



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

“Unidad Iztapalapa”

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA

**"PRODUCCIÓN DE LIPASAS POR EL HONGO TERMÓFILO
Thermomyces lanuginosus EN FERMENTACIÓN EN MEDIO
SÓLIDO"**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO

DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA: M.B.NAYELI AVILA CISNEROS

Director:

Dr. Ernesto Favela Torres

Asesores:

Dr. Sergio Huerta Ochoa

Dr. Miquel Gimeno Seco

“El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001466”

Esta tesis se realizó en la Planta Piloto de Fermentación en Medio Sólido (PP4) perteneciente al Departamento de Biotecnología, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa en México, D.F., bajo la dirección del Dr. Ernesto Favela Torres. Se agradece al CONACYT por la beca otorgada para realizar los estudios de Doctorado.

México D.F. 14 de Abril de 2015

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la
Unidad Iztapalapa aprobó la tesis:

**“Producción de lipasas por el hongo termófilo *Thermomyces lanuginosus*
en Fermentación en Medio Sólido”**

que presentó:

M.B. Nayeli Ávila Cisneros

Comité tutorial:

Director de tesis: Dr. Ernesto Favela Torres

Asesor: Dr. Sergio Huerta Ochoa

Asesor: Dr. Miquel Gimeno Seco

Jurado:

Presidente: Dr. Sergio Huerta Ochoa
Universidad Autónoma Metropolitana _____

Secretario: Dr. Miquel Gimeno Seco
Universidad Nacional Autónoma de México _____

Vocal: Dra. Blanca E. Hernández Rodríguez
Universidad Autónoma Metropolitana _____

Vocal: Dra. María de los Dolores Reyes Duarte
Universidad Autónoma Metropolitana _____

A Dios, porque sé que tus tiempos son perfectos.

A mis padres, por ser la base fundamental de mi ser y mi esencia como persona.

A mis hermanas, por su gran apoyo en todo momento.

A ti Javier, por tu gran amor, tu comprensión y por ser mi cómplice durante todo este proyecto.

AGRADECIMIENTOS

- ϕ A mi casa de estudios, la Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa. (UAM-I). Planta Piloto 4 de Fermentación en Medio Sólido, por su gran contribución para mi formación académica, profesional y personal.
- ϕ Un agradecimiento especial a CONACYT por la beca otorgada para la realización de este gran trabajo de tesis, No. Becario: 203453.
- ϕ A mi director de tesis, el Dr. Ernesto Favela Torres por su conocimiento, enseñanzas, consejos y formación profesional, así como su valioso tiempo para el desarrollo de este proyecto. Además gracias por tu paciencia, amistad, comprensión y apoyo brindado en todo momento.
- ϕ A mis asesores, por su valioso tiempo, dedicación, conocimientos y paciencia para consolidar este trabajo.
- ϕ A los Doctores de la Planta Piloto 4: Sergio Huerta Ochoa, Gerardo Saucedo Castañeda, Areli Prado Barragán, Ascensión Ramírez Coronel por sus siempre atinados consejos, por su ayuda moral y profesional.
- ϕ A Susy, por siempre compartirme tu conocimiento, por tu gran amistad, y por tu apoyo incondicional para realizar de manera excelente este trabajo.
- ϕ A cada uno de mis grandes compañeros de la PP4, Rosy, Dany, Gaby, Delia, Nohemí, Isa, Luz, Susi, Dulce, Toño, Tere, Candi, Edna, Arturo, Richie, Luis, Isabel, Javier, Alex, y Francisco, por su apoyo en todo momento, cariño, por sus pláticas amenas, apoyo moral y por sus consejos para mejorar siempre este proyecto. También por ayudarme a crecer como ser humano.

RESUMEN

Los hongos filamentosos son una de las fuentes más importantes de lipasas para aplicaciones a nivel industrial, la principal razón es su capacidad para producir enzimas extracelulares, facilitando así los procesos de extracción y recuperación. Actualmente, son dos los tipos de cultivo empleados para la producción de lipasas: Fermentación en medio sólido (FMS) y Fermentación en medio líquido (FML); ambos tipos de cultivo presentan ventajas y desventajas.

En este trabajo la FMS fue utilizada como una estrategia para la producción de biocatalizadores con actividad lipasa por el hongo termófilo *Thermomyces lanuginosus* con novedosas características de estabilidad frente a la temperatura. Asimismo, se desarrolló una estrategia de producción de inóculo en medio líquido para estudios de producción de enzimas en medio sólido. Los biocatalizadores producidos por FMS fueron utilizados en una reacción de hidrólisis de aceite de sardina para la liberación de ácidos grasos omega-3 como EPA y DHA.

Este trabajo fue desarrollado en diferentes etapas, durante la primera etapa se preseleccionaron cepas potencialmente productoras de enzimas lipasas; para ello, se realizó la técnica de halos de hidrólisis con rodamina, seleccionando 11 cepas que presentaron mayores índice de potencia (I.P) y velocidad radial. Las 11 cepas preseleccionadas fueron posteriormente evaluadas en FMS. Los resultados obtenidos en cultivo sólido permitieron conocer la cantidad de actividad lipasa producida (10 y 13 U/gms) por ambas cepas T110 y T5S, de esta forma únicamente éstas 2 cepas de *Thermomyces lanuginosus* fueron seleccionadas.

La segunda etapa de este trabajo consistió en diseñar una estrategia de producción de inóculo en medio líquido a través de la producción de pre inóculo en cultivo superficial y estandarización de parámetros como: producción de biomasa, pH y actividad. Además, se evaluó el poder amortiguador del medio de cultivo y la relación C/N. En cultivo líquido, la biomasa producida por ambas cepas fue cercana 15 g/L después de 48 h de cultivo, y se mantuvo constante hacia el final (120 h).

Finalmente, bajo las condiciones establecidas los biocatalizadores producidos en FMS presentaron altos niveles de actividad lipasa (22 U/gms y 25 U/gms) para las cepas T110 y T5S, respectivamente usando como sustrato para la actividad enzimática ésteres de *p*-nitrofenol-octanoato. Al medir la actividad lipasa con trioctanoína se obtuvieron valores de actividad cercanos a las 120 U/gms después de 72 h de cultivo en los extractos líquidos producidos por ambas cepas, permaneciendo constante hasta el final del cultivo (120 h). Los biocatalizadores mostraron una temperatura óptima de actividad de 60 °C a 85 °C a pH 10, y una estabilidad a 60 °C durante tiempos de exposición de 4 h. Se obtuvieron valores de energías de activación (27.3 y 22.7 KJ/mol) y desactivación (11.0 KJ/mol y 6.7 KJ/mol) para las cepas T110 y T5S respectivamente.

El biocatalizador producido por la cepa *T. lanuginosus* T5S fue empleado en una reacción de hidrólisis de aceite de sardina para la liberación selectiva de los ácidos grasos poliinsaturados omega-3 EPA y DHA (ácido eicosapentanoico y docosahexanoico), con alto valor comercial. La relación de selectividad EPA/DHA obtenida fue 16.6 la cual fue superior a otras preparaciones comerciales de *T. lanuginosus* y de otros microorganismos, indicando la importancia del biocatalizador producido para este tipo de reacciones en cultivo en medio sólido.

ABSTRACT

Filamentous fungi are one of the most important lipase sources for industrial applications; the main reason is the capacity of these microorganisms to produce extracellular enzymes, improvement the process of extraction and recovered of enzyme. Usually, there are two types of cultures employed for the production of lipases; Solid State Fermentation (SSF) and Liquid Culture (LC), which both present advantages and disadvantages.

In this work, the SSF was strategically employed for the production of biocatalysts with lipase activity by *Thermomyces lanuginosus*, with novel characteristics such as stability versus temperature. The biocatalysts produced by SSF were used in a hydrolysis reaction of sardine oil for the released of the omega-3 polyunsaturated fatty acids EPA and DHA.

This study was carried out in several stages; during the first stage 11 lipase production strains were preselected using the methodology of formation of halos of hydrolysis with rhodamine. The strains selected presented high indices and radial velocity. The titles of activity obtained were 10 and 13 U/ dgm for the strains *T. lanuginosus* T110 y T5S, which were selected for further experiments.

A previous step based on the production of inoculums in liquid culture was conducted; the strains were growth in Petri dishes with cellophane disc for the production of preinoculum measuring biomass, pH and activity. In liquid culture the produced biomass by both strains was nearly 15g/L at 48 h of culture and maintained at the end (120 h). Furthermore a good mycelium was produced by adjusting the components of medium of cultures such as the C/N ratio by adding $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$ Buffer.

Activities of 22 U/dgm and 25 U/dgm were obtained employing *p*-NPO substrate. In the case of triglycerides, 120U/dgm was reported after 72 h of culture. During the characterization of the biocatalyst an optimal T of 60 °C and 85 °C were ascertained, the studies of stability showed that to temperature of 60 °C both extract were stable during 4 h of incubation. The calculated Ea and Ed values were (27.3 KJ/mol 22.7 KJ/mol) and (11.0 KJ/mol 6.7 KJ/mol) for T110 y T5S, respectively.

The biocatalyst produced by *T. lanuginosus* T5S was used in a reaction of hydrolysis of sardine oil to selectively release EPA and DHA. The attained EPA/ DHA ratio of 16.6, released by the biocatalyst, was higher than that obtained with other commercial preparations of *T. lanuginosus* and other microorganism, which pointed out the importance of our biocatalyst produced by Solid culture for this reaction.

ÍNDICE GENERAL

| | |
|--|----|
| 1.- Revisión bibliográfica | 1 |
| 1.1 Generalidades de las lipasas..... | 2 |
| 1.1.1 Características catalíticas de las lipasas | 3 |
| 1.1.2 Mecanismo de reacción | 3 |
| 1.1.3 Reacciones catalizadas por las lipasas..... | 4 |
| 1.2 Aplicaciones de las lipasas..... | 5 |
| 1.2.1 Industria de los alimentos | 5 |
| 1.2.2 Industria de los detergentes | 7 |
| 1.2.3 Industria farmacéutica | 8 |
| 1.3 Fuentes naturales de las lipasas | 8 |
| 1.3.1 Hongos termófilos..... | 9 |
| 1.4 Lipasas comerciales | 10 |
| 1.5 Producción de lipasas..... | 13 |
| 1.5.1 Producción de lipasas por FMS | 13 |
| 1.6 Producción de lipasas termoestables..... | 16 |
| 1.7 <i>Thermomyces lanuginosus</i> | 17 |
| 1.8 Usos y aplicaciones de la lipasa producida por <i>T. lanuginosus</i> | 18 |
| 1.8.1 Modificación de aceites y grasas..... | 18 |
| 1.8.2 Hidrólisis de aceites y grasas | 19 |
| 1.8.3 Otros usos de <i>T. lanuginosus</i> | 19 |
| 1.9 Inmovilización de lipasas (TLL)..... | 19 |
| 2. Justificación | 22 |
| 3. Hipótesis | 24 |
| 4. Objetivos..... | 26 |
| 4.1 Objetivo general..... | 27 |

| | |
|---|----|
| 4.2 Objetivos específicos | 28 |
| 5. Materiales y Métodos | 29 |
| 5.1 Microorganismos | 30 |
| 5.2 Reactivos..... | 30 |
| 5.3 Medios de cultivo..... | 30 |
| 5.3.1 Propagación y mantenimiento de cepas | 30 |
| 5.3.2 Propagación de las cepas en medio ADS,EMA y MP | 31 |
| 5.3.3 Producción de inóculo en medio líquido..... | 31 |
| 5.3.4 Medio de cultivo para la producción de enzima | 31 |
| 5.4 Pre tratamiento del soporte | 32 |
| 5.5 Preparación de la FMS..... | 32 |
| 5.6 Medio de producción de CO ₂ | 32 |
| 5.7 Estudios isotérmicos | 33 |
| 5.8 Efecto de la temperatura en estudios de termoactividad y termoestabilidad por FMS | 33 |
| 5.9 Efecto del pH en la actividad y estabilidad de biocatalizadores producidos por FMS | 33 |
| 5.10 Obtención del biocatalizador | 34 |
| 5.11 Inmovilización de la enzima producida por <i>T. lanuginosus</i> | 34 |
| 5.12 Hidrólisis de aceite de sardina | 34 |
| 6. Métodos analíticos..... | 35 |
| 6.1 Medición de actividad lipasa | 35 |
| 6.1.1 Cuantificación de actividad lipasa en caja Petri..... | 35 |
| 6.1.2 Método espectrofotométricos..... | 35 |
| 6.1.3 Método titulométrico..... | 36 |
| 6.2 Cuantificación de la humedad..... | 36 |

| | |
|--|----|
| 6.3 Medición del pH | 36 |
| 6.4 Medición de acilespecificidad de los biocatalizadores producidos por FMS | 37 |
| 6.5 Análisis de producción de EPA y DHA en HPLC-UV..... | 37 |
| 7. Selección de la cepa..... | 38 |
| 7.1 Microorganismos | 39 |
| 7.2 Velocidad radial de crecimiento | 39 |
| 7.3 Determinación de actividad lipasa en cultivo superficial | 41 |
| 7.4 Selección de cepas termófilas | 43 |
| 7.5 Producción de lipasas en cultivo sólido..... | 44 |
| 8. Producción de inóculo en medio líquido | 47 |
| 8.1 Producción de inóculo en medio líquido | 48 |
| 8.2 Producción de pre inóculo | 48 |
| 8.3 Cinéticas de producción de inóculo en medio líquido..... | 52 |
| 9. Producción de biocatalizadores por las cepas termófilas T110 y T5S | 56 |
| 9.1 Producción de biocatalizadores por FMS | 57 |
| 9.2 Efecto del tamaño de inóculo..... | 57 |
| 9.3 Estudios del efecto del pH _i en la producción de los biocatalizadores | 60 |
| 9.3.1 Determinación de la carga bacteriana en cultivo sólido a diferentes pH | 61 |
| 9.3.2 Efecto del pH _i en los parámetros cinéticos por FMS..... | 62 |
| 9.4 Cinética de producción de CO ₂ y lipasas | 63 |
| 9.5 Efecto de la temperatura sobre la producción de CO ₂ y lipasas | 66 |
| 9.5.1 Actividad enzimática..... | 66 |
| 9.6 Efecto de inhibidor de proteasas | 67 |
| 10. Caracterización de los biocatalizadores producidos por las cepas T110 y T5S | 69 |
| 10.1 Caracterización de los biocatalizadores | 70 |

| | |
|--|-----|
| 10.2 Estudios de termoactividad | 70 |
| 10.3 Estudios de termoestabilidad | 73 |
| 10.4 Estudios de acilespecificidad | 78 |
| 11. Selección y aplicación de una reacción de hidrólisis de aceite de sardina por la cepa termófila T5S..... | 80 |
| 11.1 Reacciones de hidrólisis catalizadas por las lipasas | 81 |
| 11.1.1 Hidrólisis de aceite de sardina | 81 |
| 12. Conclusiones..... | 85 |
| 13. Bibliografía..... | 88 |
| Anexo A: Pre tratamiento y tamizado del soporte..... | 100 |
| Anexo B: Secuenciación de las cepas <i>T.lanuginosus</i> | 101 |
| Anexo C: Estandarización de inóculo en medio líquido | 103 |
| Anexo D: Curva estándar de <i>p</i> -nitrofenol..... | 109 |
| Anexo E: Cálculos de actividad enzimática | 110 |
| Anexo F: Cálculos de energía de activación y desactivación (E_a , E_d) | 111 |
| Anexo G: Resultados de análisis estadísticos..... | 112 |

INDICE DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

| Parámetro | Significado | Abreviaturas |
|---------------------------|---------------------------------------|--|
| FMS | Fermentación en Medio Sólido | U/ gms |
| FML | Fermentación en Medio Líquido | U/ mL |
| I.P | Índice de Potencia | Adimensional |
| Vr | Velocidad radial | cm/ día |
| U/ gms | Actividad enzimática | Unidades de actividad por gramo de materia seca |
| E _a | Energía de activación | KJ/mol |
| E _d | Energía de desactivación | KJ/mol |
| U/dgm | Actividad enzimática | Units per gram of dry matter |
| PUFAs | Ácidos grasos polinsaturados | Adimensional |
| EPA | Ácido eicosapentanoico | Adimensional |
| DHA | Ácido docosahexanoico | Adimensional |
| mgCO ₂ /gmsi.h | Tasa de producción de CO ₂ | Miligramos de CO ₂ por gramo de materia seca inicial por hora |
| mgCO ₂ /gmsi | Máxima producción de CO ₂ | Miligramos de CO ₂ por grama de materia seca inicial |
| μ | Tasa específica de crecimiento | 1/h |

Capítulo 1

Revisión Bibliográfica

1. Introducción

En este capítulo se presentan los aspectos más importantes de las lipasas; en particular aquellas producidas por microorganismos. Se describen con detalle algunas características de *Thermomyces lanuginosus*, un hongo termófilo cuyo estudio ha sido enfatizado, debido a la producción novedosa de algunas enzimas termoestables como las lipasas. Asimismo, son descritos los diferentes procesos de producción de enzimas para su aplicación en sectores industriales y en la síntesis de algunas biomoléculas con alto valor agregado.

1.1 Generalidades de las lipasas

Las enzimas, también conocidas como catalizadores biológicos, han alcanzado altos niveles de producción y aplicación en diversas áreas; tales como la industria de químicos finos, industria farmacéutica, industria de los alimentos, modificación o producción de energía como el biodiesel o bioetanol (Rodríguez y col., 2013) entre otras. Las hidrolasas, particularmente las lipasas, representan los biocatalizadores más importantes a nivel industrial, debido a su capacidad para hidrolizar un amplia gama de sustratos y participar en diversas reacciones de hidrólisis y síntesis; su estabilidad a temperaturas elevadas, su alta quimio, regio y enantioselectividad, así como su capacidad para funcionar en ausencia de cofactores (Stepankova, 2011).

Las lipasas (triacilglicerol acil hidrolasas, EC. 3.1.1.3) son parte de la familia de las hidrolasas que actúan sobre los enlaces éster. El papel fisiológico de las lipasas es hidrolizar triglicéridos en diglicéridos, mono glicéridos, ácidos grasos y glicerol (Houde y col., 2004). Sin embargo, en ambientes donde la cantidad de agua es restringida, las lipasas pueden actuar en dirección inversa es decir; catalizando reacciones de esterificación y transesterificación (Fig. 1.1) empleando como ambiente de reacción solventes orgánicos hidrofóbicos.

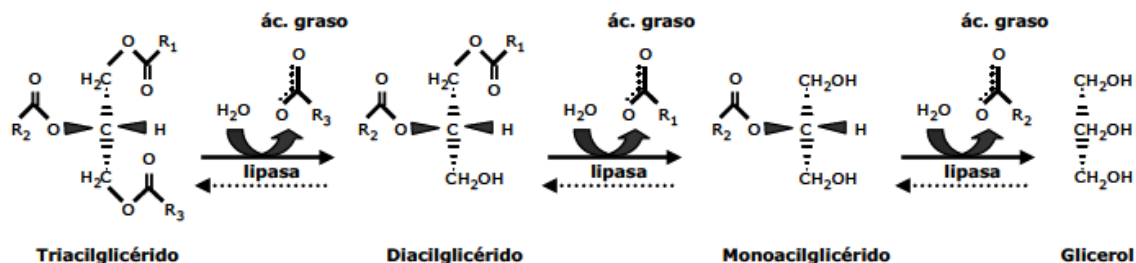


Figura 1.1 Hidrólisis y síntesis de ésteres con lipasas

1.1.1 Características catalíticas de las lipasas

Entre las características generales de las lipasas se encuentra su tamaño, las lipasas microbianas presentan un peso aproximado entre los 20–60 kDa, pertenecen a las proteínas de la familia α/β hidrolasas, con una hoja β central que contiene en el sitio activo una serina (Ser) colocada en un bucle del sitio catalítico (Mala y Takeuchi, 2008). La distinción entre las lipasas y esterases ha sido basada durante un largo tiempo en el fenómeno de activación interfacial, y la presencia de una tapa o "lid". La activación interfacial se define como un fuerte aumento de la actividad lipasa, observada en presencia de una interfase, cuando el sustrato se encuentra en forma de emulsión, lo que hace posible que la tapa o "lid", que es una superficie anfifílica que cubre el sitio activo de la lipasa, se active para acelerar la velocidad de la reacción (Houde y col., 2004). Sin embargo, a pesar de esta distinción, las lipasas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida antarctica* isoenzima B, y *Burkholderia glumae* no muestran ninguna activación interfacial debido a que no poseen una tapa o "lid".

Por lo tanto, dichos criterios no son suficientes para determinar una verdadera lipasa, y únicamente puede ser definida como una carboxilesterasa que cataliza la hidrólisis y la síntesis de ésteres de cadena larga (10 átomos de carbono) como lo reportan algunos autores (Jaeger y col., 1998). Otro aspecto importante radica en la presencia de una triada catalítica en el sitio activo formada por aminoácidos tales como: Ser-His-Asp/Glu similar a la que presentan el grupo de las serin proteasas (Sandana y col., 2008).

1.1.2 Mecanismo de reacción

El mecanismo de reacción de las lipasas se basa en un sistema de intercambio de cargas que consta de 4 etapas. Tras el reconocimiento del sustrato, se produce el ataque nucleofílico por parte del grupo hidroxilo de la serina catalítica sobre el átomo de carbono del carbonilo en el enlace éster del lípido, lo que lleva a la formación de un intermediario tetraédrico entre el ácido graso y la serina nucleofílica. Posteriormente, se libera el alcohol para dar lugar al intermedio acil-enzima que es la etapa determinante de la reacción y se produce un segundo ataque nucleofílico por parte de una molécula de agua que ataca al intermedio acil enzima, lo que produce la liberación del ácido graso y la regeneración del sitio activo.

1.1.3 Reacciones catalizadas por lipasas

Las lipasas son biocatalizadores muy versátiles. Además de su actividad hidrolítica sobre triglicéridos, también pueden catalizar reacciones de esterificación, interesterificación, acidólisis, alcoholólisis y aminólisis (Fig. 1.2). Muchas lipasas son regio selectivas y actúan preferencialmente sobre enlaces ésteres en posiciones *sn*-1 y *sn*-3. Sin embargo, pocas lipasas actúan en la posición *sn*-2. Además, entre las ventajas más importantes de estas enzimas podrían mencionarse las siguientes: 1) son estables en solventes orgánicos preferentemente no polares (ciclohexano, hexano, tolueno, heptano etc.); 2) no requieren de cofactores, lo cual hace su empleo más sencillo y económico; 3) poseen una amplia especificidad de sustrato y 4) muestran una elevada enantioselectividad (Hernández-Rodríguez y col., 2009 ; Elibol y Ozer, 2000; Bornscheuer y col., 2002; Pandey y col., 1999; Gunstone y col., 1999).

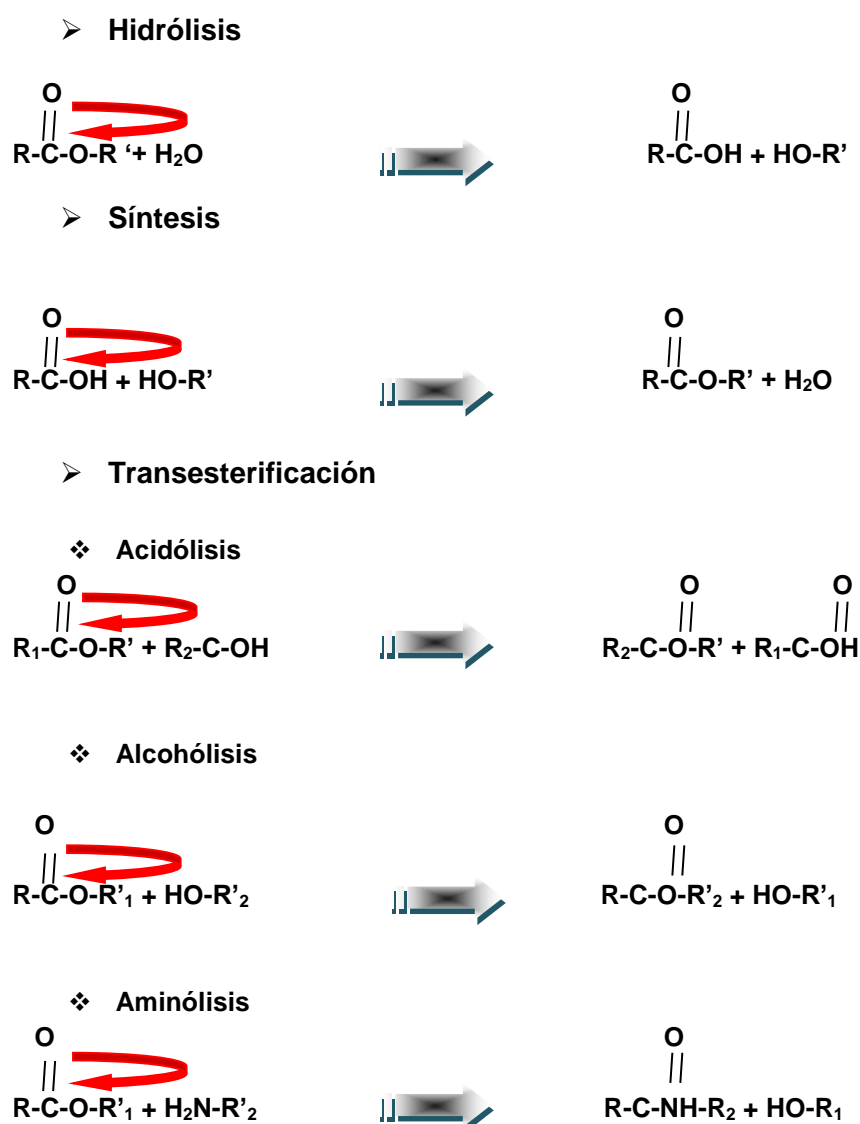


Figura.1.2 Reacciones catalizadas por lipasas

1.2 Aplicaciones de las lipasas

Las lipasas son enzimas producidas por animales vertebrados e invertebrados, plantas, bacterias y hongos. Sin embargo, la investigación sobre la producción de lipasas de origen microbiano se ha incrementado por su gran potencial comercial. Las lipasas son biocatalizadores muy interesantes y utilizados en las industrias de alimentos, detergentes, farmacéutico, cosméticos, industria textil, y de papel. Las aplicaciones más significativas de dichas enzimas están en la industria de alimentos, detergentes y el sector farmacéutico. Por su versatilidad catalítica, las lipasas son altamente interesantes en nuevas aplicaciones biotecnológicas; así como, en aplicaciones que contribuyen a mejorar y/o remediar el medio ambiente. Por ello, existe un creciente interés en la búsqueda y estudio de enzimas con características de estabilidad ante diferentes condiciones de proceso. En la tabla 1.1 se presentan algunas de las principales aplicaciones de las lipasas.

