Y_i$$

where: b_j = contrast coefficient of constituent j

A_{ij} = level of the constituent j (+ or —)

Y_i = lipolytic activity for run i in units of lipase (U/ml).

In each experimental design an average value called Y_0 was calculated.

Table 3 displays the experimental results of ED 1. According to the contrast coefficients obtained, it may be concluded that soya paste and magnesium sulphate had a positive effect on enzyme production and their initial concentration was increased in the next optimization step (see Table 5). Yellow dextrin, potassium nitrate and olive oil exhibited a negative effect on enzyme production, therefore their initial concentration was diminished. The contrast coefficient for potassium phosphate and trace elements were close to zero and their concentration was not modified.

Results show that lipolytic activity is increased by 5.9 times compared to the activity (1.19 U/ml) obtained at 48 h in the original D medium.

Experimental design no. 2 (ED 2) The number of unmodified parameters in the previous design allows the study of at least another ingredient in the second step. Therefore, a 2^{6-1} experimental design was used, which al-

TABLE 4. Experimental field for ED 1

Constituent	Concentration (g/l)	
	—	+
Yellow dextrin (A)	5	15
Soya paste (B)	5	15
KNO ₃ (C)	1	3
MgSO ₄ (D)	0.25	0.75
K ₂ HPO ₄ (E)	0.5	1.5
Trace elements		
solution (ml/h) (F)	0.5	1.5
olive oil (ml/h) (G)	10	30

TABLE 5. Eight run experimental design matrix no. 2 (ED 2)

Run	A	B	C	D	E	F	Y (U/ml)
1	-	+	-	-	-	-	12.67
2	+	-	+	+	-	-	15.96
3	-	+	+	-	+	-	13.98
4	+	+	-	+	+	-	10.96
5	+	+	+	-	-	+	14.82
6	-	-	-	+	-	+	12.11
7	+	-	-	-	+	+	15.08
8	-	+	+	+	+	+	13.19

b 1.22 -1.37 1.78 -1.08 0.59 0.41

Lipolytic activity (Y) determined after 2 d of culture ($Y_0 = 13.60$ U/ml) and contrast coefficients (b) for each component.

lows the study of 6 parameters in 8 runs (see the matrix given in Table 5); five parameters were fixed at their previous level and the new parameter tested was a surfactant, Tween 80. Previous studies demonstrated that its presence stimulates the release of the enzyme to the extracellular medium (10). The concentration of each constituent is given in Table 6.

The second experimental design allowed an increase of 100% in lipolytic activity as shown in Tables 3 and 5: $Y_0 = 13.6$ U/ml in ED 2 and $Y_0 = 7.0$ U/ml in ED 1. Contrast coefficients on Table 5 show that the concentrations of a few constituents could still be slightly modified, although the final concentrations obtained are rather close to those used in ED 2. Olive oil and Tween 80 concentrations can be maintained constant at 1 and 0.2%, respectively.

Lipase production kinetics The comparative behaviour of lipase production by *R. delmar* in an Erlenmeyer flask, using the initial D medium and optimized medium is plotted in Fig. 1. Maximum extracellular lipase production was reached after 2 d in both cases. The optimized medium allowed a 12-fold increase in enzyme production. The decrease observed after the second day can be explained by the release of proteases into the medium which probably hydrolyze the lipase.

The composition of the optimized medium is (g/l): yellow dextrin, 6; soya paste, 11; KNO_3 , 2.5; $MgSO_4$, 0.5; K_2HPO_4 , 1; trace elements, 1 ml/l; olive oil, 10 ml/l and Tween 80, 2.3 ml/l. It must be emphasized that the carbon-nitrogen source ratio is very important for lipase production, since an increase in enzyme production is obtained when it was modified from 1:1 to 1:2. Stimulation of enzyme secretion proved to be important, as the positive effect exerted by Tween 80 shows. Other secretion enhancers could be tested. On the other hand, it is necessary to reduce by half the concentration of olive oil. The reason may be that in low amounts it acts as an enzyme inducer (10 ml/l or less) but if the levels are raised it

TABLE 6. Experimental field for ED 2

Constituent	Concentration (g/l)	
	- at the level	+
Yellow dextrin (A)	4	6
Soya paste (B)	9.6	14.4
KNO_3 (C)	0.9	1.44
$MgSO_4$ (D)	0.6	0.84
Olive oil (ml/l) (E)	8	12
Tween 80 (ml/l) (F)	1.6	2.4

K_2HPO_4 and trace elements solution were maintained constant at 1 g/l and 1 ml/l respectively.