Tabla 1.1 Aplicaciones industriales de las lipasas

| Industria | Usos | Productos/ Aplicación |
|--------------------------------|--------------------------------------|--|
| Detergentes | Hidrólisis de grasas | Remoción de los aceites de fábricas |
| Lácteos | Hidrólisis de grasa de leche y queso | Desarrollo de agentes saborizantes en leche, queso y mantequilla |
| Panadería | Mejoramiento sabores | Prolongación de la vida de anaquel |
| Bebidas | Mejoramiento de aromas | Bebidas |
| Aderezos | Mejoramiento de la calidad | Mayonesas y aderezos |
| Alimentos saludables | Transesterificación | Alimentos saludables funcionales y/o nutraceúticos |
| Carne y pescado | Desarrollo de sabores | Remoción de la grasa |
| Ácidos grasos y aceites | Transesterificación: hidrólisis | Margarinas y ácidos grasos |
| Químicos | Síntesis, enantioselectividad | Construcción de químicos quirales |
| Farmacéuticos | Transesterificación, hidrólisis | Digestivos |
| Cosméticos | Reacciones de síntesis | Emulsificador y mezcladores |
| Piel | Reacciones de hidrólisis | Productos de piel |
| Papel | Reacciones de hidrólisis | Mejoramiento de la calidad del papel |
| Limpieza | Reacciones de hidrólisis | Remoción de grasas |

1.2.1 Industria de los alimentos

a) Formulaciones infantiles

Las formulaciones infantiles ofrecen una buena alternativa para la mejora e idealmente, imitación de la leche humana. Los lípidos presentes en la leche representan la principal fuente de energía en la leche humana y proveen moléculas necesarias para la estructura de la membrana celular.

La mayoría de los triglicéridos presentes en la leche presentan insaturaciones en las posiciones *sn*-1,3 y saturaciones en posiciones *sn*-2. Durante la digestión de los alimentos la colesterol esterasa, también conocida como la lipasa pancreática hidroliza específicamente el ácido graso colocado en posiciones *sn*-1,3 produciendo un monoacilglicerol con ácido palmítico en posiciones *sn*-2, los cuales son más fácilmente absorbidos que el ácido palmítico libre, ocasionando que en presencia de calcio se formen jabones que causan constipación en los infantes. Ejemplo de este tipo de formulaciones destacan: Betapol™ (Loders Croklaan) el primer producto comercial empleado en formulas infantiles (Houde y col., 2004).

b) Lípidos estructurados

Con base en su grado de insaturación, los ácidos grasos se dividen en tres categorías: saturados, mono insaturados y poli-insaturados. Las grasas saturadas, tales como la mantequilla y manteca de cerdo son de origen animal, sin embargo también pueden ser encontradas en grasas vegetales: aceite de coco y aceite de palma. La mayoría de las grasas saturadas se encuentran en forma sólida a temperatura ambiente. Ácidos grasos mono insaturados están presentes en aceites de oliva y canola, y en otros aceites de origen vegetal. Éstos se encuentran generalmente en forma líquida a temperatura ambiente y son usados para freír. En el caso de ácidos grasos poli insaturados encontrados en aceites vegetales y animales, incluyendo aceite de girasol, cártamo, soya, maíz, y pescado, que se encuentran en forma líquida a temperatura ambiente y son considerados como saludables ya que contribuyen a la disminución de los niveles de colesterol y ayudan a prevenir enfermedades de tipo coronarios (Osborn y Akoh, 2002). Los lípidos estructurados son grasas o aceites modificados y modelados para ser más nutritivos, con funciones específicas y con propiedades físicas que los hacen más importantes para su aplicación en la industria de los alimentos. Estas modificaciones incluyen cambios en el contenido y en la posición del ácido graso unido a la molécula de glicerol, así como en la longitud del ácido graso. Incluso, los lípidos estructurados son más efectivos y pueden convertir ácidos grasos en moléculas nutritivas y útiles para propósitos terapéuticos usando lipasas en reacciones de interesterificación y acidólisis.

Una característica importante, durante la producción de lípidos estructurados es la solidez de la grasa, una grasa sólida contiene entre 15-35% de grasas plásticas que se caracterizan por ser producidas enzimática o químicamente. En el caso del proceso enzimático diversas ventajas se presentan; no existe modificación de las propiedades químicas de la grasa original por interesterificación, los ácidos grasos presentan niveles de insaturación y no existen isomerizaciones *cis-trans*. Un ejemplo de lípidos estructurados es el Econa®, un aceite producido enzimáticamente a partir de aceites naturales que contiene 80% de diacilglicerol (DGA) (Houde y col., 2004).

c) Alimentos reducidos en grasa

Las grasas presentan un alto contenido calórico; sin embargo, ahora existen productos con bajo contenido energético que involucran el uso de las lipasas. Akoh y Yee (1997) reportan la producción de lípidos bajos en calorías mediante una reacción de interesterificación, a partir de triestearina (C18) con tricarpina o tricaprilina utilizando una lipasa inmovilizada. Otro ejemplo importante es la manteca de cacao, que es una mezcla de aceites y grasas con triglicéridos ricos en ácido palmítico, ácido esteárico, y ácido oleico. Además, el aceite de cacao tiene un alto valor comercial en la industria de la confitería, en particular de chocolate, debido a propiedades tales como: brillo, encaje, temperatura de fusión y resistencia (Houde y col., 2004).

d) Maduración de quesos

Otras de las aplicaciones importantes de las lipasas en la industria de alimentos es la maduración de quesos, que consiste esencialmente en la proteólisis y lipólisis en la leche etapas previas a la maduración de quesos. La importancia de estas enzimas radica entonces en el empleo para el proceso de aceleración en la maduración; sin embargo una adición excesiva provoca daños en la textura y sabor (Kheadr y col., 2002; Kheadr y col., 2003).

1.2.2 Industria de los detergentes

El uso de lipasas en la industria de los detergentes representa una de las principales aplicaciones de estas enzimas. En 1995 las enzimas usadas en detergentes representaban el 30% del mercado total de enzimas estimadas en los 30 millones dólares. En el año 2000, este mercado alcanzó hasta los US\$ 1.5 billones. Novozymes, formalmente Novo Nordisk, introdujo al mercado el producto Lipolase® en 1988, la primera lipasa comercial desarrollada para la industria de los detergentes. Lipolase® tiene un pH óptimo de 10.5-11.0; es activa en un amplio rango de temperaturas, con un óptimo a 40 °C; es estable en soluciones proteolíticas de lavado, muestra estabilidad ante la oxidación y es estable a muchos otros ingredientes de los detergentes incluyendo surfactantes. Estas enzimas, son mundialmente usadas en la formulación de detergentes para remover residuos de grasas. Además, Lipolase® tiene un amplio rango de especificidad ante el sustrato, formando parte de las enzimas empleadas en los detergentes a nivel mundial, incluyendo 3 variedades más como: Lipolase® Ultra, LipoPrime™ y Lipex (Houde y col., 2004).

1.2.3 Industria farmacéutica

La capacidad de las lipasas para resolver mezclas racémicas para la síntesis de un único enantiómero procedente de una mezcla racémica, representa uno de los más grandes negocios para la industria farmacéutica, considerando que sólo un enantiómero es responsable del efecto terapéutico deseado. Un ejemplo de este tipo de productos es el Taxol® (Paclitaxel) que genera anualmente alrededor de un billón de dólares USA en ventas (Houde y col., 2004).

1.3 Fuentes naturales de lipasas

Las lipasas están distribuidas en todas partes. Se encuentran de manera abundante en la flora microbiana que comprende hongos, bacterias y levaduras, así como algunos actinomicetos (Pandey, 1999; Salihu y col., 2012) que son reconocidos como fuentes de lipasas extracelulares. Las lipasas se encuentran presentes en el páncreas de algunos mamíferos como es el caso de cerdos y humanos, incluso se ha llegado a la caracterización bioquímica de algunas lipasas producidas por especies como *Mugil cephalus* (salmón gris) y la lipasa pancreática de avestruz (Alberta y col., 2007; Bacha y col., 2005).

Asimismo, lipasas vegetales como las procedentes de plantas como frijol de ricino (*Ricinus communis*) y semilla de colza (*Brassica napus*) han encontrado diversas aplicaciones. Tal es el caso de la lipasa aislada de látex de papaya, *Carica papaya* (Son y Shau-Wei, 2005) en la elaboración de un antiinflamatorio (S-Naproxeno) con importantes beneficios en farmacéutica.

Sin embargo, en el campo de la biotecnología ha sido mucha la atención puesta en las lipasas de origen microbiano. Esto es evidente si observamos la tabla 1.2, en la que se presentan diversos microorganismos (bacterias, hongos y levaduras) productores de enzimas con alto potencial industrial. Dentro de las lipasas microbianas más citadas, destacan las producidas por levaduras, por su alta actividad en reacciones de hidrólisis y síntesis. Las lipasas de *Candida* sp. son las más reportadas en la literatura. Una compañía japonesa ha utilizado a *C. rugosa* para la producción de ácidos grasos de aceite de castor desde de 1985 (Macrae y Hammond, 1985). Otras levaduras reportadas como potenciales productoras de lipasas incluyen a *Trichosporon asahii* (Kumar y Gupta, 2008), *Candida cylindracea* (Kim y Hou, 2006), *Aureobasidium pullulans* (Liu y col., 2006), *Saccharomyces cerevisiae* (Ciafardini y col., 2006) y *Yarrowia lipolytica* (Domínguez y col., 2003).

Asimismo, en los últimos años se ha trabajado en la obtención de lipasas por especies bacterianas, entre las que se mencionan: *Bacillus brevis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus* sp. RSJ-1, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans* ID-1, *Pyrobaculum calidifontis*, *Pyrococcus horikoshii* (Haki y Rakshit, 2003) y *Thermus thermophilus* HB27 (Fuciños y col., 2005), ésta última presenta una estabilidad mayor a los 85 °C.

En el caso de algunas lipasas de origen fúngico, han sido mencionadas especies como *Aspergillus fumigatus* (Córdova y col., 1998; Córdova y col., 2003), *Rhizopus oryzae* (Comeau y col. 1998; Hiol y col., 2000), *Rhizopus rhizopodiformis* (Samad y col., 1998) y *Rhizopus homothallicus* (Mateos y col., 2006), por citar algunos ejemplos.

1.3.1 Hongos termófilos

Entre los organismos eucarióticos, sólo pocas especies de hongos tienen la capacidad para crecer a temperaturas entre 45 °C y 55 °C. La termofilia y termotolerancia son distinguidas con base en temperaturas mínima y máxima de crecimiento (Maheswary y col., 2000). Los hongos termofílicos presentan una temperatura de crecimiento mínima o superior de 20 °C, y temperatura máxima de crecimiento superior a los 50 °C. Las formas termotolerantes tienen un rango de temperatura de crecimiento menor a los 20 °C y menor a 50 °C.

La termofilia en hongos no es tan extrema como en arqueas y bacterias, algunas especies son capaces de crecer a temperaturas superiores a 100 °C, procedentes de agua termales, sulfatadas, campos o respiraderos hidrotermales (Cooney y Emerson, 1964). Inclusive el término "termófilo" es usado de forma general para organismos capaces de crecer de manera óptima a temperaturas superiores a 37 °C, algunos autores han reportado de manera arbitraria un rango de temperatura óptima ($T_{\text{ópt}}$) para definir a los microorganismos termófilos. Termófilos $T_{\text{ópt}}$ 50 °C, termófilos extremos $T_{\text{ópt}}$ 60 °C e hiper termófilos $T_{\text{ópt}}$ 80 °C.

Por otra parte, los hongos han recibido poca atención, considerando que la gran mayoría de los eucariotas no pueden sobrevivir a la exposición prolongada a temperaturas superiores de 40 a 45 °C (Alexandro, 1977). Sin embargo, algunos autores han reportado la capacidad de 30 especies de aproximadamente 50,000 de hongos registrados, que son capaces de crecer a temperaturas de 60-62 °C. En la siguiente tabla 1.2 se muestran algunos ejemplos de microorganismos termófilos.

Tabla 1.2. Microorganismos productores de lipasas

| Recurso | Género | Especie | Termófilo/ Termotolerante | Referencia | |
|------------------|----------------------|-------------------------------|------------------------------|--------------------------------------|------------------------|
| Bacterias | <i>Bacillus</i> | <i>B. megaterium</i> | Termófilo | Godtfredsen, 1990 | |
| | | <i>Bacillus</i> sp. J 33 | Termófilo | Nawani y Kaur, 2000 | |
| | | <i>B. stearothermophilus</i> | Termófilo | Kumar y Nussinov, 2000 | |
| | | <i>B. thermoproteolyticus</i> | Termófilo | Kumar y Nussinov, 2000 | |
| | | <i>Rhizopus</i> | <i>R. homothallicus</i> | Termotolerante | Mateos y col., 2006 |
| | | <i>Rhizopus</i> | <i>R. oryzae</i> | Termófilo | Hiol y col., 2000 |
| Hongos | <i>Thermomyces</i> | <i>R. microsporus</i> | Termófilo | Mouchaca y col., 2001 | |
| | | <i>T. lanuginosa</i> | Termófilo | Aloulou y col., 2007 | |
| | | <i>T. lanuginosa</i> | Termófilo | Manimaran y col., 2009 | |
| | <i>Penicillium</i> | <i>T. lanuginosa</i> | Termófilo | Gaffney y col., 2009 | |
| | | <i>P. duponti</i> | Termófilo | Rajasekaran y Maheswary y col., 1993 | |
| | | <i>Rhizomucor</i> | <i>R. miehei</i> | Termófilo | Maheswary y col., 2000 |
| Levaduras | <i>Kluyveromyces</i> | <i>R. pusillus</i> | Termófilo | Mouchaca y col., 2001 | |
| | | <i>Kluyveromyces</i> sp | Termófila | Dasgupta y col., 2014 | |
| | <i>Candida</i> | <i>Candida</i> | Termófila | Plascencia Espinoza y col., 2014 | |
| | | <i>guilliermondii</i> | Termófila | Wang y col., 2014 | |
| | <i>Pichia</i> | <i>Pichia pastoris</i> | Termófila | | |

1.4 Lipasas comerciales

Las lipasas comercialmente disponibles son usualmente obtenidas de microorganismos que producen una amplia variedad de lipasas extracelulares. En el caso de algunas preparaciones, éstas han sido desarrolladas por varias compañías biotecnológicas para ser usadas como biocatalizadores con propiedades catalíticas y aplicaciones específicas. Un buen ejemplo de preparación comercial, lo representa Lipolasa®, la primera lipasa recombinante obtenida de *Thermomyces lanuginosus* (antes *Humicola lanuginosa*) y expresada en *Aspergillus oryzae*. Esta enzima es comercialmente producida por Novo Nordisk (Kademi y col., 2003). A continuación ejemplos de lipasas comerciales son mostrados en la Tabla 1.3.

Tabla. 1.3 Hongos termófilos productores de enzimas termoestables.

| Hongos | Otros nombres | T _{ópt} (°C) | T _{máx} (°C) |
|---------------------------------------|---|-----------------------|-----------------------|
| <i>Chaetomium thermophile</i> | <i>C. thermophilum</i> | 45–55 | 58–61 |
| <i>Coonemeria aegyptiaca</i> | <i>Thermoascus aegyptiacus</i> | 40 | 55 |
| <i>Coonemeria crustacea</i> | <i>Thermoascus crustaceus</i> , <i>Dactylomyces crustaceus</i> , | 40 | 60 |
| <i>Coonemeria verrucosa</i> | <i>Thermoascus crustaceus</i> | 30–40 | 55 |
| <i>Corynascus thermophilus</i> | <i>Thielavia thermophila</i> , <i>Myceliophthora fergusii</i> | 50 | 60 |
| <i>Dactylomyces thermophilus</i> | <i>Thermoascus thermophilus</i> , <i>Thermoascus</i> | 40-45 | |
| <i>Malbranchea cinnamomea</i> | <i>Trichothecium cinnamomeum</i> | 45 | 57 |
| <i>Melanocarpus albomyces</i> | <i>Myriococcum albomyces</i> , <i>Thielavia albomyces</i> | 45 | 57 |
| <i>Melanocarpus thermophilus</i> | <i>Thielavia minuta</i> var. <i>thermophila</i> | 35 | 50 |
| <i>Myceliophthora thermophila</i> | <i>Sporotrichum thermophilum/thermophile</i> , <i>Chrysosporium thermophilum</i> , <i>Myceliophthora indica</i> , <i>Corynascus heterothallicus</i> | 45-50 | >55 |
| <i>Myriococcum thermophilum</i> | * | 45 50 | 53 55 |
| <i>Rhizomucor miehei</i> | <i>Mucor miehei</i> | 35-45 | 57 |
| <i>Rhizomucor pusillus</i> | <i>Mucor pusillus</i> | 35-45 | 55 |
| <i>Scytalidium thermophilum</i> | <i>Torula thermophila</i> , <i>Humicola grisea</i> var. <i>thermoidea</i> , <i>Humicola insolens</i> | 40 | 58 |
| <i>Talaromyces byssochlamydioides</i> | <i>Paecilomyces byssochlamydioides</i> | 40-45 | 50 |
| <i>Talaromyces emersonii</i> | <i>Geosmithia emersonii</i> ; <i>Talaromyces duponti</i> , <i>Penicillium duponti</i> (misapplied names) | 40-45 | 55 |
| <i>Talaromyces thermophilus</i> | <i>Penicillium duponti</i> | 45-50 | 55 |
| <i>Thermoascus aurantiacus</i> | <i>Thermoascus aurantiacus</i> | 49-52 | 61 |
| <i>Thermomyces lanuginosus</i> | <i>Humicola lanuginosa</i> | 45-50 | 60 |
| <i>Thermomyces stellatus</i> | <i>Humicola stellata</i> | 40 | 50 |
| <i>Thielavia terrestris</i> | <i>Allescheria terrestris</i> , <i>Acremonium alabamensis</i> | 40-45 | 52 |

Tabla 1.4 Lipasas comerciales disponibles producidas por microorganismos.

| Recurso | Nombre comercial | Proveedor | Aplicaciones | Industria |
|-------------------------------------|-------------------------------|---------------------------|--|--------------------------------------|
| Bacterias | | | | |
| <i>Alcaligenes</i> sp. | Lipasa PL | Meito Sangyo, Co. | Modificación de aceites y ácidos grasos y aditivos de alimentos. | Procesamiento de alimentos |
| <i>Chromobacterium viscosum</i> | Lipasa CV | Genzyme | Diagnóstico y métodos analíticos | Cuidado de la salud y diagnóstico |
| <i>Pseudomonas cepacia</i> | Lipasa SL | Amano | Síntesis quirral | Industria de los alimentos |
| <i>Pseudomonas menodocina</i> | Lumafast | Genencor International | Hidrólisis de aceites y grasas | Detergentes |
| Hongos | | | | |
| <i>Aspergillus niger</i> | Lipasa DS | Amano | Suplemento dietético | Biofarmacéutica |
| | Lipasa | Sigma | Síntesis orgánica y analítica | Industria panadería |
| | Lipopan ®FA | Novozyme | Fortalecimiento masa | Procesamiento de alimentos |
| <i>Rhizopus oryzae</i> | Lipomed TM 627P-627P | Biocatalysts Ltd. | Textura de pasta | Alimentos y panadería |
| | Lipomed TM 36P-L03GP | Novozyme | Alimentos dietéticos | Biofarmacéutica |
| <i>Rhizomucor miehei</i> | Palatasa ® | Novozyme | Intensificadores de sabor | Lácteos |
| Levaduras | | | | |
| <i>Candida cylindracea</i> | Lipasa MY | Meito | Productos de dieta | Biofarmacéutica |
| | Resinasa ® a Novozyme® 435 | Sangyo, Co. | | Productos de reforestación |
| <i>Candida antártica</i> | Nopazyme® | Novozyme | Aceites especiales | Procesamiento de alimentos |
| <i>Candida cylindracea</i> | Lipomod TM 29P-L029P | Biocatalysts Ltd. | Saborizante de quesos | Cereales Saborizantes |

1.5 Producción de lipasas

La producción de lipasas se puede llevar a cabo mediante procesos de fermentación en FML o FMS. Ambos procesos presentan ventajas e inconvenientes (Córdova, 1998); además, algunos estudios han reportado que la producción de lipasas en estos sistemas está influenciada principalmente por factores ambientales y nutricionales como: pH, temperatura, velocidad de agitación, composición del medio, disponibilidad de oxígeno, presencia y tipo de inductor, entre otros. (Elibol y Ozer, 2000; Lima y col., 2003).

En la mayor parte de los trabajos realizados sobre la producción de lipasas se han empleado FML como modelo de fermentación. Sin embargo, han comenzado a surgir reportes en donde se han empleado procesos de FMS como modelo de estudio para la producción de lipasas extracelulares por *Rhizopus* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. y levaduras como *Yarrowia lipolytica* y *Candida antarctica* (Haq y col., 2002; Domínguez y col., 2003; Treichel y col., 2010).

1.5.1 Producción de lipasas por FMS

La FMS se define como el cultivo de microorganismos en soportes sólidos húmedos, ya sea en soportes inertes o naturales que pueden ser utilizados como fuente de nutrientes y energía. La fermentación se puede llevar a cabo en medios con bajo contenido de agua libre, asemejando en mucho el entorno natural al que están adaptados los microorganismos (Pandey y col., 2003). Este tipo de cultivo puede ser entendido como un proceso en el cual el sustrato es empleado en un estado sólido con una mínima cantidad de agua (Mitchell y col., 2000) y en donde especies fúngicas están mejor adaptadas debido a su capacidad para colonizar sustratos sólidos. Otros autores la han definido como una técnica de cultivo de microorganismos sobre la superficie de partículas sólidas humedecidas a un grado tal, que permita el crecimiento de dichos microorganismos pero no excede el nivel de retención máxima de agua de la matriz sólida, de manera que se forma una fase gaseosa en los espacios entre las partículas sólidas (Minjares y col., 1997). Asimismo la FMS es un proceso microbiano que se desarrolla en la superficie y en el interior de una matriz sólida (Lonsane y col., 1985), que tiene la propiedad de absorber o contener agua, con o sin nutrientes solubles.

El principal objetivo de la FMS es cultivar hongos o bacterias que estén en contacto con el sustrato insoluble y concentraciones de nutrientes elevadas, para su mayor disponibilidad. Este tipo de cultivo ofrece ventajas comparado con el proceso de producción en FML (Tabla 1.6). Sin embargo, también se presentan algunas desventajas, como es el deficiente control de temperatura, pH y contenido de humedad; particularmente en procesos a gran escala. (Holker y col., 2004).

Aunado a ello una considerable cantidad de trabajos ha sido realizada para la comprensión de los aspectos bioquímicos y de ingeniería del proceso de FMS (Singhania y col., 2009). Sin embargo, la mayoría de los problemas de este tipo de cultivo no han sido resueltos completamente.

Entre las ventajas más importantes de la FMS podemos citar: alta productividad, altas concentraciones del producto de interés, productos estables, menores problemas de represión catabólica, cultivo de microorganismos especializados, cultivos de varias combinaciones de hongos y la última pero no por eso menos importante, la baja demanda de esterilización debido a su bajo contenido de agua, lo que impide la contaminación por microorganismos durante los cultivos (Viniestra- González y col., 2003). Otra de las ventajas presentadas para este tipo de cultivo, son los bajos costos de producción y altas actividades a pesar de que la recuperación del producto y los procesos de purificación representan costos elevados al emplear soportes naturales. En la tabla 1.5 se muestran las principales ventajas y desventajas del cultivo en medio sólido.

Tabla 1.5. Ventajas y desventajas de la fermentación en medio sólido.

| Ventajas | Desventajas |
|---|---|
| ❖ Altas productividades. | ☞ Pérdida de humedad |
| ❖ Productos más concentrados. | ☞ Altas concentraciones de inóculo |
| ❖ Menores costos de producción. | ☞ Estimación difícil de la biomasa. |
| ❖ Sustratos y soportes económicos de bajo costo. | ☞ Desarrollo tecnológico elevado para que el proceso pueda ser escalado |
| ❖ Condiciones de cultivo de los hongos en medios similares a su hábitat original. | ☞ Difícil transferencia de calor y masa: gradientes de temperatura, pH, aire, humedad, etc. |
| ❖ Empleo o aplicación directa del producto fermentado. | ☞ Riesgo de elevación excesiva de temperatura: Acumulación de calor metabólico. |
| ❖ Bajos requerimientos de energía. | ☞ Pre tratamiento de los sustratos o soportes empleados: humidificación, homogenización, tratamiento térmico etc. |
| ❖ Simplicidad de los medios de cultivo. | |
| ❖ Fácil aireación. | |
| ❖ Rendimientos elevados. | |

No obstante, una de las principales desventajas citadas para este tipo de cultivo es el escalamiento, que ha sido uno de los principales factores limitantes desde hace muchos años. Recientemente, con algunos avances de ingeniería bioquímica un buen número de biorreactores se han diseñado para superar los problemas de escalamiento, y el monitoreo de ciertos parámetros en línea, como problemas de transferencia de calor y de masa. La estimación del crecimiento microbiano ha sido uno de los avances más importantes en FMS, la cual es esencial para estudios de cinéticas de crecimiento. Para ello, se utilizan métodos indirectos como son: la cuantificación de ergosterol, proteína, ácidos nucleicos (ADN), biomasa por peso seco y cambios en el comportamiento de producción de gases como CO₂. También, se han desarrollado nuevas herramientas para determinar la producción de biomasa a través de un estereomicroscopio y cámaras digitales (Couri y col., 2006). Además de este método, algunos autores han estimado la tasa de producción de CO₂, para estimar la cinética de crecimiento de algunos microorganismos (Pandey y col., 2007).