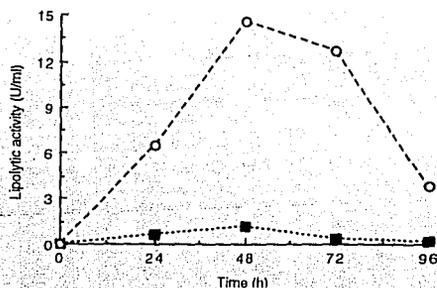


FIG. 1. Comparative kinetics of lipase production with control and optimized media. Symbols: ■, initial medium; ○, optimized medium.

interferes with oxygen transfer. This can only be proved by further experiments in instrumented fermentors.

The results obtained with this optimization procedure allowed us to achieve the original objective, that is, at least a 10-fold increase in enzyme production. Further increases could probably be obtained with the use of experimental designs that allow the study of interactions among medium constituents, as well as more profound regulatory and secretion studies.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank Dr. Gloria Soberón, Dr. Pablo Pérez Gavilán and Dr. Sergio Sánchez for helpful comments and Isabel Pérez Monfort and Pat Hayward for translation. Financial support by CONACYT P22COT894677 and IFS 1478/2, as well as CONACYT scholarship to P. Martínez is gratefully acknowledged.

REFERENCES

- Macrae, R. and Hammond, J.: Present and future applications of lipases. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, **3**, 193-217 (1985).
- Godfrey, T. and Hawkins, D.: Enzymic modification of fats for flavour. *Eur. Food Drink Review*, 25-27 (1991).
- Welsh, F., Murray, W., and Williams, R.: Microbiological and enzymatic production of flavor and fragrance chemicals. *Crit. Rev. Biotechnol.*, **9**, 105-169 (1989).
- Langrand, G., Triantaphyllides, C., and Baratti, J.: Lipase catalyzed formation of flavour esters. *Biotechnol. Lett.*, **10**, 549-554 (1988).
- Yagi, T., Nakanishi, T., Yoshizawa, Y., and Fukui, F.: The enzymatic acyl exchange of phospholipids with lipases. *J. Ferment. Bioeng.*, **69**, 23-25 (1990).
- Mohsen, S., Allan, A., Attia, R., and El Azhary, T.: Specificity of lipase produced by *Rhizopus delmar* and its utilization in bread making. *Egypt. J. Food Sci.*, **14**, 175-182 (1986).
- Nagao, A. and Kito, M.: Synthesis of *O*-acyl-L-homoserine by lipase. *JAOS*, **66**, 710-713 (1989).
- Osterberg, E., Blomstrom, A., and Holmberg, K.: Lipase catalyzed transesterification of unsaturated lipids in a microemulsion. *JAOS*, **66**, 1330-1333 (1989).
- Iwai, M. and Tsujisaka, Y.: Interconversion of two lipases from *Rhizopus delmar*. *Agric. Biol. Chem.*, **38**, 1249-1254 (1979).
- Espinoza, E., Sánchez, S., and Farrés, A.: Nutritional factors affecting lipase production by *R. delmar* CDBB313. *Biotechnol. Lett.*, **12**, 209-214 (1990).
- Pavelic, V. and Saxena, V.: Basics of statistical experiment design. *Chemical Eng.*, **6**, 175-180 (1969).
- Christen, P. and Rambault, M.: Optimization of culture me-

- dium for aroma production by *Ceratocystis fimbriata*. *Bio-technol. Lett.*, **13**, 521-526 (1991).
13. de Meo, M., Laget, M., Phan-Fan-Luu, R., Mathieu, D., and Duménil, G.: Application des plans d'expériences à l'optimisation des milieux et des conditions de culture en fermentation. *Bio. Sciences*, **4**, 99-102 (1985).
 14. Guery, C., Sagnes, R., Commeyras, A., Mathieu, D., Phan, T., and Luu, R.: Synthèse d'iodhydrines à chaîne perfluorée. I. Etude expérimentale de l'addition des iodures de perfluoroalkyle sur l'alcool allylique en présence du couple Hg_2I_2 - HgI_2 . *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **5-6**, 141-147 (1983).
 15. Celerin, E. and Fergus, C.: Effects of nutrients, temperature and relative humidity on germination of the ascospores of *Chaetomium thermophile* var *coprophile*. *Mycologia*, **63**, 1030-1045 (1971).
 16. Nahas, E.: Control of lipase production by *Rhizopus oligosporus* under various growth conditions. *J. Gen. Microbiol.*, **134**, 227-233 (1988).
 17. Box, G. E. P., Hunter, W. G., and Hunter, J. S.: Statistics for experimenters, p. 374-418, Chap. 11-12. John Wiley & Sons, USA (1978).