La FMS es un sistema con potencial para la producción de enzimas. Entre los principales factores que afectan la síntesis enzimática y el crecimiento de los microorganismos en FMS se incluyen la selección adecuada del sustrato o soporte inerte, tamaño de partícula, espacio inter-partícula y área superficial, contenido de humedad y actividad de agua (a_w) del sustrato, humedad relativa de la atmósfera gaseosa, tipo y tamaño de inóculo, control de la temperatura durante la fermentación y remoción del calor metabólico.

Con respecto a este último factor, la generación de calor metabólico, así como la baja conductividad térmica de los sustratos empleados en FMS, provocan el aumento en la temperatura en el sistema de fermentación, afectando el metabolismo microbiano global (Saucedo-Castañeda y col., 1990; Pandey y col., 1999). En procesos aerobios como la FMS, la generación de calor metabólico es cuantificada a través de la tasa de producción de CO₂ o de consumo de O₂. La remoción del calor es probablemente el factor más importante que limita el escalamiento en los procesos de FMS a gran escala (Laukevics y col., 1984). La razón es que los dispositivos convencionales de enfriamiento por conducción o convección son inadecuados para disipar el calor metabólico debido a la pobre conductividad térmica de la mayoría de los sustratos sólidos generando gradientes inaceptables de temperatura. Únicamente, los dispositivos de enfriamiento evaporativo proveen la suficiente capacidad para la eliminación de calor; sin embargo, este mecanismo conduce a la deshidratación del medio de cultivo. El proceso más eficiente para el control de la temperatura es la evaporación de agua. Sin embargo, distintas estrategias para la remoción han sido reportadas (Prior y col., 1992):

- ❖ Aireación forzada con aire húmedo para remover el calor por conducción.
- ❖ Aireación forzada con aire seco para remover el calor por evaporación.
- ❖ Enfriamiento de la superficie externa del biorreactor a través del uso de una chaqueta de agua.
- ❖ Circulación de agua fría a través de un intercambiador de calor interno.
- ❖ Colocación de biorreactor en un cuarto a temperatura controlada o un baño de agua.

La función primaria de la aireación durante los procesos aerobios de FMS es suministrar oxígeno para el crecimiento celular y remover el dióxido de carbono producido; sin embargo, en este tipo de procesos la aireación es importante para la transferencia de masa y calor entre la masa sólida húmeda y la fase gaseosa. El uso de microorganismos termotolerantes ha sido considerada para reducir los problemas asociados al a la desactivación celular por el calentamiento del medio de cultivo por la acumulación de calor metabólico (Mudgett y col., 1986). Sin embargo la respuesta de los diferentes microorganismos a la temperatura varía, ya que la mayoría de los hongos utilizados son mesófilos y pocos microorganismos son termófilos.

1.6 Producción de enzimas termoestables

A pesar de la gran diversidad de enzimas producidas por microorganismos, la mayoría de las enzimas usadas hasta la fecha, incluyendo las lipasas, han sido obtenidas de organismos mesófilos, es decir, microorganismos capaces de crecer a temperaturas de entre 20-35 °C, cualidad que ofrece muchas ventajas. Sin embargo, la aplicación de enzimas termo sensibles producidas por estos microorganismos es restringida, debido a su estabilidad tan limitada frente ambientes de temperatura extrema. (Sharma y col., 2002).

En el caso de las lipasas, la termoestabilidad varía considerablemente de acuerdo a su origen. Las lipasas de plantas y animales usualmente son menos termoestables que las lipasas microbianas extracelulares; debido a ello, la mayoría de las enzimas utilizadas a nivel industrial hasta la fecha provienen principalmente de hongos y bacterias (Wu y col., 1996). Ambos grupos han recibido gran importancia de acuerdo a las enzimas que son capaces de producir. Un microorganismo se considera termófilo, si sus temperaturas máximas de crecimiento son mayores de 50 °C. Un hongo termotolerante en cambio presenta un rango de temperaturas entre los 20 y 55 °C. (Maheswary y col., 2000). La tabla 1.6 muestra algunos ejemplos de lipasas y otras enzimas termoestables.

Tabla 1.6 Lipasas termoestables producidas por algunos microorganismos termófilos.

| <u>Enzima</u> | <u>Microorganismo</u> | <u>T óptima</u> <u>°C</u> | <u>Estabilidad</u> | <u>Referencia</u> |
|---------------|------------------------------------|------------------------------|--------------------|-----------------------------|
| Lipasa | <i>Thermomyces lanuginosus</i> | 40-50 | 60 °C (120 min) | Aloulou y col., 2007 |
| Lipasa | <i>Bacillus</i> sp | 60-65 | 60 °C (60 min) | Nawani y col., 2006 |
| Lipasa | <i>Rhizopus oryzae</i> | 45 | 45 °C (30 min) | Hiol y col., 2000 |
| Lipasa | <i>Rhizopus arrhizus</i> | 45 | 50 °C (80 min) | Wei y col., 2006 |
| Lipasa | <i>Candida antarctica</i> A (CALA) | >90 | 45 y 90 ° C | Maria y col., 2005 |
| Lipasa | <i>Rhizopus rhizopodiformis</i> | 45 | 50 °C (24 h) | Samad y col., 1990 |
| Lipasa | <i>Candida antarctica</i> B(CALB) | 30-40 | 45 °C (30 min) | Suen y col., 2004 |
| Lipasa | <i>Bjerkandera adusta</i> R59 | 45-50 | 60 °C (120 min) | Bancerz y Ginalska, 2007 |
| Lipasa | <i>Geotrichum</i> R59 | 37-50 | 60 °C (60 min) | Ginalska y col., 2004 |
| Xilanasas | <i>Thermomyces lanuginosus</i> | 55 | 65 °C (360 min) | Singh y col., 2000 |

1.7 *Thermomyces lanuginosus*

Thermomyces lanuginosus especie fúngica antes llamada *Humícola lanuginosa*, es un hongo termófilo capaz de crecer en un intervalo de temperaturas de 40 -60 °C, con un óptimo de 50 °C. Este microorganismo produce diversas enzimas termoestables como: lipasas, amilasas, xilanasas, fitasas, y galactosidasas. En años recientes, ha adquirido un creciente interés por su capacidad para producir enzimas termoestables en FML y FMS. Dentro de las enzimas reportadas, las lipasas representan un papel importante. La lipasa de *Thermomyces lanuginosus* es una enzima basofílica termoestable, comercialmente disponible en formas soluble e inmovilizada. Inicialmente esta enzima estuvo orientada a la industria de los alimentos, debido a sus múltiples aplicaciones en diferentes áreas industriales: producción de biodiesel, y químicos finos empleados principalmente en procesos específicos de enantio y regio selectividad (Fernández-Lafuente y col., 2010). La lipasa de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) es una proteína simple que consta de 260 aminoácidos con un peso molecular de 31,700 g/mol y un punto isoeléctrico de 4.4.

La estructura de TLL puede mostrar una estructura abierta o cerrada Fig. 1.3. La “lid” de la proteína es una superficie móvil alfa-helicoidal que consiste de 86-93 aminoácidos que cubren el sitio activo. El sitio activo incluye residuos de Ser, His y Asp (Serina, Histidina y Ácido aspártico) en el sitio catalítico. Además presenta 4 residuos de triptófano (Trp), y uno de ellos Trp89 que se encuentra localizado en la tapa o “lid” (Fernández- Lafuente y col., 2010).

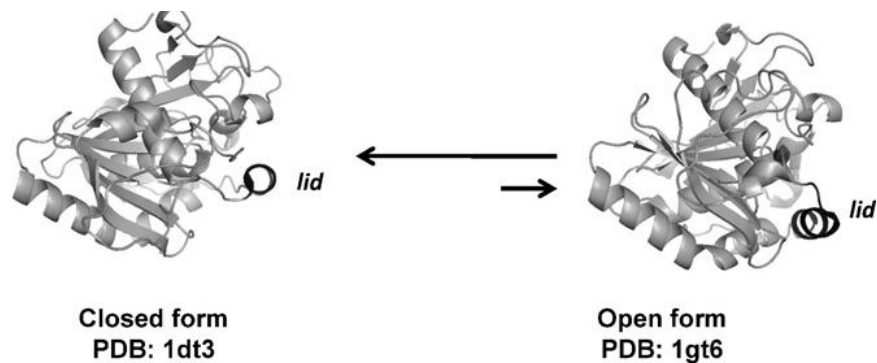


Fig. 1.3. Estructura abierta y cerrada de la enzima de *Thermomyces lanuginosus*. Estructura 3D obtenida del (Banco de datos de Proteína PDB), usando Pymol vs 0.99. (Lafuente y col., 2010)

El primer reporte acerca de la producción de lipasas por el hongo termófilo *Thermomyces lanuginosus* fue publicado por Arima y col. (1972), con respecto a ello pocos trabajos han centrado su atención en este tipo de microorganismos, en donde los requerimientos nutricionales y ambientales resultan ser similares a algunos organismos mesófilos, a excepción de la temperatura óptima de crecimiento. Aunado a ello, se continúa con la búsqueda de microorganismos termófilos productores de enzimas con novedosas características de estabilidad en diversos procesos industriales.

1.8 Usos y aplicaciones como biocatalizador industrial

1.8.1 Modificación de aceites y grasas

Dentro de los principales usos de las lipasas se encuentra la modificación y producción de nuevos aceites y grasas para producir alimentos saludables. La regio especificidad es una de las mayores ventajas usadas en la industria oleo química para sintetizar productos de alto valor agregado, tales como mantquilla de cocoa, sustitutos de grasas de leche humana y otros lípidos de estructura específica. (Fernández- Lafuente y col., 2010)

1.8.2 Hidrólisis de grasas y aceites

La lipasa comercial de *Thermomyces lanuginosus* TLL ha sido empleada en la hidrólisis de diferentes aceites y grasas para producir ácidos grasos libres. Una de las más interesantes aplicaciones de la lipasa TLL es la hidrólisis de aceites de pescado para producir aceites grasos poli-insaturados. La hidrólisis de aceite de soya ha sido comparada entre las lipasas de *Candida rugosa* y lipasas pancreáticas porcinas, las lipasas microbianas fueron más efectivas para promover la hidrólisis de aceite de soya que las lipasas animales (Freitas y col., 2007).

1.8.3 Otros usos de TLL

Existen muchos ejemplos, donde el papel de las lipasas está ligado a las múltiples reacciones de transesterificación como es el caso de la alcoholólisis y esterificación e incluso reacciones de interesterificación que comprenden las reacciones de alcoholólisis. También destacan de manera importante las aplicaciones de esta enzima en problemáticas del medio ambiente, en la degradación de polímeros, tratamiento de desechos de la industria de la carne, pre tratamiento de lanas, sensores de calidad de grasas y blanqueamiento de materiales (Fernández-Lafuente y col., 2010). Otro aspecto importante de la lipasa producida por TLL es su capacidad para ser empleada en procesos de inmovilización de enzimas para la mejora de intermediarios producidos por síntesis química, como intercambio iónico, inmovilización covalente y adsorción física (Cowan y col., 2011).

1.9 Inmovilización de enzimas TLL

La inmovilización, es una nueva tecnología que ha emergido en la actualidad como una herramienta empleada en diversos procesos industriales, particularmente para la producción de energía verde sostenible y bioconversiones. Reportes de inmovilización química en proteínas y enzimas han sido citados desde 1960 (Cao y col., 2005). El éxito de este proceso ha sido atribuido a las formas estables que adquiere una proteína o enzima después del procedimiento de inmovilización, las razones son la obtención rígida de la enzima, la cual impide desplegamientos de la misma, y deformaciones en el sitio activo características que la hacen más estable (Ogino y col. 2007).

Asimismo el incremento en la estabilidad de la enzima hace posible la recuperación de los biocatalizadores disminuyendo el número de operaciones unitarias, lo que garantiza una disminución en el costo de productos y procesos (Azevedo y col., 2001).

Por lo tanto dentro de las principales ventajas presentadas por el proceso de inmovilización se encuentran: 1) Incremento en la estabilidad conformacional de la enzima y rigidez estructural, lo que promueve la resistencia a desactivación térmica o química; 2) Evita agregados intermoleculares; 3) Mejora en la actividad catalítica debido a cambios difusionales, electrostáticos y estéricos; 4)

Posibilidad de reutilizar el biocatalizador lo que reduce costos de producción (Goldstein, 1976). Por todas estas características, la inmovilización de enzimas es la estrategia más común empleada en la estabilización de biocatalizadores producidos en la industria.

Los procesos de inmovilización que son ampliamente reconocidos han sido divididos en tres diferentes categorías: a) inmovilización dentro de una matriz inerte, b) inmovilización con una matriz inerte y c) formación de partículas insolubles en agua: El método de inmovilización dentro de una matriz sólida inerte ha sido citado por diversos autores (Svensson y col. 1990; Pazhang y col., 2006), su principio se basa en un procedimiento de adsorción de la enzima dentro de un soporte sólido unido por fuerzas electrostáticas, Van der Waals e interacciones hidrofóbicas. En el caso de uniones covalentes, éstas son producidas debido a la presencia de grupos funcionales que se encuentran en la enzima y se unen al soporte. Uno de los ejemplos más representativos acerca de inmovilización por adsorción física lo representa la lipasa B de *Candida antarctica* adsorbida en una resina de Lewatit por intercambio iónico quien ha exhibido una excelente actividad en reacciones con presencia de solventes orgánicos.

El atrapamiento representa el método de inmovilización comúnmente conocido como inmovilización con una matriz inerte, este método se forma por una incorporación de la enzima con un gel o un polímero como agarosa. Bruns y Tiller (2005) reportan el atrapamiento de una peroxidasa y cloroperoxidasas en una red anfifílica nanoestructurada formada a partir de acrilatos. Sin embargo, ante estos dos métodos, han surgido estudios recientes acerca de la formación de partículas insolubles para la formación de CLECs (Formación de cristales enzimáticos entrecruzados) los cuales se distinguen debido a la formación de enlaces covalentes entre los cristales de la enzima empleando un agente bifuncional. Otro ejemplo bien representado son las CLEAs (Formación de agregados enzimáticos entrecruzados) cuyas uniones químicas son producidas debido a la precipitación de la enzima en una solución acuosa, seguida de un enlace covalente entre los agregados enzimáticos y un agente bifuncional (Stepankova y col., 2011).

Aunque ambos tipos de inmovilización han mostrado un incremento importante en la estabilidad operacional de las enzimas, sólo pocos reportes han discutido la aplicación de CLEAs en solventes orgánicos. Por ejemplo las CLEAs de tirosinasas han mostrado que retienen el 75 % y 62 % de la actividad original después de su incubación en solventes como 1-4 dioxano y acetona (Xu y col., 2011).

1.9.1 Inmovilización de lipasas

Como se ha mencionado en apartados anteriores las lipasas representan un grupo de enzimas ampliamente usado en biocatálisis debido a sus propiedades regioselectivas. La lipasa comúnmente empleada por su disponibilidad comercial es la lipasa procedente del hongo *Thermomyces lanuginosus*, la cual ha sido inmovilizada en diversos materiales como ha sido señalado por Fernández Lafuente y col. (2010).

Lipasas bacterianas procedentes de algunas especies como *Bacillus*, han reportado procesos de inmovilización en diversos materiales, tales como; adsorción en propileno (Accurel EP-100), sílica y otros soportes hidrofóbicos mejorando las características de estabilidad frente a la temperatura en reacciones de esterificación (Nawani y col., 2006; Kumar y col., 2006). *B. thermocatenuatus*, ha sido otro de los microorganismos más citados en procesos de inmovilización, los primeros en describir estos estudios fueron Schmidt Dannert y col., (1994), encontrando que los enlaces provocados por dicho proceso en soportes hidrofóbicos como Amberlita y Serolita fueron irreversibles provocando modificaciones funcionales en estabilidad y una hiper activación (Palomo y col., 2007; Fernández-Lorente y col., 2008). La cepa fúngica de *Rhizopus oryzae* también ha sido inmovilizada en diferentes matrices, sobre todo Duolitas, Celitas y Amberlitas obteniendo mejoras en reacciones de hidrólisis en presencia de solventes orgánicos (Hiol y col., 2000).

Capítulo 2

Justificación

2.- Justificación

Numerosos procesos industriales requieren de la aplicación de enzimas como catalizadores biológicos. En la actualidad, el mercado de las enzimas empleadas en diversos sectores ha crecido rápidamente. Sin embargo, aún hay limitaciones; como es el caso de las temperaturas de operación en los procesos de producción de enzimas y/o en las características de los biocatalizadores.

Con relación a la producción de enzimas por FMS uno de los principales problemas a escala industrial es la acumulación de calor metabólico por ello, el uso de hongos termotolerantes o termófilos permitirá el desarrollo de procesos en los que la acumulación de calor metabólico sea positivo para el crecimiento y metabolismo microbiano.

Por otro lado, la actividad catalítica de otras enzimas (xilanasas, amilasas, glucosidasas) producidas por *Thermomyces lanuginosus* es bien conocida; sin embargo, son pocos los reportes sobre la termotolerancia de lipasas producidas por este microorganismo en fermentación en medio sólido.

Capítulo 3

Hipótesis

3.- Hipótesis

La acumulación de calor metabólico durante la FMS favorecerá el crecimiento y la producción de lipasas por el hongo termófilo *Thermomyces lanuginosus*. Además, las lipasas obtenidas serán termoestables con propiedades catalíticas favorables para su uso en aplicaciones industriales.

Capítulo 4

Objetivos

4.- Objetivos

4.1 OBJETIVO GENERAL

- Contribuir al conocimiento sobre la fisiología de *Thermomyces lanuginosus* en FMS y demostrar las ventajas de este tipo de cultivo para el crecimiento de este hongo termófilo para la producción de lipasas termoestables.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Seleccionar una cepa termófila productora de lipasas procedente de la especie *Thermomyces lanuginosus*.
- Desarrollar una estrategia de producción de preinóculo e inóculo en medio líquido para establecer las condiciones de crecimiento y de producción de lipasas por el hongo termófilo *T. lanuginosus* en FMS.
- Determinar el efecto de la temperatura en los parámetros cinéticos del crecimiento y producción de lipasas, bajo condiciones del cultivo isotérmico.
- Caracterizar los biocatalizadores producidos por FMS en términos de actividad y estabilidad (temperatura y pH), y acilespecificidad.
- Evaluar la reacción de hidrólisis regioselectiva de aceite de sardina con el biocatalizador producido por *T. lanuginosus* en FMS en una reacción de interés comercial; la hidrólisis de aceite de sardina para la liberación de ácidos grasos omega-3.
- Evaluar las características catalíticas del biocatalizador producido por *T. lanuginosus* en FMS en alguna reacción de interés comercial.

Capítulo 5

Materiales y Métodos

5.- Materiales y métodos

5.1 Microorganismos

En este trabajo se evaluaron 29 cepas termófilas aisladas de agave tequilero. Todas las cepas fueron proporcionadas por el laboratorio de bioprocesos de la Universidad de Guadalajara y fueron clasificadas en dos grupos. El primer grupo conformado por 11 cepas; 7 de ellas pre- identificadas como cepas del género *Thermomyces* sp., 3 cepas identificadas como cepas del género *Rhizopus* sp., y una identificada como cepa del género *Helycosporium*. El segundo grupo de cepas conformado por un total de 18 cepas no identificadas y cuya morfología es similar a la presentada por el género *Thermomyces* sp.

5.2 Reactivos

Durante el desarrollo de este trabajo se emplearon medios de cultivo de la marca Bioxon® (México); reactivos analíticos y disolventes orgánicos de las marcas J.T. Baker® (México) y Sigma-Aldrich® (EUA), aceite de oliva producido por Carbonell de Córdoba, S.A. (España) y los tamices moleculares tipo 4A fueron proporcionados por MONT INOX, USA. El aceite de sardina fue generosamente donado por BTSA (Biotecnologías Aplicadas, S.L. Madrid, España). Otros reactivos y solventes fueron grado analítico y grado HPLC (J.T. Baker®)

5.3 Medios de cultivo

5.3.1 Propagación y mantenimiento de las cepas

Para la propagación y mantenimiento de las cepas termófilas empleadas se usó el medio Agar Papa Dextrosa (PDA) de la marca Bioxon® (México). El medio fue preparado de acuerdo a las especificaciones del proveedor. Posteriormente, el medio fue esterilizado a 121 lb/in² durante 15 minutos y vaciado en cajas Petri hasta solidificar. Una vez solidificado, se colocó en cada una de las cajas una membrana de celofán # 4 (Celofán dulce Papelerías Lumen) previamente esterilizada. Posteriormente, se inoculó cortando un cuadro de micelio (aproximadamente 0.5 x 0.5 cm) procedente de un preinóculo y colocado de manera superficial en el centro de la caja para finalmente incubar a 45 °C, con control de temperatura durante 7 días.

5.3.2 Propagación de las cepas en medio ADS, EMA y MP

Para la propagación de las cepas, también se utilizaron los siguientes medios de cultivo: *ADS* (*Agar Dextrosa Saboraud*), *EMA* (*Extracto malta agar*) Y *MP* (*Medio Pontecorvo*). Los medios fueron preparados de acuerdo a las especificaciones del proveedor y esterilizados a 121 lb/plg² durante 15 minutos y vaciados (20 mL) en cajas Petri para su posterior solidificación. Para la inoculación en caja se cortó un cuadro de agar (0.5 cm x 0.5 cm), se colocó en el centro de la caja, incubando a 45 °C durante 7 días.

5.3.3 Producción de inóculo en medio líquido

Para la producción de inóculo en medio líquido se prepararon matraces de 125 mL con 28 mL de medio Pontecorvo [1x] bajo la siguiente composición (g/L): (NH₄)₂SO₄ 4.63, urea 3.16, KH₂PO₄ 14, KCl 0.80, MgSO₄.7H₂O 0.80, K₂HPO₄ 2.40, extracto de levadura 0.8, glucosa 28.8, aceite de oliva, 7.2, alcohol polivinílico, 2.1, solución de elementos traza 1.2 mL. La solución de elementos traza tiene la siguiente composición (mg/L): Na₂B₄O₇.10H₂O 10, MnCl₂.4H₂O 5, Na₂MoO₄.2H₂O 5, CuSO₄.5H₂O 25, FeCl₃ 8.5, ZnSO₄ 10, ajustada a pH 3.5. Simultáneamente, en tubos Corning que contenían un lecho de 4 g de perlas de vidrio se adicionaron discos de micelio en la siguiente relación: 3 discos/2mL medio. Los discos fueron cortados con un horador. El micelio se desagregó agitando 2 min. La suspensión producida fue utilizada para inocular cada uno de los matraces de forma independiente obteniendo un volumen final cercano a 30 mL. Los matraces inoculados fueron incubados a 40 °C, con agitación a 150 rpm (Incubadora LAB-LINE ORBIT Environ Shaker) durante 72 h. Al final de este tiempo, los cultivos fueron usados para inocular el medio utilizado para estudios de FMS.

5.3.4 Medio de cultivo para la producción de enzima

Para la producción de lipasas en medio sólido se usó el medio Pontecorvo concentrado (3x) cuya composición (g/L): (NH₄)₂SO₄ 13.89, urea 9.48, KCl 2.40, MgSO₄.7H₂O 2.40, K₂HPO₄ 7.2, extracto de levadura 2.4, glucosa 86.4, aceite de oliva 21.6, alcohol polivinílico 6.30, solución de elementos traza 3.60 mL. El pH del medio se ajustó a 6.5.

5.4 Pre tratamiento del soporte

El soporte inerte empleado en este trabajo fue agrolita. La agrolita es un soporte de origen volcánico compuesto principalmente de sílice, de estructura amorfa y porosa con un pH de 7-7.75. Antes del cultivo la agrolita fue lavada y tamizada para obtener partículas con un tamaño entre 0.84 y 2.0 mm (Malla 16- Malla 20). Se hicieron dos lavados con agua destilada a 25 °C y un tercero a 60 °C, se escurrió el exceso de agua del material y se secó a 60 °C por 48 h. El contenido de humedad final en el soporte fue menor al 1 % (p/p).

5.5 Preparación de la fermentación en medio sólido

Para llevar a cabo la fermentación en medio sólido se utilizaron columnas de vidrio de 2.5 cm de diámetro y 20 cm de largo. Se usaron aproximadamente 7 g de agrolita seca por columna. El soporte fue impregnado con medio de cultivo utilizado para la producción de lipasas (Medio Pontecorvo 3x), el cual fue previamente inoculado con una suspensión de micelio (inóculo en medio líquido) de una edad de 72 h. Posteriormente, se homogeneizó la mezcla de agrolita y medio inoculado durante 3 minutos hasta alcanzar un contenido de humedad del 65 %. Finalmente, las columnas fueron empacadas hasta cubrir tres cuartas partes de su capacidad e incubadas en baño de agua bajo las siguientes condiciones de cultivo: temperatura, 40 °C; tasa de aireación, 50 mL/min; pH inicial, 6.5. Cabe mencionar que tanto el medio de cultivo como las columnas y el aire no fueron esterilizados.

Durante el transcurso de la fermentación se tomaron dos columnas en cada tiempo de muestreo. Inmediatamente después de cada toma de muestra, las columnas se refrigeraron a 10 °C para detener el metabolismo; después de 30 min, para la extracción de las lipasas, el material fermentado obtenido de cada columna fue mezclado con agua destilada (1:10 w/v) y agitado en vórtex por 2 min. Posteriormente, las partículas sólidas fueron filtradas por decantación, centrifugadas durante 3 min a 10,000 rpm y almacenadas a 4 °C para análisis de actividad lipasa.

5.6 Medición de producción de CO₂

La tasa específica de crecimiento (μ) y la fase *lag* fueron estimadas a través de la actividad respiratoria, midiendo la producción de CO₂ durante el transcurso del cultivo. Para este propósito, se conectó un sistema de monitoreo en línea a la corriente de aire de salida proveniente de los fermentadores en columna. Este sistema, consistió en un metabolímetro acoplado a una computadora personal para el análisis de datos (Saucedo-Castañeda y col., 2013).

Los parámetros cinéticos se obtuvieron de acuerdo a los criterios propuestos por Saucedo-Castañeda y col. (1994); en cuyo trabajo se establece que a través de la actividad respiratoria del cultivo y específicamente empleando los datos de concentración de CO₂, es posible obtener la tasa de producción de CO₂, la producción total de CO₂ y a partir de este último, calcular el valor del ln CO₂, de cuya curva se consideran los puntos que se ajustan a un modelo de crecimiento para estimar el valor de μ .

5.7 Estudios isotérmicos

Para evaluar el efecto de la temperatura en la producción de lipasas por FMS se evaluaron temperaturas de 38 a 45 °C.

5.8 Efecto de la temperatura en la actividad y termoestabilidad de las lipasas producidas por FMS

Se utilizó trioctanoína pre incubada a temperaturas de 30 a 85 °C. Para iniciar la reacción, 50 mg de biocatalizador en polvo producido por FMS fue adicionado y la mezcla de reacción fue continuamente titulada con una solución de NaOH 0.1 M durante 5 minutos, bajo constante agitación. La actividad lipasa fue determinada por triplicado y los valores obtenidos, fueron empleados para estimar los valores de energía de activación (E_a) y energía de desactivación (E_d), de acuerdo a la ecuación de Arrhenius. El efecto de la temperatura en la estabilidad térmica de los biocatalizadores producidos fue evaluada utilizando como sustrato *p*-nitrofenol -octanoato. Los extractos enzimáticos extraídos del biocatalizador fueron preincubados en un rango de temperaturas de 30 a 80 °C por 4 h. Se tomaron muestras a intervalos de 30 min y se midió la actividad residual en un lector de microplaca (Biotek®) a 30 °C. En todos los casos, durante todas las mediciones un extracto cuyos componentes fueron amortiguador y sustrato (blanco) se incubó en las mismas condiciones.

5.9 Efecto del pH en la actividad y estabilidad de las lipasas producidas por FMS

El efecto del pH en la actividad y estabilidad lipasa fue evaluado espectrofotométricamente a 340 nm. Los extractos enzimáticos fueron evaluados empleando como sustrato *p*-NPO 100 mM para los ensayos de actividad.

En el caso de los estudios de estabilidad los ensayos fueron realizados sin la presencia de sustrato, para ello los extractos fueron incubados durante 4 h a diferentes valores de pH a una temperatura de 4 °C, empleando los siguientes amortiguadores de pH a una concentración 0.1 M y tomando muestra a intervalos de tiempo de 30 minutos: citratos- fosfato, pH 3 a 6; Tris-HCl, pH 7 a 9; NaHCO₃-NaOH, pH 10-11 y KCl- NaOH, pH 12. Finalmente la actividad residual fue medida espectrofotométricamente a pH 8 y 30 °C durante 5 minutos. Un blanco fue empleado antes de cada medición.

5.10 Obtención del biocatalizador

En secciones anteriores, se mencionó el uso de los biocatalizadores producidos por ambas cepas para diversos estudios de actividad empleando extractos líquidos y biocatalizador en polvo. Para la obtención del biocatalizador en polvo, el soporte sólido fermentado en columnas, fue deshidratado a través de un corriente de aire (10 L/min, 2 h) hasta obtener un contenido de humedad menor al 1 %. Posteriormente la materia seca fue macerada en un mortero para obtener un fino polvo. Los extractos líquidos fueron preparados a partir de la extracción de 1 g de materia seca o húmeda en 10 mL de agua (1:10 p/v), agitados en vórtex durante 2 min y seguidos de una filtración para su almacenamiento a 4 °C y posterior análisis.

5.11 Inmovilización de la enzima producida por *T. lanuginosus*

Para los estudios de hidrólisis de aceite de sardina la lipasa presente en el biocatalizador fue extraída e inmovilizada de la siguiente forma: una solución acuosa de enzima fue obtenida después de la adición de 10 mL de H₂O destilada (4 °C) por gramo de biocatalizador seco y mezclado por 2 min. Posteriormente, el sobrenadante fue colectado por centrifugación a 8,000 rpm durante 10 min en una micro centrífuga Eppendorf. Después, 10 mL de la solución de la enzima fueron adicionados a 1g de octilagarosa (Healtcare Uppsala, Sweden) y mantenido en agitación a 4 °C hasta que no se detectó actividad en el sobrenadante filtrado (40 min).

Para evaluar la pérdida de actividad debido al proceso de inmovilización, la actividad en la solución de la enzima sin el soporte fue monitoreado en las mismas condiciones. Finalmente, cuando la enzima fue absorbida en el soporte, el derivado octil fue lavado tres veces a través de un filtro con 10 mL de amortiguador de fosfatos 25 mM, a pH 7 y mantenido a 4 °C.

5.12 Hidrólisis de aceite de sardina

La hidrólisis de aceite de sardina fue evaluada siguiendo la metodología propuesta por Fernández Lorente y col., (2011). Se adicionaron 300 mg del biocatalizador en polvo a botellas de vidrio con tapa conteniendo 10 mL de una mezcla bifásica (50:50 v/v) de aceite de sardina y ciclohexano/Tris-HCl 10 mM, a pH 6. Los matraces fueron colocados y mantenidos bajo agitación magnética, a diferentes temperaturas por diferentes intervalos de tiempo. Una unidad de actividad (PUFA) se definió como la cantidad de enzima requerida para liberar un micromol de EPA y DHA por minuto bajo las condiciones de ensayo. Los experimentos fueron llevados cabo por duplicado.

6.- Métodos analíticos

6.1 Medición de actividad lipasa

6.1.1 Cuantificación de actividad lipasa en cultivo de caja Petri

Para los estudios en medio con agar se usó rodamina para determinar la actividad lipasa. El ensayo está basado en la capacidad que tiene la rodamina B, para formar complejos coloridos (fluorescentes) con componentes ácidos. Las placas de agar que contienen rodamina son de color rosa, que cambia a color naranja en presencia de actividad lipasa. El complejo fluoresce con luz UV a 350 nm. Para la medición de halos de hidrólisis producidos por las cepas termófilas estudiadas, se midió el diámetro de los halos en 4 direcciones diferentes (Fig. 6.1). Estos resultados permitieron estimar el Índice de Potencia (I.P), definido como la relación Halo de hidrólisis/ Diámetro de la colonia.

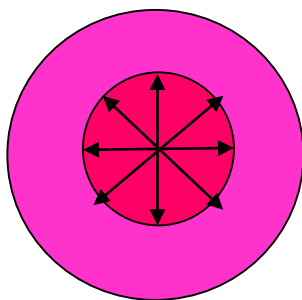


Fig. 6.1 Método de medición de halos de hidrólisis

6.1.2 Método espectrofotométrico

La actividad lipasa de los extractos enzimáticos fue determinada por la técnica de ésteres de *p*-nitrofenol, cuyo principio se basa en cuantificar el incremento en la absorbancia debido a la liberación del *p*-nitrofenol (*p*-NF) por acción de las lipasas al hidrolizar el sustrato *p*-nitrofenil octanoato (*p*-NPO) a 405 nm; para ello se utilizó un lector de microplacas Elisa (Biotek Elx808).

El sustrato (*p*-NPO) fue preparado en 2-propanol a una concentración 10 mM. Asimismo, se preparó un amortiguador Tris-HCl 100 mM, pH 8.0 y 0.25 % (p/v) alcohol polivinílico (PVA). Finalmente, para la medición de actividad la mezcla de reacción utilizada consistió en utilizar 50 μ L de extracto enzimático, y 100 μ L de sustrato (1:9 v/v) sustrato-amortiguador. Posteriormente, se midió absorbancia a 405 nm durante una cinética de 5 minutos a 30 °C.

La actividad enzimática fue calculada a partir de los datos obtenidos de absorbancia vs tiempo, durante ensayos de 5 minutos asegurando linealidad. Una unidad (U) de actividad enzimática fue definida, como la cantidad de enzima necesaria para liberar un μ mol de *p*-nitrofenol por minuto.

6.1.3 Método titulométrico

Para la medición de actividad por este método se usó trioctanoína como sustrato. La emulsión del sustrato fue preparada de la siguiente forma: 10 mL de trioctanoína y 90 mL de una solución de goma arábiga una concentración del 10 % ajustada a pH 7 se emulsificaron con un homogeneizador mecánico *Oster* con 2 velocidades, (Modelo 2523-13 440-20, México) por 10 min. La emulsión de trioctanoína (6 mL) fue mezclada con 24 mL de Tris-HCl 0.3 mM, pH 7, que contenía 150 mM de NaCl, 2 mM CaCl₂. La mezcla fue preincubada a la temperatura de ensayo. La reacción inicio por la adición de un extracto enzimático adecuadamente diluido o biocatalizador seco (polvo). El pH inicial fue ajustado a 7 y la liberación de ácidos grasos fue continuamente titulada con NaOH 0.1M por 5 min, usando un titulador automático (Mettler DL21 Titrator, Switzerland).

Cada ensayo fue realizado por triplicado. La actividad enzimática fue definida de la siguiente forma: una unidad de actividad enzimática (U) fue considerada como la cantidad de enzima necesaria para liberar un μ mol de ácido graso por minuto (Mateos y col., 2006).

6.2 Determinación del contenido de humedad

Se analizaron 0.5 g del soporte fermentado en una termobalanza (Medidor de humedad MB45 *Ohaus*) a una temperatura de 130 °C durante un intervalo de 5-10 minutos de acuerdo a la muestra utilizada.

6.3 Medición del pH

La medición del pH se realizó tomando una muestra de soporte fermentado de aproximadamente 0.5 g a la cual se adicionaron 5 mL de agua destilada para ser agitados en vórtex (SYBRON Thermolyne) durante 2 minutos la medición fue realizada con un potenciómetro (Potenciómetro Conductronic pH120).

6.4 Medición de acilselectividad de los biocatalizadores producidos por FMS

Se determinó el perfil de acilselectividad para cada una de las cepas utilizando la técnica descrita por Mateos y col., (2006). Se prepararon soluciones de ésteres de *p*-nitrofenol (*p*-NP) 10 mM: (acetato, butirato, octanoato, decanoato, dodecanoato, miristato y palmitato) en 2-propanol. Después se mezclaron en una relación (1:9) un volumen del sustrato *p*-NPO (*p*-nitrofeniloctanoato) y 9 volúmenes de Tris-HCl 100 mM (pH 8) conteniendo PVA (alcohol polivinílico) 0.25 %. Posteriormente con una micropipeta de ocho canales se colocaron 100 µL de la mezcla en cada pocillo. Para comenzar la reacción se adicionaron 50 µL de extracto enzimático. La reacción se llevó a cabo en un lector de microplacas durante 10 minutos a 30 °C, agitándose cada 20 segundos y a una longitud de onda de 405nm.

6.5 Análisis de producción de EPA y DHA de los biocatalizadores producidos por FMS en HPLC-UV

Muestras tomadas a diferentes intervalos de tiempo fueron usadas para analizar y determinar el contenido de PUFAs (Sección 5.10), para esto 0.1 mL fueron disueltos en 0.4 mL de acetonitrilo y analizado por HPLC (Spectra Physic HPLC-UV) con un detector (SP 100- UV detector SP 8450) y una columna Kromasil C8 (15 x 0.4 mm). Las muestras fueron eluidas con acetonitrilo/agua/ácido acético pH 3 (70:30:0.1) como fase móvil a una velocidad de flujo isocrático de 1 mL/min. PUFAs fueron detectados a 215 nm. Los tiempos de retención fueron de 10.4 min para EPA y 13.1 min para DHA.

6.6 Análisis Estadísticos

Para determinar las diferencias significativas de los resultados obtenidos, el programa IBM SPSS Statistics Version 22 ®, fue empleado.

Capítulo 7

Selección de cepas

7.-Selección de la cepa

7.1. Microorganismos

Para llevar a cabo la selección de cepas se evaluaron 29 cepas termófilas aisladas de agave tequilero (Tabla 7.1). La propagación de las cepas se realizó en cajas Petri (100 mm x15mm) con 25 mL de medio Agar-Papa-Dextrosa (PDA) Bioxon Becton Dickinson®. En la Tabla 7.2 se presenta la codificación de las cepas usadas en este trabajo.

Tabla 7.1 Grupo de cepas termófilas aisladas de agave tequilero identificadas y no identificadas.

| Grupo | Cepas | Características |
|--------------|-----------------|--|
| I | 7 | Pre-identificadas: Género <i>Thermomyces</i> (<i>Thermomyces</i> sp.) |
| | 3 | Pre-identificadas: Género <i>Rhizopus</i> (<i>Rhizopus</i> sp.) |
| | 1 | Género: <i>Helycosporium</i> (<i>Helycosporium</i> sp.) |
| II | 18 | No identificadas |
| Total | 29 Cepas | Fuente: Agave tequilero |

7.2 Velocidad radial de crecimiento

En una primera etapa de preselección se determinó la velocidad radial de crecimiento (V_r) de todas las cepas (Fig.7.1). Las cepas X2CC y X2BV presentaron los mayores valores de V_r (alrededor de 1.2 cm/día). La mayoría de las cepas no identificadas (X2C, X5S, X4V, X2S2, X4VS, XS2) presentan valores de V_r mayores a 0.8 cm/día. Las cepas identificadas como cepas del género *Thermomyces* presentaron valores de V_r menores a los obtenidos con el resto de las cepas (alrededor de 0.6 cm/día). Las cepas del género *Rhizopus* presentaron bajos valores de V_r (alrededor de 0.4 cm/día). Finalmente, la cepa de *Helycosporium* presentó el menor valor de V_r (0.2 cm/día). Posteriormente, se evaluó la producción de lipasas en bioensayos en cultivo superficial.

Tabla 7.2 Cepas termófilas empleadas en este trabajo

| Nombre cepa | Grupo | Género | Número consecutivo | Código de cepa |
|---------------------|--------------|----------------------|---------------------------|-----------------------|
| T 2.9aC | I | <i>Thermomyces</i> | 29 | T29 |
| T 1.4eB | I | <i>Thermomyces</i> | 14 | T14 |
| T 2.5aB | I | <i>Thermomyces</i> | 25 | T25 |
| T1.10aB | I | <i>Thermomyces</i> | 110 | T110 |
| T1BcIV | I | <i>Thermomyces</i> | 1B | T1B |
| T2.7cB | I | <i>Thermomyces</i> | 27 | T27 |
| T 1.6 bB | I | <i>Thermomyces</i> | 16 | T16 |
| R 1.7eB | I | <i>Rhizopus</i> | 17 | R17 |
| R1.8cB | I | <i>Rhizopus</i> | 18 | R18 |
| R 2.1B | I | <i>Rhizopus</i> | 21 | R21 |
| H 4.4A | I | <i>Helicosporium</i> | 44 | H44 |
| 1Bd V s-2 | II | X | 1B | X1B |
| 2CaII s-1 | II | X | 2C | X2C |
| 2cc IV | II | X | 2CC | X2CC |
| 2V1s-1 | II | X | 2V | X2V |
| 3 cV s-3 | II | X | 3C | X3C |
| 5-s-2 | II | <i>Thermomyces</i> | 5S | TX5S |
| 4 Va IV | II | X | 4V | X4V |
| 2 ccIV s-1b | II | X | 2B | X2B |
| 2ccIV s-1 | II | X | 2S | X2S |
| 2b Vs-22 | II | X | 2BV | X2BV |
| 2Va IV s-2 | II | X | 2S2 | X2S2 |
| Sba III s-2 | II | X | S2 | XS2 |
| 3 Cb IV | II | X | 3C | X3C |
| 3 vB III s-1 | II | X | 3V | X3V |
| 3 Vs-1 | II | X | S | XS |
| 2cc 1 IV | II | X | 2C | X2C |
| 3 S-2 | II | X | S2 | X3S2 |

X = No identificada

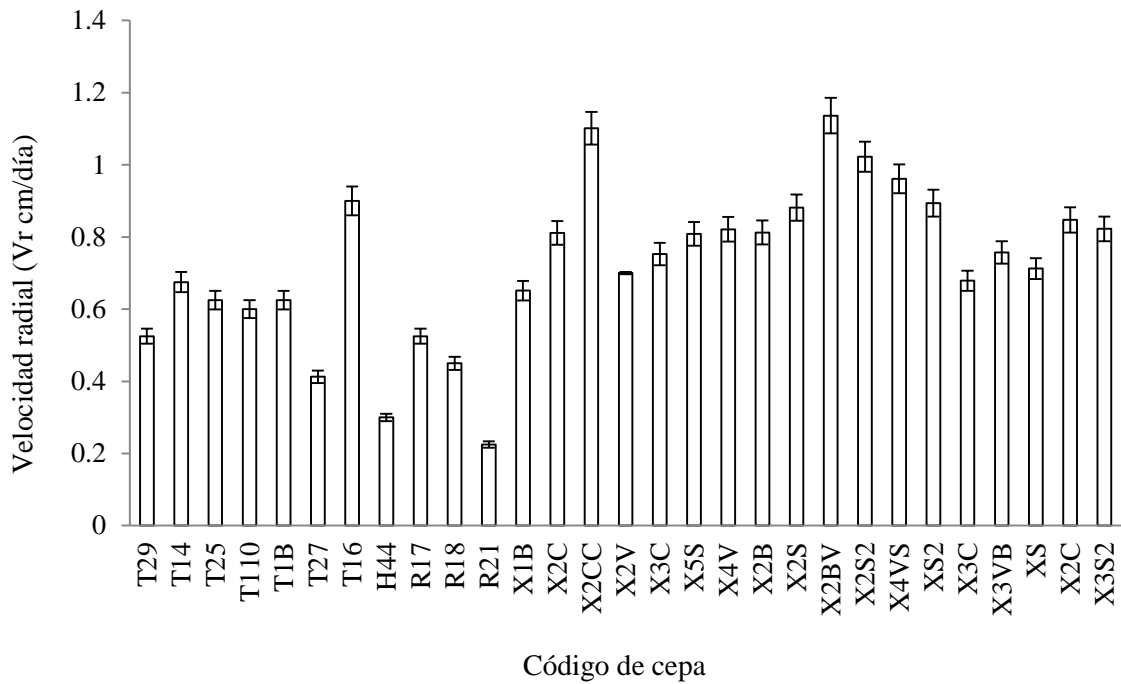


Fig. 7.1 Determinación de la velocidad radial de crecimiento por cepas termófilas del grupo I y II, temperatura de ensayo 40 °C. Las barras de error representan la desviación estándar de los experimentos realizados por triplicado.

7.3 Determinación de actividad lipasa en cultivo superficial

Para determinar la presencia de actividad lipasa en las cepas empleadas en este estudio, se utilizó el índice de potencia (I.P.) definido como la relación de diámetros de halo de hidrólisis y de colonia fúngica (Fig. 7.2).

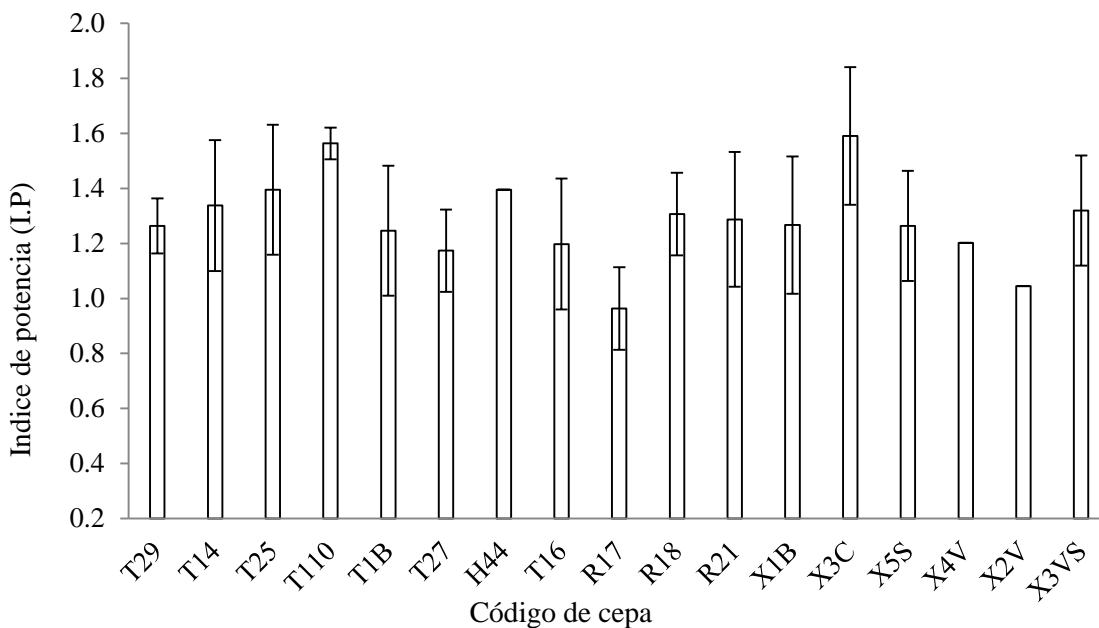


Fig. 7.2 Valores de I.P. presentados por las cepas termófilas del grupo I y II. Las barras de error indican la desviación estándar de los experimentos realizados por triplicado.

De las 29 cepas evaluadas, 17 cepas presentaron actividad lipasa a través de la formación de halos de hidrólisis. Las cepas T110 y X3C presentaron los mayores I.P. (alrededor de 1.6). Las cepas T14, T25, T29, H44, X5S presentaron valores de I.P superiores a 1.2. Los menores valores de I.P se obtuvieron con las cepas R17 y X2V. Con respecto a estos valores, un análisis de varianza fue realizado mostrando que no existe diferencia significativa ($\alpha=0.05$) en cuanto al valor de I.P obtenido entre grupo de cepas, identificadas y no identificadas, así como entre géneros.

Los valores de I.P y Vr fueron analizados de manera conjunta (Fig. 7.3), un aspecto que destaca es que altas Vr no indican un alto I.P y viceversa. Llama la atención el comportamiento presentado por las cepas H44 y R21 que presentan altos valores de I.P. y bajos valores de Vr. En contraste, las cepas T16 y X2V presentan valores promedio de I.P y Vr presentando una relación muy cercana a la unidad. Por lo tanto con base en los resultados obtenidos se preseleccionaron las cepas con mayor Vr que presentaron halos de actividad lipasa (T16, X4V, X5S, T110, T25 y X2V), con valores de Vr entre 0.5 y 0.7 cm/día y 4 cepas con valores de I.P. entre 1.0 y 1.5. En esta etapa también se preseleccionaron todas las cepas del género *Rhizopus* la razón de seleccionar éstas cepas fue la presencia de actividad lipasas y altas Vr. Así mismo dos controles fueron considerados; las cepas X2C y X2S2 presentaron altas Vr y nula actividad lipasa.

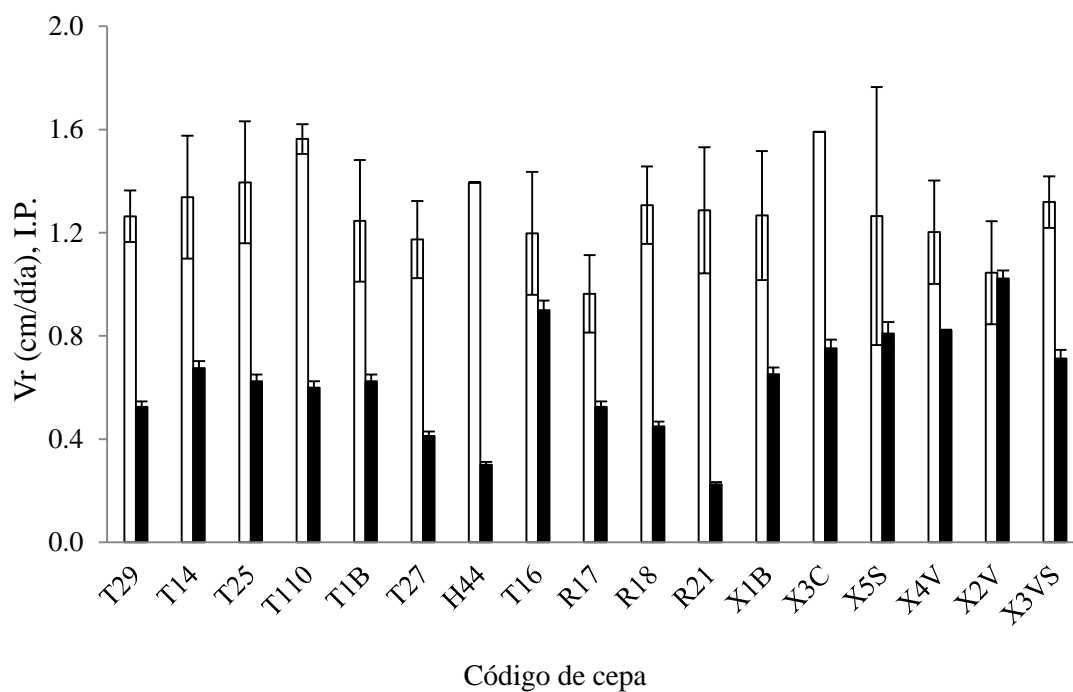


Fig. 7.3 Comparación entre el I.P (□) y la Vr (■) de las cepas termófilas preseleccionadas. Las barras de error indican la desviación estándar de los experimentos realizados por triplicado.

Datos de V_r muy cercanos a la unidad fueron obtenidos en este trabajo, esto coincide con lo reportado por Kuthubutheen y col., 1983 por *T. lanuginosus* crecida sobre agar, con diferentes fuentes de carbono y nitrógeno que fueron incorporadas en el medio. También, resultados similares fueron reportados al variar la fuente de nitrógeno empleada (urea, sulfato de amonio, nitrato de amonio) con valores de 0.26, 1.26 y 1.06 cm/día (Kuthubutheen, 1983).

7.4 Selección de cepas termófilas

Con la finalidad de corroborar que las cepas empleadas en este trabajo fueran termófilas se realizó un estudio en caja de Petri con medio PDA incubadas a 30, 40, 45 y 50 °C (Fig. 7.4). Las cepas del género *Rhizopus* (R18, R17 y R21) presentan las mayor V_r a 30 y 45°C; sin embargo, su crecimiento a 50 °C es bajo (<0.3 cm/día). El resto de las cepas (excepto T1B) presentan su mayor V_r (>0.7 cm/día) a 50 °C y no presentaron crecimiento a 30 °C, reflejando su característica de termofilia; es decir, ausencia de crecimiento a 30 °C y crecimiento a temperaturas de hasta 50 °C. Por su falta de crecimiento a 50 °C la cepa T1B fue descartada.

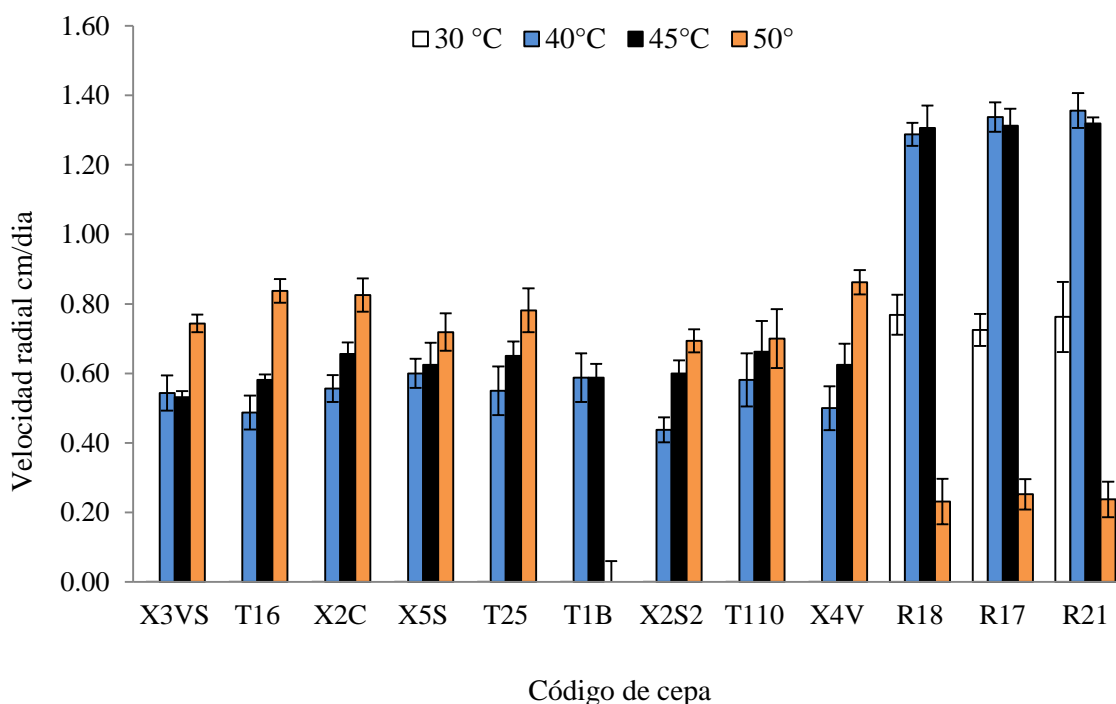


Fig. 7.4 Velocidades radiales (V_r) determinadas a diferentes temperaturas 30 (□), 40 (■), 45 (■) y 50 °C (■). Las barras de error indican la desviación estándar de los ensayos realizados por triplicado.

En la Fig. 7.5 se presenta el I.P. de las cepas en función de la Vr. En uno de los cuadrantes se concentra el mayor número de cepas (6) con mayores valores de I.P. y Vr. Por otro lado, en el cuadrante de abajo a la derecha se ubican tres cepas con valores similares de Vr e I.P. (cercanos a la unidad). En el caso particular del primer cuadrante 2 cepas son ubicadas, con alta Vr y bajo I.P. Por lo tanto con el parámetro I.P. identificamos las cepas potencialmente productoras de lipasas, en cuanto a Vr, éste parámetro nos indica la velocidad de crecimiento radial, para colonizar la superficie del cultivo.

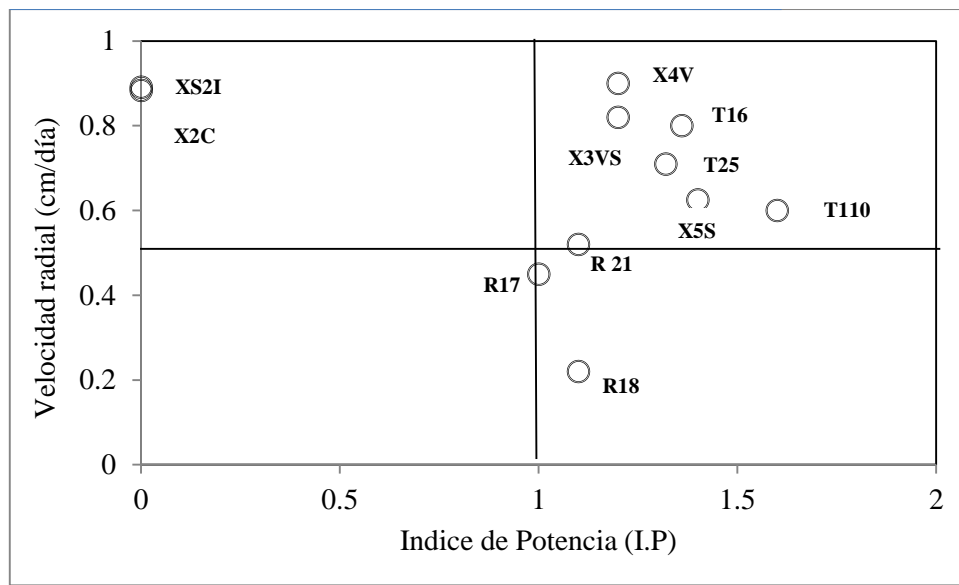


Fig. 7.5 Relación del I.P. vs Vr de las cepas preseleccionadas para cultivo sólido a temperaturas de ensayo de 40 °C.

A continuación se determinó la producción de lipasas en fermentación en medio sólido por las 11 cepas preseleccionadas, mostradas en la Fig. 7.5.

7.5 Producción de lipasas en cultivo sólido

Con base en los resultados de termofilia y halos de hidrólisis producidos por la detección de actividad lipasa, se preseleccionaron 6 cepas del género *Thermomyces* (3 no identificadas), 3 del género *Rhizopus* y 2 cepas más no identificadas y con nula actividad lipasa para ser evaluadas en cultivo en medio sólido empleando agrolita como soporte inerte. Los estudios se realizaron en matraces Erlenmeyer con 2.7 g de soporte seco impregnado con medio Pontecorvo 3x e inoculados con un disco de micelio (diámetro aproximado de 1 cm) incubado previamente durante 5 días en cultivo superficial. El contenido de humedad fue ajustado a 65 %, pH inicial de 6.5 e incubados a 40 °C como se muestra en la figura (Fig. 7.6.)



Fig. 7.6 Sistema de fermentación en matraces Erlenmeyer utilizado en la producción de lipasas por FMS a nivel matraz; temperatura de ensayo 40 °C.

De las 11 cepas evaluadas 4 cepas presentaron actividad lipasa mayor a 4 U/gms empleado como sustrato *p*-NPO, a las 64 h de cultivo. La curva de producción de actividad lipasa de estas 4 cepas mantuvo pendientes positivas, indicando la ausencia de actividad proteolítica al final del cultivo. Los mayores títulos de actividad lipasa (13 y 10.5 U/gms) se obtuvieron con las cepas T110 y X5S respectivamente (Fig. 7.7).

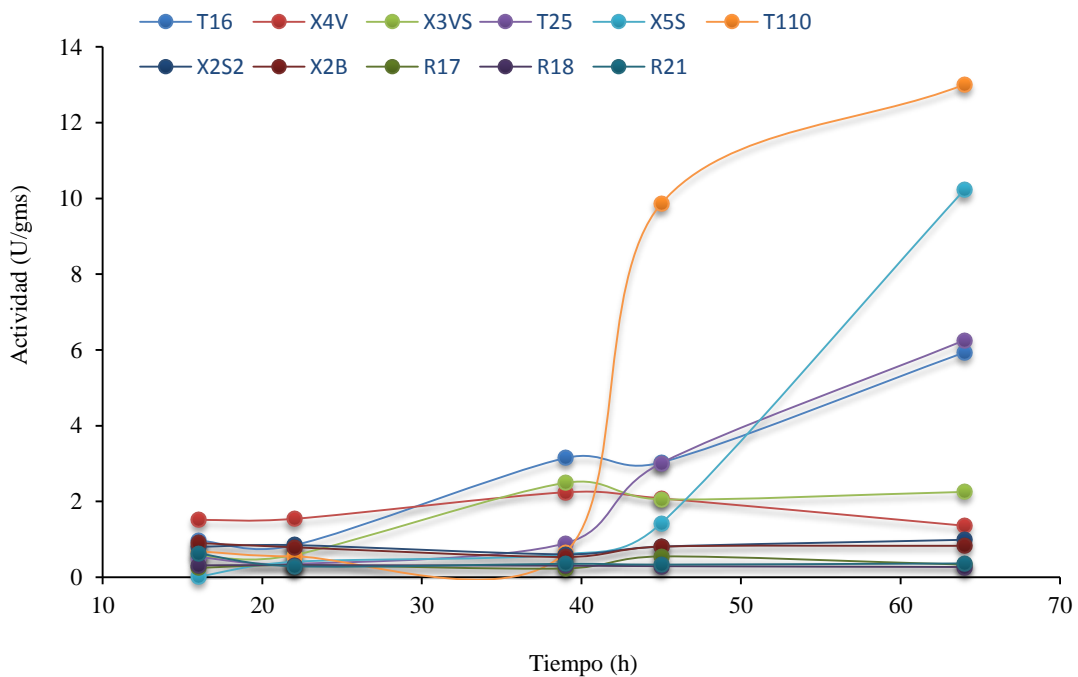


Fig. 7.7 Cinética de producción de lipasas por cultivo sólido durante un tiempo de cultivo de 65 h, 40 °C.

Un aspecto relevante durante la cinética fue la fase de inicio de producción de la enzima en la mayoría de las cepas (alrededor de 40 h) y su tiempo de máxima producción (de 45 a 64 h). Son pocos los reportes acerca de la producción de lipasas en cultivo sólido. En cultivo líquido se ha reportado un tiempo mínimo de inicio de producción de la enzima de 25 h como mínimo y hasta 144 h como máximo, con títulos de actividad entre 80 U/mL y 120 U/mL empleando una emulsión de aceite de oliva como sustrato, a temperaturas de 45 y 50 °C, con cepas similares *T. lanuginosus* (*Humicola lanuginosa*) (Omar y col., 1987; Morinaga y col., 1986).

En el caso del cultivo sólido no existen reportes acerca de la producción de lipasas por *Thermomyces*, pero sí de otras enzimas. Kamra y Satyanarayana (2004) reportaron títulos de producción de xilanasas de 7,832 U/g empleando como sustrato salvado de trigo a un tiempo de cultivo de 72 h. Asimismo, Ali y col. (2010) reportaron una cepa de *Humicola lanuginosa* modificada genéticamente en la producción de β -xilosidasa con tiempos de máxima producción de 56-64 h. Estos tiempos se relacionan directamente con los reportados por cepas de *Thermomyces* en este trabajo. En contraste, estudios realizados por Gaffney y col., 2009 muestran tiempos de retardo menores durante la fase de producción de enzimas xilanasas en cultivo sólido; obteniendo títulos de producción superiores a 2,335 U/gms después de 40 h de cultivo. Por otro lado, durante la producción de invertasas por *T. lanuginosus* se reportan tiempos de inicio de producción de enzima de 12 h (Chaudhuri y col., 1999). Otros trabajos realizados con *T. lanuginosus* han reportado fases de retardo en la producción de amilasas de hasta 120 h en medio sólido (Kunamneni y col., 2005). Con base en los resultados obtenidos se seleccionaron las cepas T110 y X5S para continuar los estudios de producción de lipasas en FMS y caracterización catalítica de las lipasas producidas.

Capítulo 8

Producción de inóculo en medio líquido

8.1 Producción de inóculo en medio líquido

En esta etapa del trabajo la cepa X5S fue identificada como una cepa perteneciente al género *Thermomyces lanuginosus* (Anexo B) por lo que a partir de este momento será codificada como T5S. Por otra parte un aspecto importante, presentando por ambas cepas fue el bajo nivel de esporulación para las cepas seleccionadas (T110 y T5S) lo que condujo al establecimiento de la producción de pre-inóculo en forma de micelio en cultivo en medio líquido. Por lo que, se procedió a la selección del medio de cultivo líquido y condiciones de producción de pre-inóculo en el medio seleccionado. Se evaluó la Vr en 4 medios de cultivo (PDA, EMA, SAB y Pontecorvo) en condiciones de cultivo superficial a 40 °C. (Tabla. 8.1). Para ambas cepas se obtuvo la mayor Vr con el medio Pontecorvo; por lo que este medio fue seleccionado para la producción de pre-inóculo.

Tabla 8.1 Velocidades radiales de las 2 cepas preseleccionadas, para cultivo sólido en diferentes medios de cultivo a temperaturas de ensayo de 40 °C.

| Medio de cultivo | | | | |
|------------------|------------|------------|------------|-------------|
| Código de cepa | PDA | EMA | SAB | PONTECORVO |
| Vr (cm/día) | | | | |
| T110 | 0.559±0.02 | 0.535±0.03 | 0.489±0.04 | 0.700±0.030 |
| T5S | 0.468±0.03 | 0.540±0.05 | 0.463±0.02 | 0.481±0.070 |

8.2 Producción de pre-inóculo

Para los estudios de crecimiento en medio líquido fue necesario desarrollar un procedimiento para obtener un inóculo homogéneo y poder así obtener micelio desagregado durante la producción del pre-inóculo en medio líquido. Para ello, en una primera etapa se evaluó la producción del pre-inóculo en medio superficial con y sin celofán sobre el medio de cultivo, la razón de incluir el uso de membranas de celofán durante el ensayo, fue asegurar una buena desagregación del micelio producido en cultivo superficial lo que aseguraría una suspensión homogénea. El micelio obtenido en cultivo sólido fue sometido a desagregación con perlas de vidrio y agitación manual de 1 a 3 minutos y usado como pre-inóculo para los estudios de producción de inóculo (micelio) en cultivo líquido.

La biomasa final obtenida en cultivo líquido fue independiente de la presencia de celofán y del tiempo de desagregación (Fig. 8.1) para solo una de las cepas empleadas en esta etapa; por lo que, para la producción del pre-inóculo en cultivo superficial se decidió: emplear una membrana de celofán para facilitar la recuperación del micelio para su desagregación manualmente durante 2 min, obteniendo un micelio en buen estado.

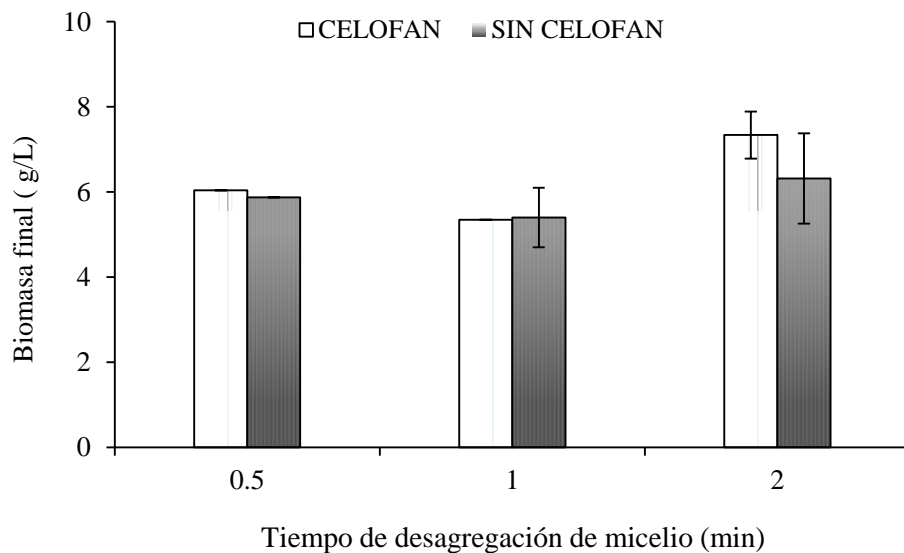


Fig. 8.1 Efecto del uso de membrana de celofán (cultivo superficial) y del tiempo de desagregación del micelio sobre la producción de biomasa en cultivo líquido para la cepa termófila T110 a temperaturas de ensayo de 40 °C. Las barras de error indican la desviación estándar de los experimentos desarrollados por duplicado.

De esta forma una vez que se establecieron las condiciones de producción y desagregación del pre-inóculo, se determinaron las condiciones de producción del inóculo. Para ello, se utilizó el medio Pontecorvo (1X) modificado (ver Métodos y Materiales), evaluando en una primera etapa la relación de fuentes de nitrógeno ($(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4/\text{Urea}$) presentes en el medio, sobre el crecimiento de *T. lanuginosus* T110 y T5S (Fig. 8.2).

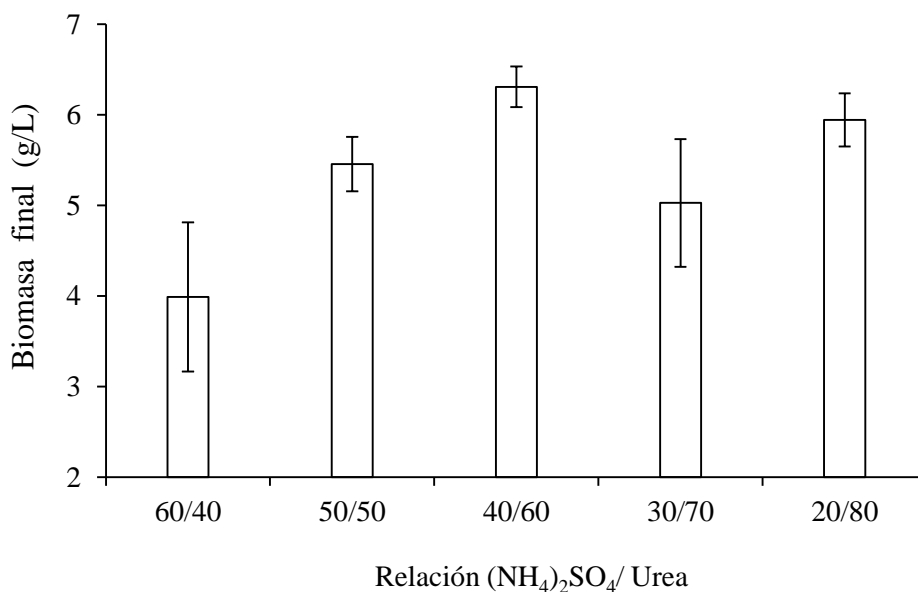


Fig. 8.2 Efecto de la relación sulfato de amonio/urea sobre la producción de biomasa en medio líquido para la cepa termófila T110, 40 °C. Las barras de error indican la desviación estándar de los experimentos realizados por duplicado.

La biomasa final es similar para medios de cultivo enriquecidos en urea, desde relaciones sulfato de amonio/urea 50/50 a 20/80. La menor producción de biomasa se obtuvo en medio enriquecido con sulfato de amonio. Omar y col. (1987) demostraron que al usar peptona y extracto de levadura como fuentes de nitrógeno se obtienen valores de actividad lipasa (50 U/mL) superiores a los obtenidos (30-35 U/mL) con sulfato de amonio. Otros tipo de enzimas como las xilosidasas han mostrado que la mejor fuente de nitrógeno resultó ser licor de maíz con cepas de *T. lanuginosus*, seguidas del nitrato de sodio, sulfato de amonio, mezclas sulfato y nitrato de amonio y urea alcanzando títulos de actividad de 600 U/g sustrato para una cepa parental y mutante de *Humícola lanuginosa*.

Estudios similares realizados por Gaffney y col., 2009 mostraron que la urea es la mejor fuente de nitrógeno empleada. Empleando extracto de levadura y nitrato de potasio se obtuvo el 80 % actividad relativa en comparación con el control. En contraste las sales que más afectaron esta actividad fueron fosfato y sulfato de amonio (40 % actividad relativa) debido a los cambios ocasionados en el pH final del medio. Por lo que otro parámetro monitoreado durante la producción de inóculo en medio líquido fue el pH final.

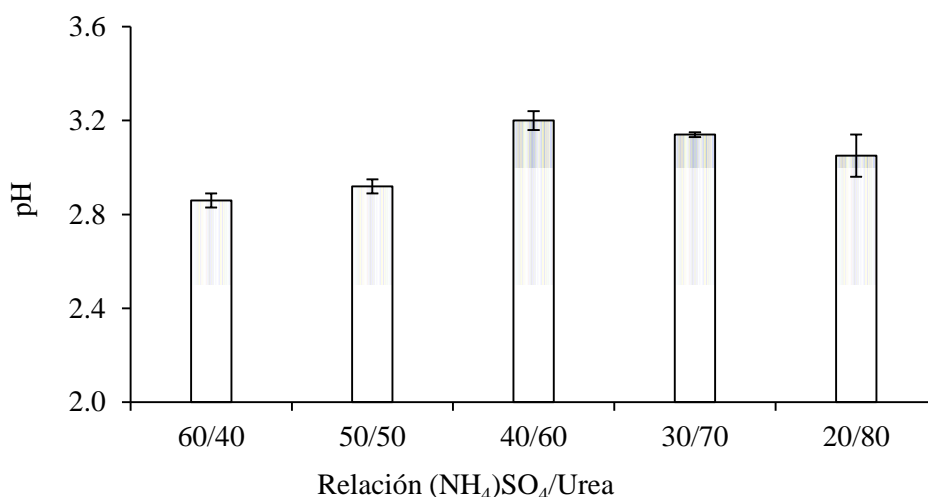


Fig. 8.3 Comportamiento de pH obtenido con diferentes relaciones de nitrógeno (NH₄)₂ SO₄/Urea para la cepa termófila T110 a 40 °C. Las barras de error indican la desviación estándar de los experimentos realizados por duplicado.

Con el objetivo de obtener un micelio en buen estado fisiológico se prefieren tener valores de pH cercanos a la neutralidad. Los análisis realizados registraron valores muy bajos de pH ácido (<3.5) (Fig. 8.3); por lo que se decidió incrementar la concentración de fosfato de potasio al medio de cultivo con relación sulfato de amonio/urea de 40/60, y se modificó la concentración de iones fosfatos a través del empleo de un par conjugado de sales (amortiguador), es decir, empleando amortiguador, K₂HPO₄/KH₂PO₄ (2.4 y 14.0 g/L). Asimismo al realizar el análisis estadístico, se determinó que no existe diferencia significativa en la biomasa producida al modificar las concentración de KH₂PO₄ (Fig. 8.4); sin embargo, el pH final fue significativamente mayor al usar concentraciones de KH₂PO₄ mayores a 5 g/L (Fig. 8.5).

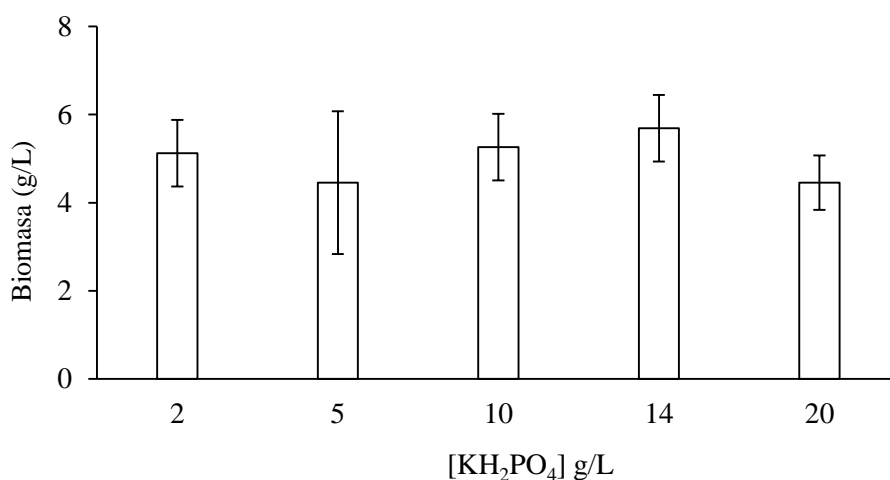


Fig. 8.4 Producción de biomasa (g/L), obtenida en cultivo superficial a diferentes concentraciones de KH₂PO₄ por la cepa termófila T110 durante cultivos de 48 h, temperatura de ensayo de 40 °C. Las barras de error indican la desviación estándar de los experimentos realizados por duplicado.

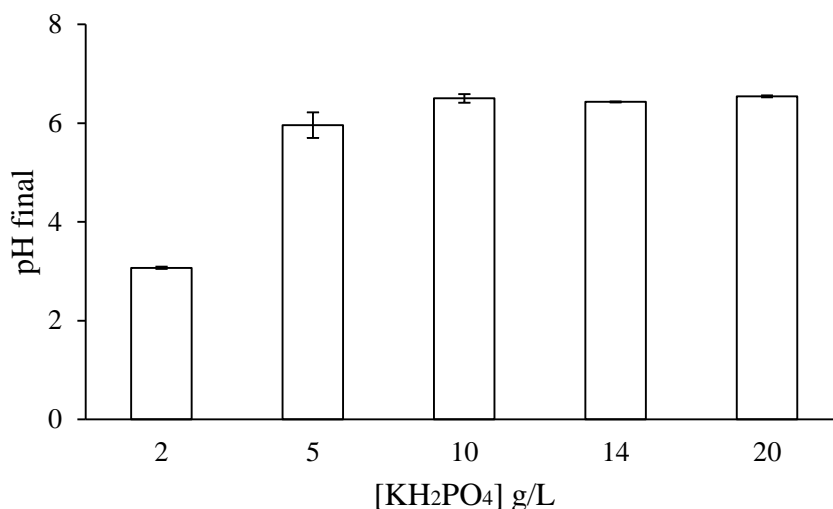


Fig. 8.5 Efecto de la concentración y tipo de amortiguador sobre el pH final del medio para la producción de inóculo por la cepa termófila T110 durante cultivos de 48 h a temperaturas de ensayo de 40 °C. Las barras de error indican la desviación estándar de los experimentos realizados por duplicado.

Estudios realizados por diversos autores, reportan el uso del par conjugado [KH₂PO₄]/ [K₂HPO₄] con efecto amortiguador. De esta manera hongos como *Thermomyces lanuginosus* (Gómez y col., 1993; Puchart y col., 2008; Jensen y col., 2002) y *Rhizopus homothallicus*, (Mateos-Díaz y col., 2006) han empleado esta fuente de fósforo con efecto amortiguador en cultivo líquido para la producción de biomasa. Por lo tanto, una vez que se diseñó el medio de cultivo para la producción de inóculo en medio líquido se procedió a realizar cinéticas de crecimiento en cultivo líquido para determinar el tiempo de incubación para la producción de pre-inóculo.

8.3 Cinéticas de producción de inóculo en medio líquido

Las cinéticas muestran que ambas cepas (*T. lanuginosus* T110 y *T. lanuginosus* T5S) presentaron crecimiento máximo (de 5 a 15 g/L) a las 48 h de cultivo, manteniéndose constante hasta las 120 h. El perfil de crecimiento fue similar para ambas cepas como se observa en la Fig. 8.6.

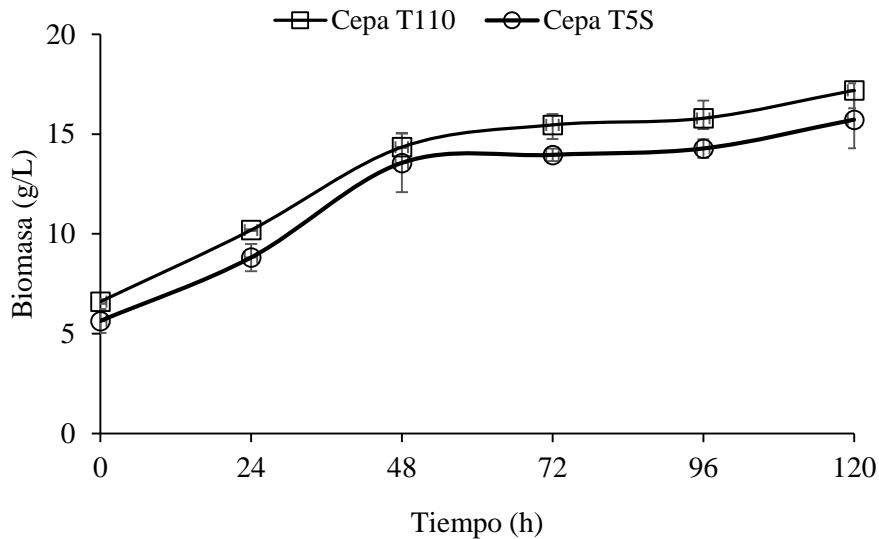


Fig. 8.6 Producción de biomasa obtenida durante la cinética de crecimiento en cultivo líquido para las cepas T110 y T5S durante 120 h de cultivo. Las barras de error indican la desviación estándar de los experimentos realizados por duplicado.

El comportamiento del pH también fue monitoreado. Para ambas cepas, los perfiles de pH fueron similares, pH de 6.5 fue ajustado al inicio del cultivo y este disminuyó a lo largo de la cinética. Sin embargo, es importante destacar que la adición del par conjugado $[KH_2PO_4/ [K_2HPO_4]$ tuvo un efecto amortiguador importante presentando un valor de pH de 5.54 y 5.66 a las 48 h de cultivo (Fig. 8.7).

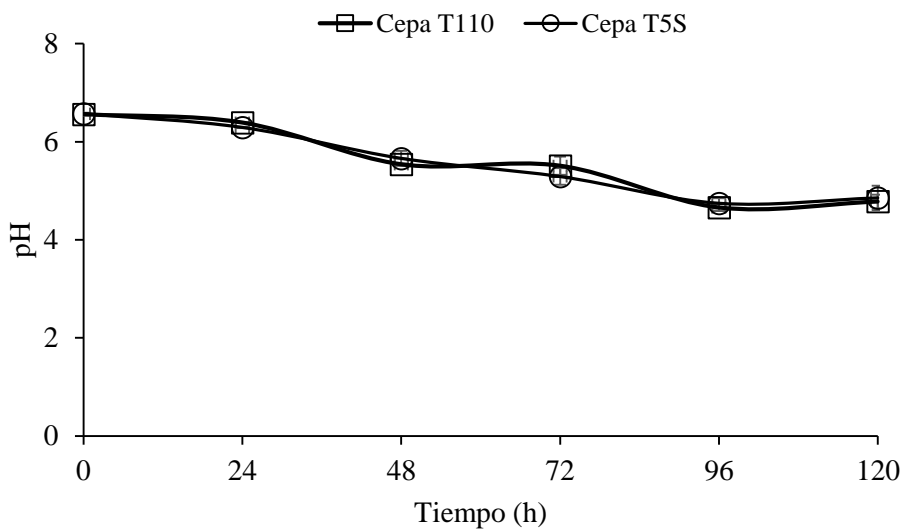


Fig. 8.7 Cinética del comportamiento del pH durante un tiempo de cultivo de 48 h. Las barras de error indican la desviación estándar de los experimentos realizados por duplicado.

En la Fig. 8.8 es mostrado el consumo de la fuente de carbono (glucosa 28 g/L) en función del tiempo. La tasa de consumo de glucosa aumenta después de las primeras 24 h para ambas cepas. Después de

96 h de cultivo la fuente de carbono es completamente consumida. Diversas fuentes de carbono como glucosa, xilosa y lactosa han sido empleadas para el crecimiento y producción de enzimas lipasas, invertasas, xilanasas y amilasas por algunas cepas de *T. lanuginosus*; (Jensen y col., 1987; Jensen y col., 2002). En cultivo líquido, bajas concentraciones de fuente de carbono son preferibles, tal es el caso del trabajo realizado por Aguilar y Huitrón (1987) con una cepa de *Aspergillus* sp., en donde la adición de glucosa y ácido galacturónico a una concentración mayor a 5 g/L, ocasiona problemas de represión catabólica en la producción de enzimas pectinasas.

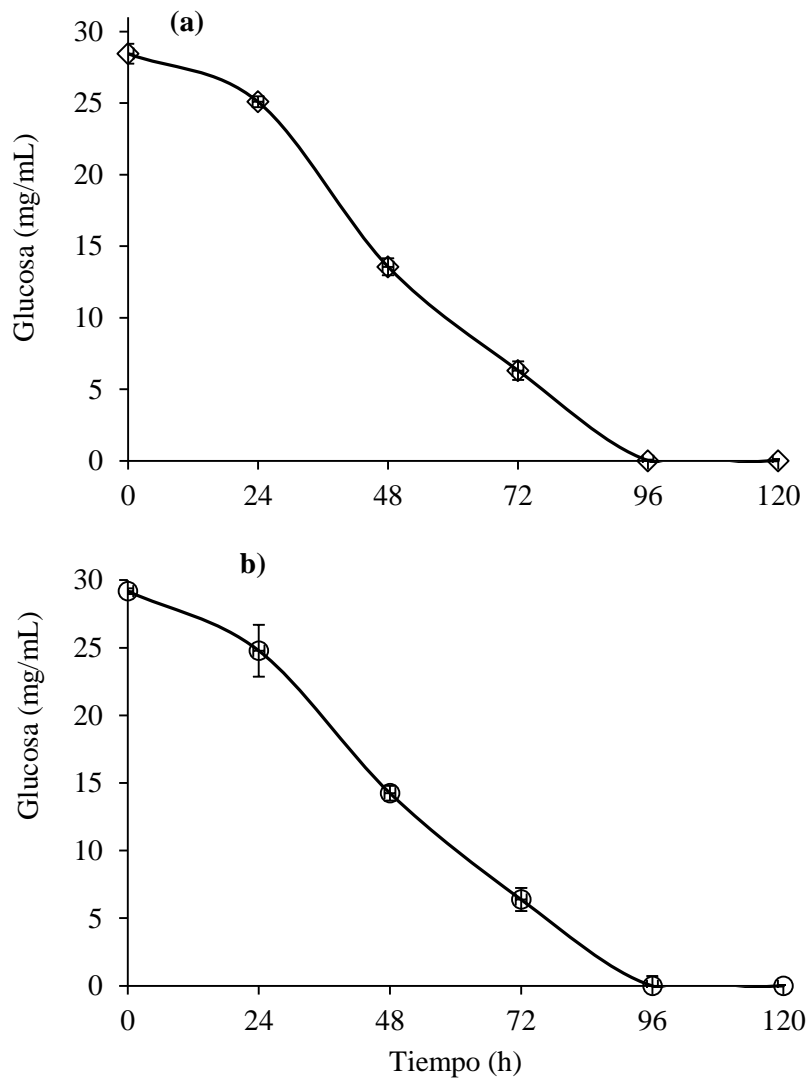


Fig. 8.8 Consumo de glucosa en función del tiempo durante el cultivo en FMS por *T. lanuginosus* (a) T110 y (b) T5S. Las barras de error indican la desviación estándar de los experimentos realizados por duplicado.

En contraste Aguilar y col., 2001 han demostrado el uso de altas concentraciones de glucosa (200 g/L) en cultivo sólido y en cultivo líquido (50 g/L) para la producción de tanasas por cepas de *Aspergillus niger*. Las cinéticas de producción de inóculo en medio líquido fue realizado repetidas veces (Anexo C1) obteniendo una alta reproducibilidad en los resultados.

Por lo tanto, con base en los resultados obtenidos en esta etapa experimental, para la producción del inóculo se decidió seguir el siguiente procedimiento. Se utilizaron matraces Erlenmeyer de 125 mL con 30 mL de medio de cultivo Pontecorvo (1X) con una relación sulfato de amonio/urea de 40/60 y una concentración de KH_2PO_4 y K_2HPO_4 de 14 y 2.4 g/L, respectivamente. El medio líquido se inóculo con 3 discos de micelio producidos en medio PDA con celofán desagregados durante 2 min en 2 mL de medio de cultivo y 4 g de perlas de vidrio. Después de 72 h de cultivo líquido, el medio fue utilizado directamente como inóculo para los estudios de FMS.

Capítulo 9

Producción de
biocatalizadores por las
cepas termófilas *T.*
lanuginosus T110 y T5S

9.1 Producción de biocatalizadores por fermentación en medio sólido

Una vez establecidas las condiciones de producción de inóculo se procedió a estandarizar las condiciones de producción del biocatalizador. Para ello, se consideraron diversos factores, entre ellos: tamaño de inóculo, temperatura y contenido de humedad inicial.

9.2 Efecto del tamaño de inóculo

Se evaluaron tamaños de inóculo de 5, 10 y 20 % v/v, con respecto al volumen del medio de cultivo empleado en la fermentación. Una de las variables de respuesta estudiadas durante esta sección fue la tasa máxima de producción de CO₂ y la producción de CO₂ en función del tamaño de inóculo (Fig. 9.1). La tasa máxima de producción de CO₂ para T110 se obtiene con un tamaño de inóculo del 10%, en el caso de la cepa T5S puede notarse que al incrementar el tamaño de inóculo esta variable también aumenta. Para ambas cepas la producción final de CO₂ incrementa al aumentar el tamaño de inóculo; esto puede ser debido a la glucosa residual presente en el pre-inóculo (6-7 g/L).

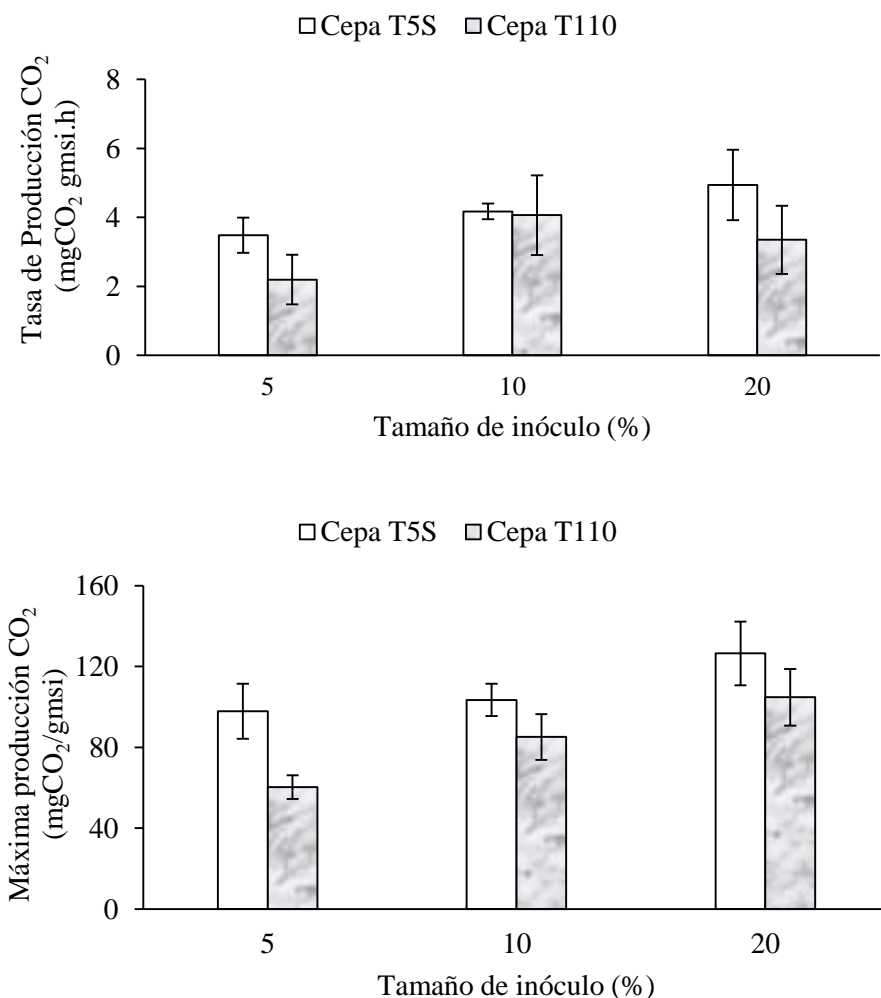


Fig. 9.1 Efecto del tamaño de inóculo en la tasa y máxima producción de CO₂ por las cepas termófilas T110 y T5S. Las barras de error indican la desviación estándar de los experimentos realizados por duplicado.

Los datos de producción de CO₂ permitieron obtener los valores de tiempo lag y tasa específica de crecimiento a partir de la producción de CO₂. Aunque las diferencias no resultaron ser significativas (ANOVA $\alpha=0.05$), se observa que el tiempo lag es menor al aumentar el tamaño de inóculo (7 a 6 h); este efecto es más claro para la cepa T110 y un perfil similar es obtenido en la cepa T5S (Fig. 9.2). Los valores obtenidos, fueron comparados con lo reportado en la literatura, presentando similitud con estudios realizados por Gomes y col., (1993) con una cepa de *T. lanuginosus* cultivada en medio líquido a 50 °C, cuya fase de retardo fue de 10 h.

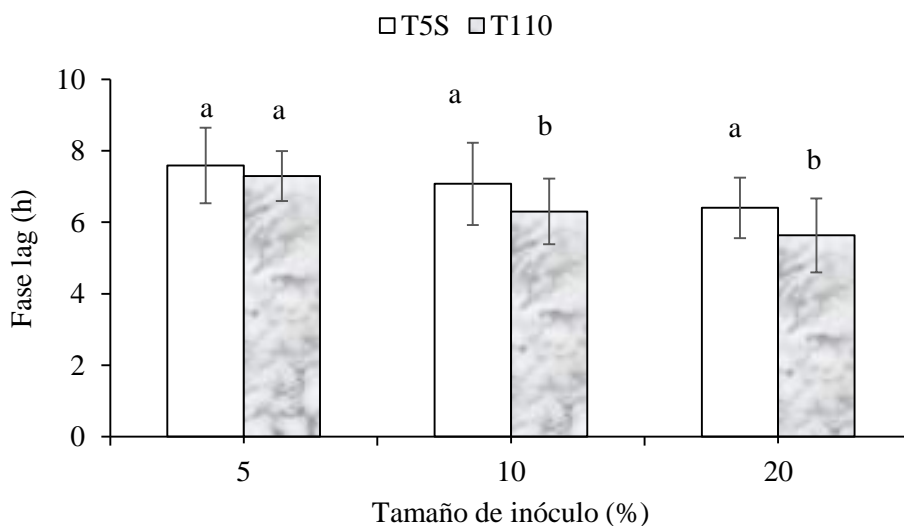


Fig. 9.2 Valores de fase lag obtenidos para ambas cepas termófilas durante la FMS en columnas. Las barras de error indican la desviación estándar de los experimentos realizados por duplicado.

Los valores de tasa específica de crecimiento obtenidos en este trabajo para ambas cepas oscilaron en un rango de 0.3- 0.5 1/h (Tabla 9.1). Estos valores fueron similares a los reportados por una cepa recombinante *A. niger* empleada como sistema de expresión para las lipasas producidas por *T. lanuginosus* (Prathumpai y col., 2004). Asimismo, Gomes y col., (1993) reportaron tasas específicas de crecimiento menores, en un rango de 0.10 a 0.31 1/h para *T. lanuginosus* en cultivo sumergido. Por otro lado, Jensen y col. (1993) reportaron altas tasas específicas de crecimiento (entre 0.46 y 0.89 1/h) durante el crecimiento bifásico de *T. lanuginosus* en medio YPS enriquecido.

Una de las variables más relevantes durante el estudio de tamaño de inóculo fue la actividad enzimática. La producción de actividad lipasa por la cepa T5S fue prácticamente independiente del tamaño de inóculo (alrededor de 56-62 U/gms). En cambio, la actividad producida por la cepa T110 fue mayor con los tamaños de inóculo de 10 y 20 % v/v (aprox. 38 U/gms) (Fig. 9.3).

Tabla 9.1 Evaluación del tamaño de inóculo en los valores de tasa específica de crecimiento (μ), para las cepas termófilas T110 y T5S. (ANOVA $\alpha=0.05$). Letras iguales significa que no hay diferencia significativa.

| Cepa | Tamaño de inóculo (%) | Tasa específica de crecimiento(μ) (1/h) |
|------|-----------------------|---|
| T5S | 5 ^a | 0.353 |
| | 10 ^a | 0.357 |
| | 20 ^b | 0.467 |
| T110 | 5 ^a | 0.502 |
| | 10 ^b | 0.440 |
| | 20 ^a | 0.461 |

Al realizar la prueba estadística ANOVA, con un alfa $\alpha=0.05$ pudo determinarse que no existe diferencia significativa en la variable actividad enzimática al evaluar el tamaño de inóculo de 20% para la cepa T5S. En contraste para la cepa T110 un tamaño de inóculo de 10% fue significativamente diferente de tamaños 5 y 20%. Asimismo este análisis nos permitió conocer que la actividad producida por la cepa T5S es significativamente diferente con respecto a la cepa T110. Por lo que para estudios posteriores se decidió trabajar con un tamaño de inóculo del 10 %.

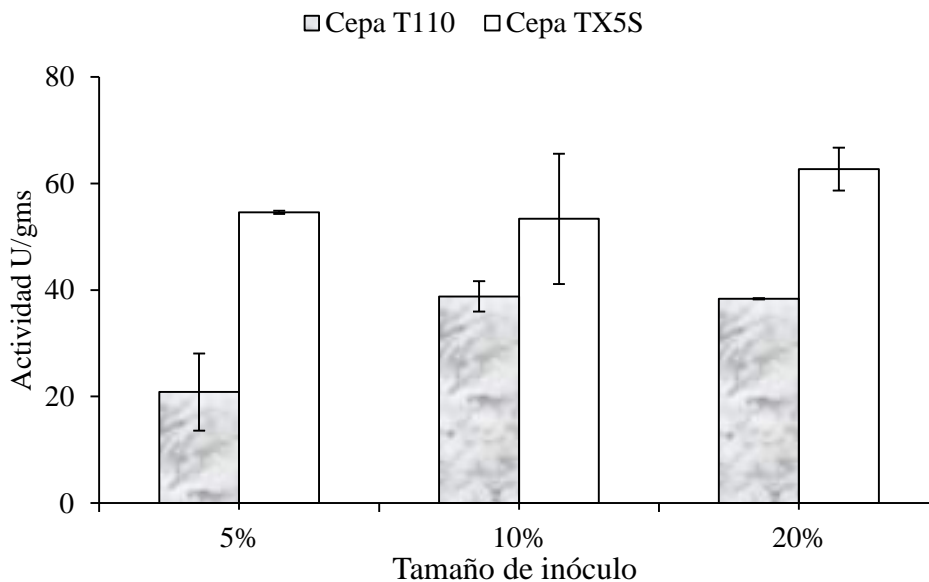


Fig. 9.3 Títulos de actividad lipasa obtenida a diferentes tamaños de inóculo por las cepas termófilas T110 y T5S. Las barras de error indican la desviación estándar de los experimentos realizados por duplicado.

Azeredo y col. (2007) evaluaron la producción de lipasas con una cepa mesófila de *Penicillium restrictum* en cultivo sólido, alcanzando producciones de 17.4 U/gms, empleando bagazo de caña como soporte- sustrato. Por otro lado, Mateos-Díaz y col. (2006) reportaron títulos de actividad lipasa superiores a los obtenidos en este trabajo con un valor de 1500 U/gms para una cepa termotolerante de *Rhizopus homothallicus* en FMS. Morinaga y col., (1986) reportaron la producción de 2 lipasas en cultivo líquido por la cepa *Humicola lanuginosa* var. *catenulata*, los títulos de actividad enzimática se situaron entre las 12 y 15 U/mL empleando una emulsión de aceite de oliva como sustrato durante 7 días de cultivo. Asimismo, Omar y col. (1987), empleando una cepa similar de *Humicola* sp., sorbitol y licor de maíz en el medio, reportaron títulos de actividad de 80 y 120 U/mL. Sin embargo, un aspecto importante a considerar es que las actividades enzimáticas obtenidas en ambos sistemas (FMS y FML), no pueden ser directamente comparadas debido a la metodología empleada para la medición de actividad enzimática (métodos espectrofotométricos y título métricos) y al sustrato empleado (triglicéridos y ésteres de *p*-nitrofenol) (Beisson y col., 2000).

9.3 Efecto del pH inicial sobre la producción de biocatalizador por FMS

Se determinó el efecto del pH inicial (**pH_i**) del medio de cultivo a valores de 5 a 6.5 sobre la producción de CO₂ y de lipasas por ambas cepas de *Thermomyces lanuginosus*. El principal objetivo del estudio fue determinar el mínimo valor de pH_i del medio de cultivo que favorezca el crecimiento de *T. lanuginosus* y la producción de lipasas, limitando el crecimiento por contaminantes bacterianos.

9.3.1. Determinación de carga bacteriana en los cultivos de FMS a diferentes valores de pH

Durante el desarrollo de este estudio se realizaron observaciones microscópicas para determinar la presencia de bacterias y/o levaduras en los cultivos. La Fig. 9.5 muestra las observaciones realizadas durante el inicio de cultivo para ambas cepas. Puede observarse que durante las primeras horas existe una ligera concentración de contaminaciones bacterianas, sobre todo en el caso de un pH_i de 6.5 (Fig. 9.4 g, h). En todos los medios evaluados se observó buen crecimiento, formación de esporas y disminución de bacterias al aumentar el tiempo de incubación. A continuación Fig. 9.4 se muestra el crecimiento obtenido a diferentes valores de pH inicial, por ambas cepas termófilas.

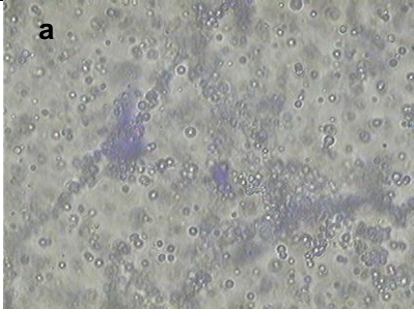



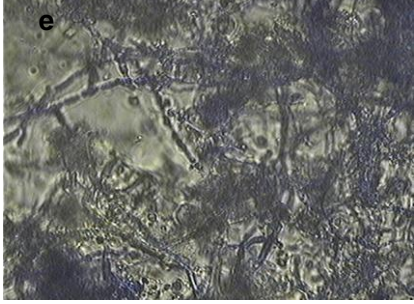
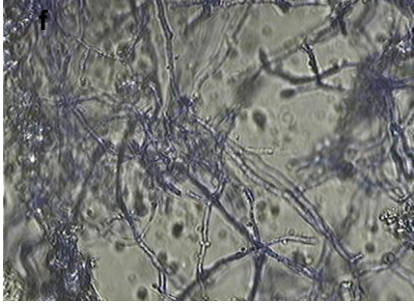
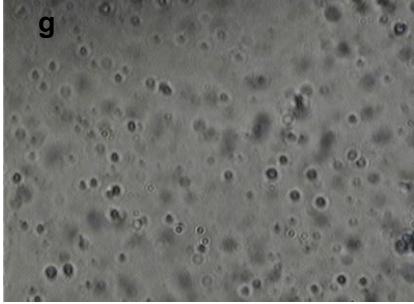
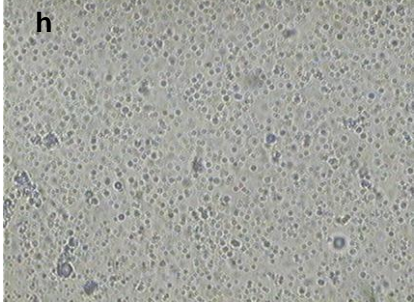
| pH _i | T110 | T5S |
|-----------------|---|---|
| 5.0 |  |  |
| 5.5 |  |  |
| 6.0 |  |  |
| 6.5 |  |  |

Fig. 9.4 Observaciones al microscopio de las cepas termófilas T110 y T5S en FMS durante las 72 h de cultivo (a, b, c, d, e, f). Inciso g y h a tiempos de incubación de 24 h.

9.3.2 Efecto del pH_i en la producción de CO₂ y de lipasas

El análisis de la producción de CO₂ se empleó para estimar algunos parámetros asociados al crecimiento de ambas cepas. En la Tabla 9.2, se muestran las tasas máximas de producción de CO₂, fases de retardo y tasas específicas de crecimiento, al modificar el valor de pH inicial del cultivo.

Tabla 9.2. Efecto del pH_i en los parámetros cinéticos de la FMS para las cepas termófilas T110 y T5S durante cultivos de 120 h.

| Cepa | pH _i | Máxima producción de CO ₂ (mg/gmsi) | Fase lag (h) | μ(1/h) |
|-------------------------------|-----------------|--|--------------|--------------|
| <i>T. lanuginosus</i> T5S | 5.0 | 137.61± 14.53 | 13.41± 1.10 | 0.206±0.023 |
| | 5.5 | 148.32±0.002 | 11.44±0.0 | 0.179±0.000 |
| | 6.0 | 111.49±7.76 | 5.24±1.06 | 0.348±0.000 |
| | 6.5 | 143.44± 9.12 | 4.85±1.75 | 0.340±0.012 |
| <i>T. lanuginosus</i> T110 | 5.0 | 162.43±10.50 | 15.81±0.59 | 0.210 ±0.014 |
| | 5.5 | 105.03±14.21 | 5.75±0.40 | 0.175±0.019 |
| | 6.0 | 99.80±1.92 | 5.94±0.41 | 0.125±0.012 |
| | 6.5 | 112.97±20.54 | 5.58±0.09 | 0.113±0.004 |

A valores de pH ácidos (5 y 5.5) se presenta buen crecimiento (Fig. 9.5), los datos de CO₂ en el caso de ambas cepas oscilan en un rango de 100-140 mg CO₂/gmsi, con respecto a este comportamiento diversos autores han señalado amplios intervalos de pH para el crecimiento de la cepa termófila *T. lanuginosus* desde pH ácidos a neutros pasando inclusive por alcalinos (Jensen y col., 1993, Pan y col., 2010; Chakravorty y col., 2011). Es importante destacar que a valores de pH de 6 y 6.5 se obtuvieron valores de producción de CO₂ ligeramente menores a los obtenidos a pH ácidos. Sin embargo, no se hallaron diferencias significativas en cuanto a la máxima producción de CO₂ en el caso de ambas cepas (ANOVA α=0.05).

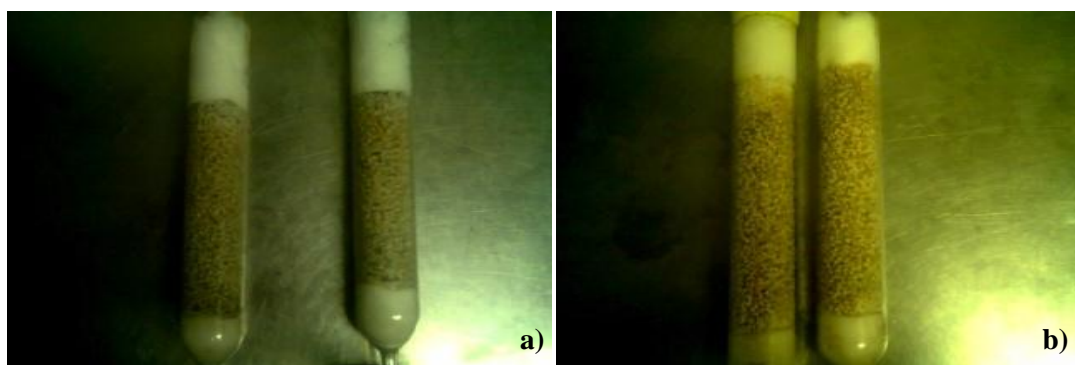


Fig. 9.5 Crecimiento de las cepas termófilas T110 y T5S a valores de pH_i a) 5 y b) 5.5.

Otro de los parámetros medidos durante este estudio fue la tasa específica de crecimiento (μ), los valores que se presentan oscilan en un rango de 0.17- 0.34/h y 0.10-0.20/h para T5S y T110, respectivamente. En la literatura se reportan tasas específicas de crecimiento similares (Jensen y col., 2002; Gomes y col., 1993; Prathumpai y col., 2004).

Por otra parte se observa que al incrementar el pH_i la fase de retardo disminuye, de tal manera que a valores de pH ácido (5 y 5.5) se obtienen períodos lag mayores a 11 h. A medida que el pH incrementa estos valores disminuyen hasta 5 y 6 h para las cepas T5S y T110, respectivamente (Tabla 9.1). Con relación a la producción de lipasas, ambas cepas presentaron la mayor actividad a pH_i 6. Asimismo el análisis ANOVA (alfa= 0.05) mostró que existe diferencia significativa al modificar el pH inicial del medio de cultivo durante la fermentación.

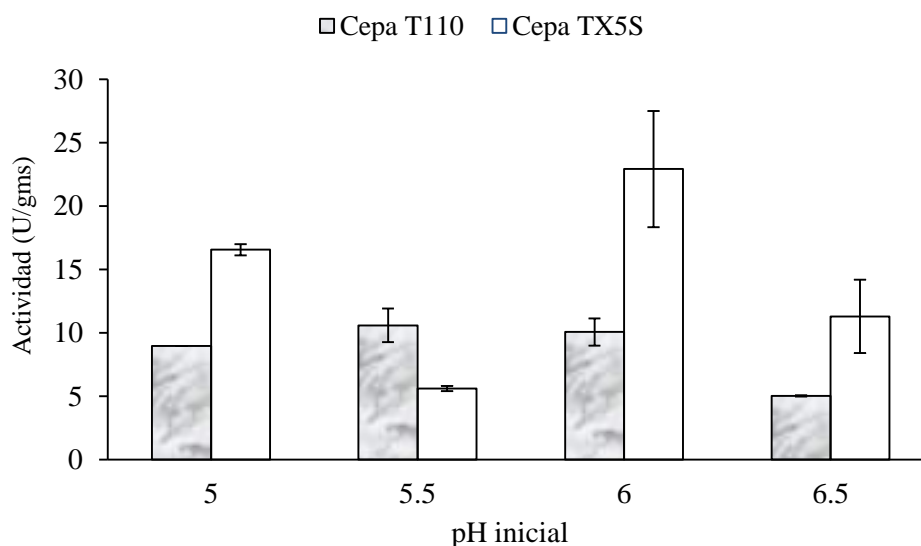


Fig. 9. 6 Efecto del pH inicial en la actividad enzimática para las cepas termófilas T5S y T110, temperatura de ensayo 40 °C. Las barras de error indican la desviación estándar de los experimentos realizados por duplicado.

Por lo tanto a partir de dichos resultados, los estudios posteriores de producción de lipasas en FMS se realizarán con un pH_i de 6. A continuación se determinó el efecto de la temperatura del cultivo sobre la producción de CO_2 y de lipasas por ambas cepas.

9.4 Cinética de producción de CO_2 y de lipasas en FMS.

Para determinar los parámetros asociados a la producción de CO_2 y de lipasas se realizaron estudios de FMS en cultivos isotérmicos; para ello, se usaron columnas de vidrio de 2.5 cm de diámetro y 20 cm de largo, incubadas en baño con agua con temperatura controlada. Las columnas fueron empacadas con 8 g de materia seca (empleando agrolita como soporte inerte) y medio Pontecorvo (3x).

El sistema de fermentación fue monitoreado mediante un metabolómetro, el cual cuenta con un software que indica la producción de gases durante el cultivo. Con la finalidad de conocer el tiempo de máxima producción de CO₂ y de lipasas se realizaron cultivos con tiempos de incubación de 120 h. En la Fig. 9.7 se muestran los perfiles de tasas de producción de CO₂ y máxima producción de CO₂. En la tabla 9.3 se presentan los parámetros cinéticos obtenidos durante el cultivo. Ambas cepas (T110 y T5S) mostraron valores de μ similares, entre 0.110 y 0.134 1/h, lo cual se encuentra dentro los parámetros citados en la literatura. La máxima producción de CO₂ (CO_{2f}) presentó valores de 100 y 116 mg CO₂/gmsi después de 120 h de cultivo.

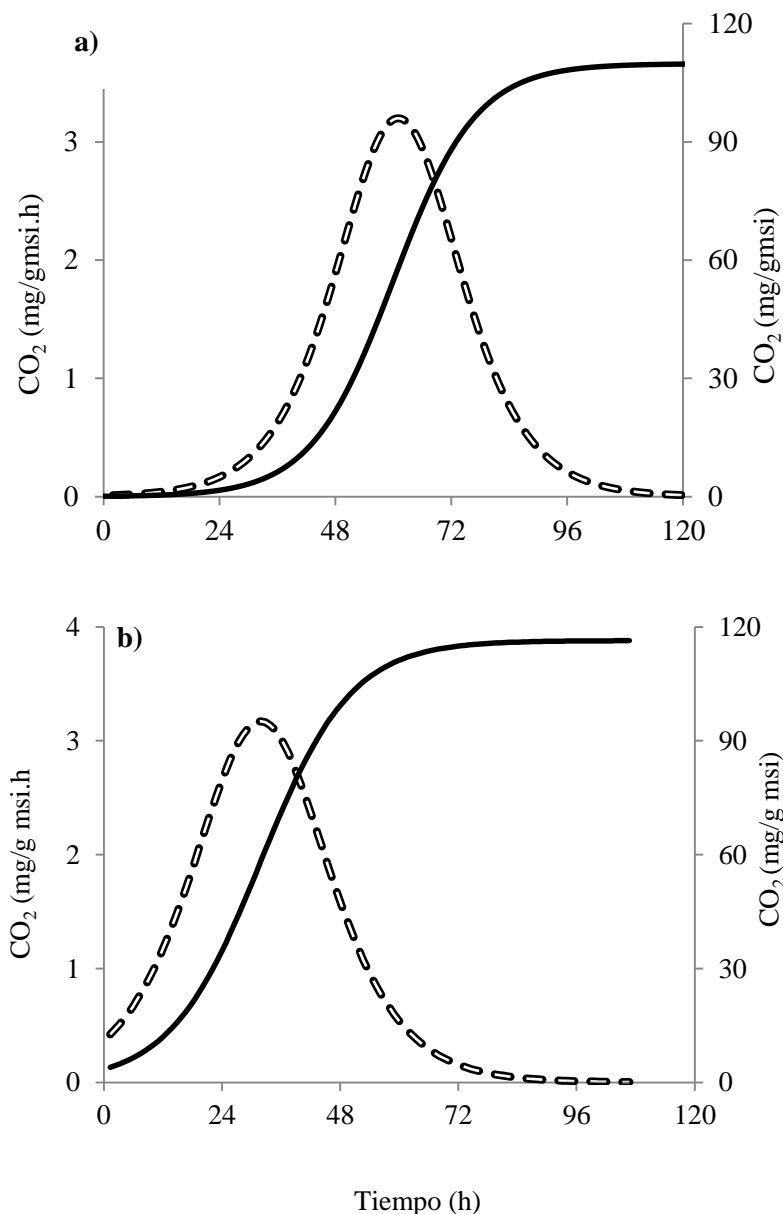


Fig. 9.7 Perfiles de tasas de producción (línea discontinua) y máxima producción de CO₂ (línea continua) para las cepas termófilas a) T110 y b) T5S

Tabla 9.3 Parámetros cinéticos de crecimiento obtenidos por las cepas termófilas T110 y T5S en cultivo sólido a 120 h a 45 °C

| Cepa | Fase lag (h) | Tasa específica de crecimiento (μ) (1/h) | MáxCO ₂ (mgCO ₂ /gmsi) |
|-------------|--------------|--|--|
| T110 | 16.47 ± 0.43 | 0.12 ± 0.01 | 107.96 ± 5.56 |
| T5S | 13.4±0.50 | 0.11±0.01 | 116.40 ± 10.68 |

Otra variable de respuesta importante durante esta cinética de cultivo en medio sólido fue la actividad enzimática (Fig. 9.8). Máximos títulos de actividad lipasa de 25 U/gms se obtuvieron en el caso de ambas cepas a tiempos de cultivo de 48 h para la cepa T110 y de 72 h para la cepa T5S, respectivamente.

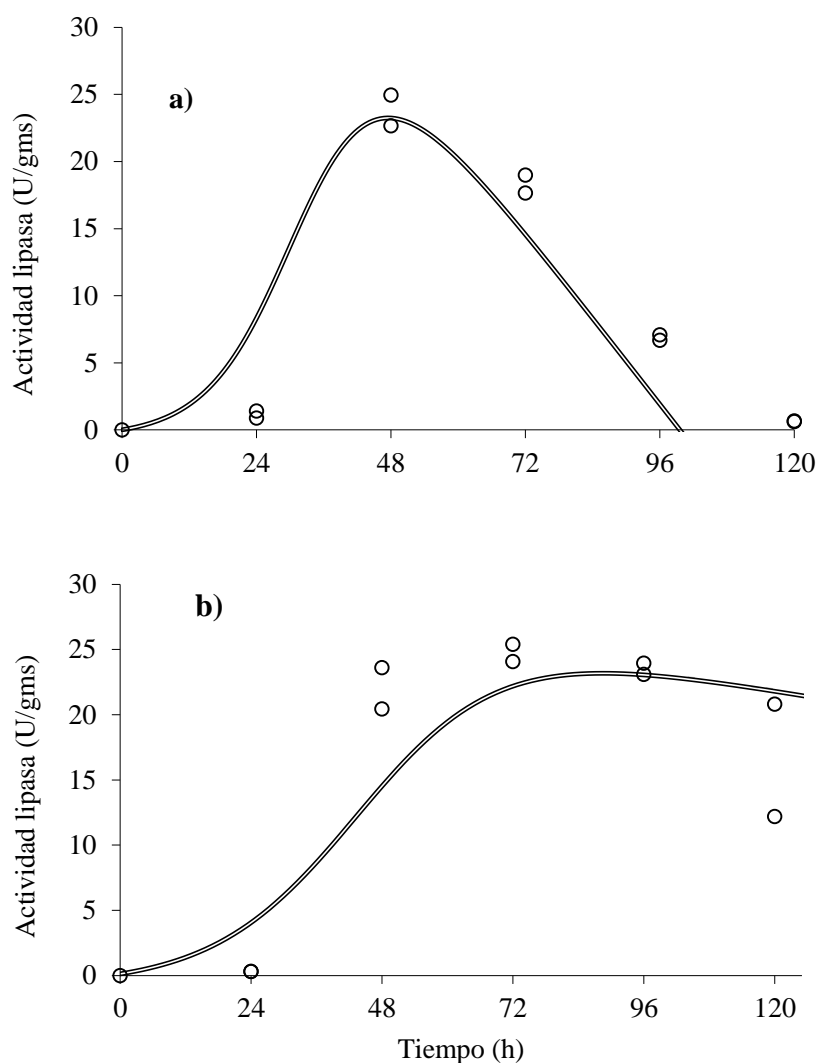


Fig. 9.8 Perfiles de actividad enzimática obtenidos por las cepas a) T110 y b) T5S durante la cinética de FMS 120 h de cultivo. Los círculos vacíos representan los datos experimentales y las líneas continuas representan el ajuste realizado con el modelo de Luedeking y Piret, (1959).

Sin embargo, un aspecto importante presentado por la cepa T110 fue la disminución de actividad después 48 h de cultivo y la pérdida total de actividad al final del cultivo. En contraste la cepa T5S presentó la máxima actividad lipasa a las 72 h de cultivo y ésta fue mantenida hasta las 120 h de cultivo. Este comportamiento puede ser explicado por la presencia de proteasas que hidrolizan lipasas durante el cultivo de FMS. Por lo que, se evaluó el efecto de la adición de un inhibidor de proteasas a los extractos enzimáticos (ver apartado 9.6).

9.5 Efecto de la temperatura sobre la producción de CO₂ y de lipasas

Una vez establecido el tiempo de cultivo se evaluó el efecto de la temperatura sobre la producción de CO₂ y de lipasas en FMS, el rango de estudio fue de 30 °C-45 °C.

9.5.1 Tasa de producción de CO₂ y producción de CO₂

A medida que se incrementa la temperatura se observan diferentes perfiles de producción de CO₂ (Tabla 9.4). El valor máximo de la tasa de producción de CO₂ alcanzado fue de 3.87±0.02 mg CO₂/gmsi.h a 43 °C. Sin embargo, no hay diferencia significativa de los valores obtenidos a las diferentes temperaturas (ANOVA $\alpha=0.05$). Así mismo, la producción final de CO₂ y la tasa específica de crecimiento a partir de la producción de CO₂ fueron independientes de la temperatura en el intervalo estudiado. Sin embargo, un aspecto relevante fue que, la fase lag se redujo significativamente al aumentar la temperatura de 38 a 45 °C.

Tabla 9.4 Parámetros cinéticos obtenidos durante cultivos de 120 para la cepa termófila T5S bajo condiciones de temperatura controlada.

| Temperatura de incubación (°C) | <i>Parámetros cinéticos</i> | | | |
|--------------------------------|---|----------------------------|--|--------------|
| | Tasa de producción de CO ₂ (mg/gmsi.h) | CO _{2f} (mg/gmsi) | Tasa específica de crecimiento μ (1/h) | Fase lag (h) |
| 38 | 3.63±0.05 | 115.59±1.10 | 0.107±0.001 | 36.73±0.56 |
| 40 | 3.75±0.08 | 122.63±8.18 | 0.114±0.002 | 23.86±0.95 |
| 43 | 3.87±0.02 | 129.76±0.27 | 0.108±0.004 | 24.70 ±0.74 |
| 45 | 3.43±0.06 | 125.81±5.09 | 0.107±0.001 | 20.26±0.06 |

9.5.2 Actividad enzimática

La actividad lipasa fue otra variable de respuesta estudiada en este trabajo. Para la medición de la actividad enzimática se consideraron 2 tiempos de muestreo; el primero, en el momento que se obtiene la tasa máxima de producción de CO₂ (alrededor de las 48 h) y el segundo, cuando la tasa de producción de CO₂ es aproximadamente la mitad de la tasa máxima.

Los resultados obtenidos son mostrados en la Tabla 9.5. A un tiempo inicial, la actividad enzimática resultó ser nula. Posteriormente, a las 48 h se obtuvieron títulos de actividad de 13 U/gms a 43 °C. Un comportamiento similar es presentado a las diferentes temperaturas mostrando que a 40 °C y 45 °C, la actividad incrementa en función del tiempo, hasta valores de 7 U/gms y 10 U/gms, respectivamente.

Tabla 9.5 Títulos de actividad enzimática obtenidos por la cepa termófila T5S a las 48 h y 72 h de cultivo.

| Temperatura (°C) | Tiempo de cultivo (h) | |
|------------------|------------------------------|------------|
| | 48 | 72 |
| | Actividad enzimática (U/gms) | |
| 38 | 6.86±0.24 | 10.38±1.20 |
| 40 | 7.59±1.67 | 12.40±1.55 |
| 43 | 13.13±2.78 | 12.04±1.44 |
| 45 | 10.66±0.00 | 9.59±0.36 |

A un tiempo de 72 h los máximos títulos de actividad fueron obtenidos a 40 y 43 °C con valores aproximados de 12 U/gms. Por lo tanto, estos estudios confirmaron que la mejor temperatura para el crecimiento y producción de lipasas se presenta en un intervalo de 40-45 °C. Sin embargo para efectos de baja deshidratación la temperatura de producción empleada en estudios posteriores fue 40 °C.

9.6 Efecto del inhibidor de proteasas

Debido a la pérdida de actividad lipasa con la cepa T110 se decidió evaluar la presencia de actividad proteolítica en el cultivo. Para ello, se adicionaron 2 µL de un cóctel de inhibidor de proteasas P-8215 (No. 049K4001) en extractos enzimáticos producidos a partir de las 72 h de cultivo (Tabla 9.3). Para ambas cepas la adición del inhibidor de proteasas en los extractos enzimáticos condujo a mayor actividad lipasa. Este efecto fue considerablemente mayor en la cepa T110; en la que la actividad en los extractos de 120 h en presencia de inhibidor es más de 15 veces mayor a la obtenida sin inhibidor.

En contraste para la cepa T5S esta relación es sólo del doble. Por ello, la caída de actividad enzimática durante el cultivo de T110 es debido a la presencia de proteasas desde las 72 h de cultivo (Fig. 9.8 y Tabla 9.6). Para la cepa T5S el efecto fue menos pronunciado, presentado una pérdida de actividad cercana al 50 % (Tabla 9.3).

Tabla 9.6 Actividad enzimática para las cepas termófilas T110 y T5S en presencia y ausencia de inhibidor de proteasas P-8215 (No. 049K4001).

| Tiempo de cultivo (h) | <i>Actividad lipasa T110</i> (U/gms) | | <i>Actividad lipasa T5S</i> (U/gms) | |
|-----------------------|---|-------------|--|-------------|
| | No inhibidor | Inhibidor | No inhibidor | Inhibidor |
| 72 | 5.22± 0.46 | 16.48± 0.17 | 14.93± 1.78 | 17.23± 1.33 |
| 96 | 1.56± 0.29 | 14.77± 0.03 | 7.02± 1.83 | 16.43± 2.60 |
| 120 | 0.97± 0.10 | 14.60±0.48 | 8.38± 6.60 | 17.80± 1.37 |

Con respecto a este comportamiento, diversos grupos han investigado acerca de la secreción de proteasas durante la etapa final del crecimiento, asociada con la disminución de actividad lipasa por algunos microorganismos (Cordenons y col. 1996; Rodríguez y col., 2006). En este sentido la cepa T5S presentó menor actividad proteolítica comparada con T110. A pesar de que Aguilar y col. (2001) reportaron que la FMS reduce la producción de proteasas, los resultados aquí presentados demuestran que esto depende de la cepa de estudio y no solamente del tipo de cultivo.

Capítulo 10

Caracterización de los biocatalizadores producidos por FMS

10. Caracterización de biocatalizadores

La caracterización de los biocatalizadores producidos por FMS consistió en realizar estudios de termo actividad, termoestabilidad, acilselectividad y estabilidad frente al pH.

10.1 Estudios de termo actividad

La emulsión de trioctanoína (6 mL) fue mezclada con 24 mL de Tris-HCl 0.3 mM, pH 7, que contenía 150 mM de NaCl, 2 mM CaCl₂. La mezcla fue preincubada a la temperatura de ensayo. La reacción inicio por la adición de un extracto enzimático adecuadamente diluido o biocatalizador seco (polvo). El pH inicial fue ajustado a 7 y la liberación de ácidos grasos fue continuamente titulada con NaOH 0.1M por 5 min, usando un titulador automático (Mettler DL21 Titrator, Switzerland).

Se determinó el efecto de la temperatura sobre la actividad lipasa presente en los biocatalizadores producidos por las cepas T110 y T5S (Fig. 10.1). La determinación de actividad fue realizada utilizando el instrumento pH-Stat por medición de ácido octanoico, liberado durante la hidrólisis de trioctanoína disuelta en el amortiguador (Tris-HCl (0.3 mM), NaCl (150mM), CaCl₂ (2mM), pH 7.0). Al incrementar la temperatura, el valor de actividad enzimática empleando trioctanoína como sustrato aumenta de forma lineal, en un rango de 30 °C a 60 °C, mostrando un incremento mayor al 200 %, comparada con la actividad obtenida a 30 °C. La temperatura óptima para esta reacción de ambos biocatalizadores se presenta a 60 °C; en el caso particular del biocatalizador producido por la cepa T5S la máxima actividad se mantiene a temperaturas de 60 a 80 °C mientras que en el caso de la cepa T110 se presenta una ligera disminución de la actividad en el mismo rango de temperaturas.

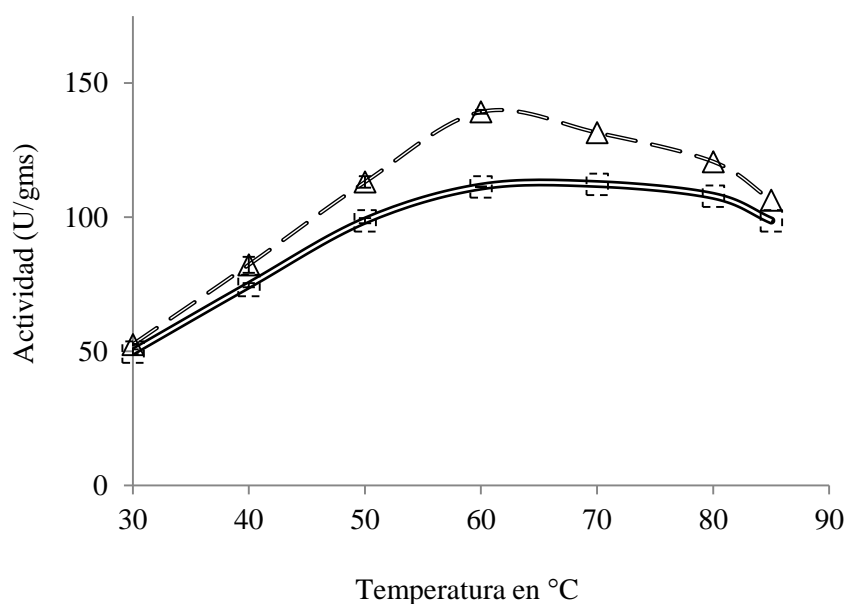


Fig. 10.1 Efecto de a temperatura (30 °C – 85 °C) sobre la actividad, que presentaron los biocatalizadores de las cepas T110 (Δ) y T5S (□)

Por otra parte, de la información obtenida en la Figura 10.1 se estimó el factor que indica el incremento de la velocidad de la enzima: Q_{10} . Este factor, señala que al incrementar 10 °C la temperatura, se aumenta la velocidad de la enzima al doble. El valor Q_{10} fue calculado obteniendo valores de 1.4. y 1.1 para la cepa de T110 y T5S, respectivamente y comparado con la literatura (Tabla 10.2). Además un efecto de activación fue observado en un rango de 30 - 60 ° C.

Con respecto a este comportamiento pocas cepas termófilas han sido reportadas. En el caso de hongos mesófilos se presenta un comportamiento similar con una cepa de *Penicillium simplicissimum* cultivada en FMS, encontrando un efecto de activación en un rango de 50 - 55 °C. Hiol y col., (2000), reportan una cepa de *Rhizopus oryzae* productora de lipasas, observando un efecto activador a 35 °C, en un rango de estudio de 20-50 °C, con un incremento del 20 % en la actividad residual.

Estas comparaciones indican que los resultados obtenidos por los biocatalizadores, se encuentran en un rango superior al reportado en la literatura, observando un incremento de 3 veces el valor de la actividad a una temperatura de 60 °C. La máxima actividad lipasa a 85 °C no ha sido previamente reportada (Tabla 10.1). Gumel y col. (2011) reportaron actividad de lipasas inmovilizadas producidas por *Candida antarctica* B a 80 °C. Para otras enzimas se han reportado altas temperaturas de actividad enzimática [xilanasas (70 °C) y fitasas (70 °C) provenientes de *T. lanuginosus* (Gutarra y col., 2009)].

Otros parámetros medidos a partir del gráfico obtenido en la Fig. 10.1, fueron las energías de activación (E_a) y desactivación (E_d). Se observa que un valor de energía de activación de 27.3 kJ/mol y desactivación 6.07 kJ/mol fueron obtenidos para la cepa T110, mientras que para la cepa T5S los valores obtenidos fueron 22.7 kJ/mol y 11.07 kJ/mol, respectivamente.

Los cálculos de energía de activación presentados en este trabajo fueron similares a los reportados por las lipasas de *Candida rugosa* (30 a 40 KJ/mol) (Pereira y col., 2001) y de *Rhizopus homothallicus* (30 KJ/mol) (Mateos Díaz y col., 2006). Sin embargo altos valores de E_a (124.8 KJ/mol) han sido reportados por algunas xilanasas producidas por *T. lanuginosus* (Bokhari y col., 2010). Asimismo lipasas termoestables de *T. lanuginosus* reportan valores de E_a de 25.4 kJ/mol (Yadav y Ganapati, 2010).

Tabla 10.1. Efecto de la temperatura en la actividad y estabilidad de las lipasas producidas por FMS y FML para diferentes cepas fúngicas.

| Hongo | T _{ópt} (°C) | T* (°C) | t _{1/2} (h) | K _d (1/h) | Cultivo | Referencia |
|----------------------------|-----------------------|---------|----------------------|----------------------|---------|-------------------------|
| <i>T. lanuginosus</i> T5S | 85 | 70 | 0.5 | 0.3 | FMS | Nuestro trabajo |
| | 85 | 80 | 0.25 | 1.2 | FMS | |
| <i>T. lanuginosus</i> T110 | 80 | 70 | > 4 | 0.3 | FMS | Nuestro trabajo |
| | 80 | 80 | 0.25 | 1.2 | | |
| <i>R. homothallicus</i> | 30 | 50 | 0.4 | nr | FML | Mateos y col., 2006 |
| | 40 | 50 | 0.7 | nr | FMS | |
| <i>C. rugosa</i> | 37 | 50 | 0.7 | 1.0 | pc | Pereira y col., 2001 |
| | 50 | 50 | 1.1 | 0.6 | pc | |
| <i>Penicillium</i> sp. | 37 | 65 | 1.5 | 1.9 | FMS | Wolski y col., 2009 |
| | 42 | 25 | 0.3 | <0.1 | FML | |
| <i>H. lanuginosa</i> | 45 | 70 | ≈2 | nr | FML | Omar y col., 1987 |
| <i>P. simplicissimum</i> | 50 | 50 | 5.0 | nr | FMS | Gutarra y col., 2009 |
| <i>A. niger</i> | 55 | 60 | 1 | nr | FML | Namboodiri y col., 2000 |

T_{ópt} temperatura de incubación en la cual la actividad es óptima

T*es la temperatura empleada para los ensayos de estabilidad

t_{1/2}es el tiempo de vida media a la temperatura T*

K_d es la constante de desnaturalización a la temperatura T*

nr: no reportada

pc:producto comercial

En el caso de la energía de desactivación (Ed) los valores presentados son menores que los reportados en otros trabajos (11.07 y 6.07KJ/mol) como se presenta en la Tabla 10.2. Inclusive algunas lipasas comerciales provenientes de *T. lanuginosus* (26.5 KJ/mol) (Khor y col., 2010) presentan valores superiores a los reportados en este estudio. En el caso de algunas xilanasas producidas por cepas silvestres y mutadas (98.6 y 71.8 KJ/mol respectivamente) (Bokhari y col., 2010) valores más altos también han sido presentados.

Con base en las magnitudes citadas en otros trabajos un parámetro evaluado fue la relación Ea/Ed para los biocatalizadores producidos por nuestras cepas. Valores cercanos a 4.0 fueron obtenidos, este cociente determina la importancia de un valor bajo en la desactivación de la enzima y muestra las ventajas para ser aplicadas en procesos llevados a cabo a temperaturas elevadas como ha sido señalado en algunos trabajos por Wolsky y col., (2009) y por Namboodiri y col.,(2011), sobre todo en el caso de reacciones de acidólisis empleadas en la producción de lípidos estructurados, los cuales son aplicados en procesos llevados a cabo a temperaturas de 45 y 50 °C (Nunes y col., 2011).

Tabla 10.2. Parámetros térmicos de las enzimas termoestables producidas por diferentes cepas fúngicas.

| Microorganismo | Enzima | Ea (kJ/mol) | Ed (kJ/mol) | Ea/Ed | Referencias |
|------------------------------------|-----------|----------------|----------------|-------|----------------------|
| <i>T. lanuginosus</i> | Lipasa | 27 | 7 | 4.0 | Nuestro trabajo |
| <i>T. lanuginosus</i> | Lipasa | 23 | 11 | 2.0 | Nuestro trabajo |
| <i>T. lanuginosus</i> | Xilanasa | 125 | 99 | 1.3 | Bokhari y col., 2010 |
| <i>T. lanuginosus</i> ^a | Xilanasa | 108 | 72 | 1.5 | Bokhari y col., 2010 |
| <i>T. lanuginosus</i> | Lipasa | 22 | 27 | 0.8 | Khor y col., 2010 |
| <i>K. marxianus</i> | Inulinasa | 45 | 510 | 0.1 | Santos y col., 2007 |
| <i>K. marxianus</i> ^b | Inulinasa | 42 | 299 | 0.1 | Santos y col., 2007 |

^a Cepa modificada genéticamente, ^bEnzima inmovilizada.

Ea: Energía de activación

Ed: Energía de desactivación

10.2 Estudios de termoestabilidad

Para los estudios de estabilidad se emplearon extractos líquidos. El rango de temperaturas utilizado fue de 30 °C- 80 °C durante 4 h de incubación. La medición de actividad residual fue realizada en intervalos de 30 min utilizando *p*-NPO como sustrato (Tabla 10.3).

La cepa T110 fue estable en un rango de temperaturas de 30 a 70 °C, manteniendo el 100% de su actividad inicial después de 4 h de incubación. Se observa un efecto de activación durante las dos primeras h al incubar los extractos enzimáticos a temperaturas de 30 a 60 °C; manteniendo la actividad constante de 2 a 4 h de incubación. Al incubar los extractos a 80 °C se observa una pérdida completa de la actividad enzimática después de 30 minutos de incubación.

En el caso de la cepa T5S, a temperaturas entre 30 y 50 °C; se obtuvieron perfiles similares a los de la cepa T110. A partir de 60 °C la temperatura de incubación tiene un efecto negativo sobre la estabilidad de la actividad lipasa. A 60 °C se pierde el 30% de la actividad después de 2 h de incubación y a 70 °C el tiempo de actividad media es tan solo de 30 min. Finalmente, a 80 °C se observa una pérdida completa de la actividad enzimática después de 30 minutos de incubación.

Es importante mencionar que el efecto activador observado para el extracto enzimático de la cepa T5S no fue tan importante como el de la cepa T110. Algunos autores como Zhu y col., (2001) han intentado explicar este fenómeno estudiando las características presentes en lipasas termoestables producidas por cepas mutantes y parentales del género *Humicola lanuginosa*. Un aspecto importante ha sido la contribución de la presencia del aminoácido triptófano 89 en la superficie de la proteína, particularmente en la tapa o "lid" confiriendo estabilidad a la estructura de la enzima debido a un posible ciclo de calentamiento y enfriamiento, intensificando la actividad de las lipasas y sugiriendo un estado intermediario de alta energía (Zhu y col., 2001).

Tabla 10.3 Termoestabilidad de las lipasas producidas por T110 y T5S en FMS.**T110**

| <i>Temperatura</i> (°C) | <i>30</i> | <i>40</i> | <i>50</i> | <i>60</i> | <i>70</i> | <i>80</i> |
|----------------------------|-------------------------------|-------------|-------------|--------------|--------------|-----------|
| <i>Tiempo (h)</i> | <i>Actividad relativa (%)</i> | | | | | |
| 0.5 | 154.87±0.01 | 170.57±0.71 | 192.01±0.25 | 155.95±5.34 | 134.58±10.54 | 7.50±0.36 |
| 1.0 | 148.97±0.76 | 166.68±0.11 | 184.34±1.20 | 148.97±6.78 | 112.63±0.89 | 5.36±0.42 |
| 1.5 | 156.75±0.89 | 171.68±0.05 | 191.00±0.07 | 161.62±11.36 | 103.22±4.03 | 3.43±0.48 |
| 2.0 | 157.39±0.83 | 172.92±1.47 | 185.67±1.76 | 138.52±0.98 | 100.67±3.09 | 0.05±0.01 |
| 2.5 | 164.34±0.42 | 178.39±1.08 | 185.10±0.30 | 122.53±0.01 | 97.72±0.95 | ND |
| 3.0 | 166.73±0.26 | 153.88±0.65 | 160.52±0.45 | 122.27±0.07 | 90.85±1.83 | ND |
| 3.5 | 148.85±0.30 | 176.84±1.08 | 164.22±1.07 | 132.97±8.61 | 87.46±2.84 | ND |
| 4.0 | 140.96±0.69 | 176.84±0.08 | 178.82±0.64 | 148.85±2.69 | 82.32±1.39 | ND |

T5S

| <i>Temperatura</i> (°C) | <i>30</i> | <i>40</i> | <i>50</i> | <i>60</i> | <i>70</i> | <i>80</i> |
|----------------------------|-------------------------------|-------------|-------------|-------------|------------|------------|
| <i>Tiempo (h)</i> | <i>Actividad relativa (%)</i> | | | | | |
| 0.5 | 100.91±0.13 | 86.18±0.54 | 79.01±4.80 | 87.76±6.63 | 65.49±1.35 | 15.68±5.21 |
| 1.0 | 104.84±6.78 | 95.16±0.74 | 105.81±6.63 | 105.81±2.70 | 34.55±2.88 | 12.16±2.45 |
| 1.5 | 112.06±1.06 | 108.47±6.11 | 99.26±3.47 | 103.43±2.55 | 35.92±6.11 | 6.34±2.14 |
| 2.0 | 127.57±8.76 | 132.22±1.32 | 108.96±3.95 | 51.26±4.98 | ND | ND |
| 2.5 | 121.34±2.58 | 130.25±8.22 | 118.72±10.3 | 51.06±4.18 | ND | ND |
| 3.0 | 127.36±15.4 | 114.65±0.21 | 99.28±0.00 | 66.36±4.24 | ND | ND |
| 3.5 | 138.40±0.04 | 124.41±2.77 | 83.61±13.36 | 72.42±1.60 | ND | ND |
| 4.0 | 138.40±0.04 | 124.41±2.77 | 83.61±10.16 | 68.06±4.45 | ND | ND |

Asimismo, algunos trabajos citados por Kumar y Nusinov (2001) reportan la estabilidad de una lipasa proveniente de *T. lanuginosus* en su forma libre e inmovilizada, refiriendo que el proceso de inmovilización le confiere mayor estabilidad en un rango de temperatura de 20 a 100 °C. Otros trabajos han intentado explicar las razones de una alta termoestabilidad de enzimas producidas por hongos termófilos, particularmente de las cepas de *Thermomyces lanuginosus*.

Tal es el caso de la xilanasa termofílica (Gruber y col., 1998) donde su característica de termoestabilidad ha logrado ser explicada por la presencia de un enlace disulfuro extra en su estructura química, así como también un incremento en la densidad de residuos con carga presentes en la proteína. Inclusive estudios novedosos han reportado la predicción de enzimas a través de métodos computacionales obteniendo valores de termoestabilidad que superan los 70 y 75 °C.

Además la expresión en otros vectores como *Pichia pastoris* ha demostrado que residuos de prolina, histidina y cisteína contribuyen fuertemente a la termoestabilidad de la enzima producida (Zhang y col., 2014).

Por otro lado, Shrivastava y col. (2013) reportaron la expresión de actividad xilanasa en una cepa de *E. coli* procedente de *T. lanuginosus* SS8, encontrando valores de termoestabilidad a 60 °C durante un período de 96 h, manteniendo el 80 % de su actividad inicial. Altos valores de termoestabilidad también han sido obtenidas por enzimas glucoamilasas, procedentes de cepas del mismo género, con valores de vida media de 8 h a una temperatura de 60 °C (Gomes y col., 2005).

Con respecto a las lipasas termoestables más citadas, destacan las producidas por microorganismos mesófilos en FMS, como *Penicillium simplicissimum* mostrando estabilidad en un rango de temperaturas de 35 - 60 °C, y un valor máximo a 50 °C con valores de vida media de 5.02 h (Gutarra y col., 2009). Cepas termófilas de *Rhizopus rhizopodiformis* han sido reportadas como productoras de lipasas termoestables en ambos tipos de cultivo (FMS y FML), mostrando resultados de estabilidad a temperaturas de 50 °C por 30 min y a 45 °C durante 24 h. En contraste Hiol y col. (2000) reportaron lipasas procedentes de *Rhizopus oryzae* producidas por FMS con valores de estabilidad menores a 35 °C durante 30 min, inclusive a temperaturas de 45 y 50 °C la enzima fue inactivada.

Es importante resaltar que valores de termoestabilidad a temperaturas superiores de 80 °C han sido reportados únicamente por especies bacterianas como *Bjerkandera adusta*, cuyo valor de estabilidad térmica alcanza los 120 minutos en un rango de temperaturas de 20 °C a 80 °C (Bancernz y col., 2007). Rashid y col (2013) reportaron el aumento de la estabilidad de la lipasa inmovilizada de *Bacillus licheniformis* IBRL-CHS2 en la presencia de los siguientes cationes, Ca²⁺, K⁺, Zn²⁺, Mg²⁺, mostrando una máxima actividad a 70 °C, estabilidad a 65 °C y un valor de vida media de 29 h. La lipasa producida por *Bacillus smithii* estable en un rango de temperaturas de 30 °C a 80 °C (Lailaja y col., 2013). Domínguez y col. (2010) reportaron la estabilidad de la lipasa bacteriana proveniente del género *Thermus thermophilus* en cultivo líquido, obteniendo actividades óptimas a una temperatura de 70 °C. Para nuestro conocimiento, este es el primer trabajo que reporta una alta termo actividad y termoestabilidad en extractos producidos por cepas fúngicas de *T. lanuginosus*.

10.3 Efecto del pH en la actividad y estabilidad de los biocatalizadores producidos por FMS

Otro aspecto importante durante la caracterización de los biocatalizadores fue el efecto producido por el pH en la actividad y estabilidad de los biocatalizadores producidos por ambas cepas. El efecto del pH en la actividad lipasa fue evaluado espectrofotométricamente a 348 nm utilizando 100 mM de *p*-NPO como sustrato. Ambos extractos (de las cepas T110 y T5S) no presentaron actividad con pH menores a 6 y mayores a 11. Además ambos presentaron su máxima actividad a pH 10, considerando como control la actividad registrada a este mismo valor de pH.

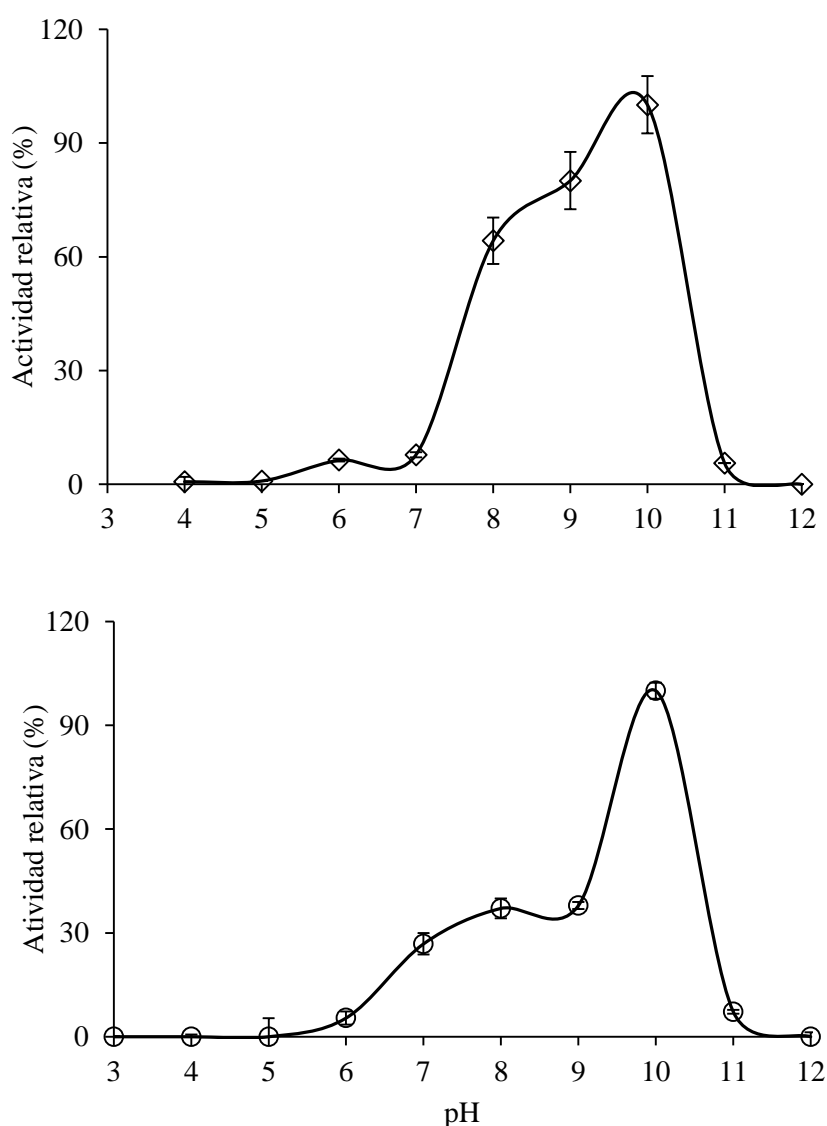


Fig. 10.2. Efecto del pH producido en la actividad enzimática por las cepas termófilas T110 y T5S. Las barras de error indican la desviación estándar de los experimentos realizados por duplicado.

Este comportamiento fue comparado con algunos reportes en la literatura, en donde pH óptimos de 7 y 6 unidades han sido reportados para este género (Omar y col., 1987; Gulati y col., 2007) lo que no concuerda con los resultados encontrados en este trabajo. Sin embargo, algunos estudios señalan, que después del proceso de aminación química y la inmovilización en bromuro de cianógeno con agarosa, la lipasa de *T. lanuginosus* se activa presentando una actividad óptima a pH 10 (Rodríguez y col., 2013). Sin embargo un aspecto importante es que comparado con lo reportado en la literatura, la lipasas termoestables de otros microorganismos como bacterias procedentes del género *Bacillus* sp., y *Pseudomonas* sp., reportan pH óptimos entre 9 y 11 unidades (Haki y Rakshit; 2003).

Una vez determinado el efecto del pH sobre la actividad lipasa en los extractos enzimáticos se evaluó el efecto del pH en la estabilidad de la actividad enzimática (Tabla 10.4). Ambas lipasas resultaron ser estables en un intervalo de pH de 4 a 10. Al incubarse el extracto enzimático de la cepa T110 durante 4 h a pH 9 y 10 se redujo su actividad a un valor del 20 %. La actividad en los extractos de la cepa T5S fue ligeramente afectada a pH de 4 a 7. Los resultados de estabilidad coinciden con los reportados por (Wen Hsiung y col., 1972) para lipasas producidas por *T. lanuginosus*.

Tabla 10.4. Actividad residual media en los extractos enzimáticos producidos por FMS para las cepas termófilas T110 y T5S

| pH | Tiempo de incubación (h) | | | |
|----------------------------|--------------------------|---------------|--------------|--------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Actividad residual (%) | | | | |
| <i>T. lanuginosus</i> T110 | | | | |
| 4 | 95.2 ± 0.22 | 96.3 ± 0.06 | 100.4 ± 0.30 | 105.4 ± 0.09 |
| 5 | 100.4 ± 0.26 | 103.0 ± 0.007 | 101.1 ± 0.29 | 105.3 ± 0.47 |
| 6 | 117.4 ± 0.38 | 113.2 ± 0.21 | 119.3 ± 1.47 | 113.3 ± 0.03 |
| 7 | 93.3 ± 0.22 | 93.1 ± 0.63 | 91.3 ± 0.39 | 95.8 ± 1.47 |
| 8 | 100 ± 0.85 | 100 ± 0.31 | 100 ± 0.06 | 100 ± 0.35 |
| 9 | 100.9 ± 0.97 | 94.5 ± 0.01 | 75.9 ± 0.01 | 90.2 ± 0.37 |
| 10 | 88.9 ± 0.04 | 77.2 ± 0.24 | 85.7 ± 0.09 | 80.4 ± 0.08 |
| <i>T. lanuginosus</i> T5S | | | | |
| 4 | 73.6 ± 0.76 | 85.8 ± 0.40 | 77.7 ± 0.36 | 93.8 ± 0.12 |
| 5 | 70.7 ± 0.67 | 95.0 ± 0.15 | 85.2 ± 0.35 | 93.9 ± 0.26 |
| 6 | 77.8 ± 0.07 | 71.1 ± 0.03 | 74.4 ± 0.77 | 75.2 ± 0.17 |
| 7 | 53.9 ± 0.40 | 68.4 ± 0.32 | 56.8 ± 0.66 | 71.6 ± 0.27 |
| 8 | 100 ± 0.77 | 100 ± 0.67 | 100 ± 1.08 | 100 ± 0.33 |
| 9 | 98.2 ± 0.86 | 99.2 ± 0.86 | 93.6 ± 1.21 | 92.5 ± 0.50 |
| 10 | 98.6 ± 0.25 | 99.7 ± 0.28 | 90.8 ± 1.01 | 94.6 ± 0.30 |

10.4 Estudios de acilespecificidad en los biocatalizadores producidos por FMS

En secciones anteriores se comentó que la medición de actividad para los biocatalizadores producidos fue empleando ésteres de *p*-nitrofenol (*p*-nitrofenil octanoato) y ácidos grasos (trioctanoína). Para determinar la acilespecificidad de la lipasa de *T. lanuginosus* se determinó su actividad en ésteres con sustituyentes de diferente tamaño (*p*-nitrofenil acetato (C2), butirato (C4), octanoato (C8), decanoato (C10), dodecanoato (C12), miristato (C14) y palmitato (C16)). Los extractos enzimáticos de las dos cepas (T110 y T5S) fueron más selectivos con el *p*-nitrofenil octanoato (C8) (Fig. 10.3).

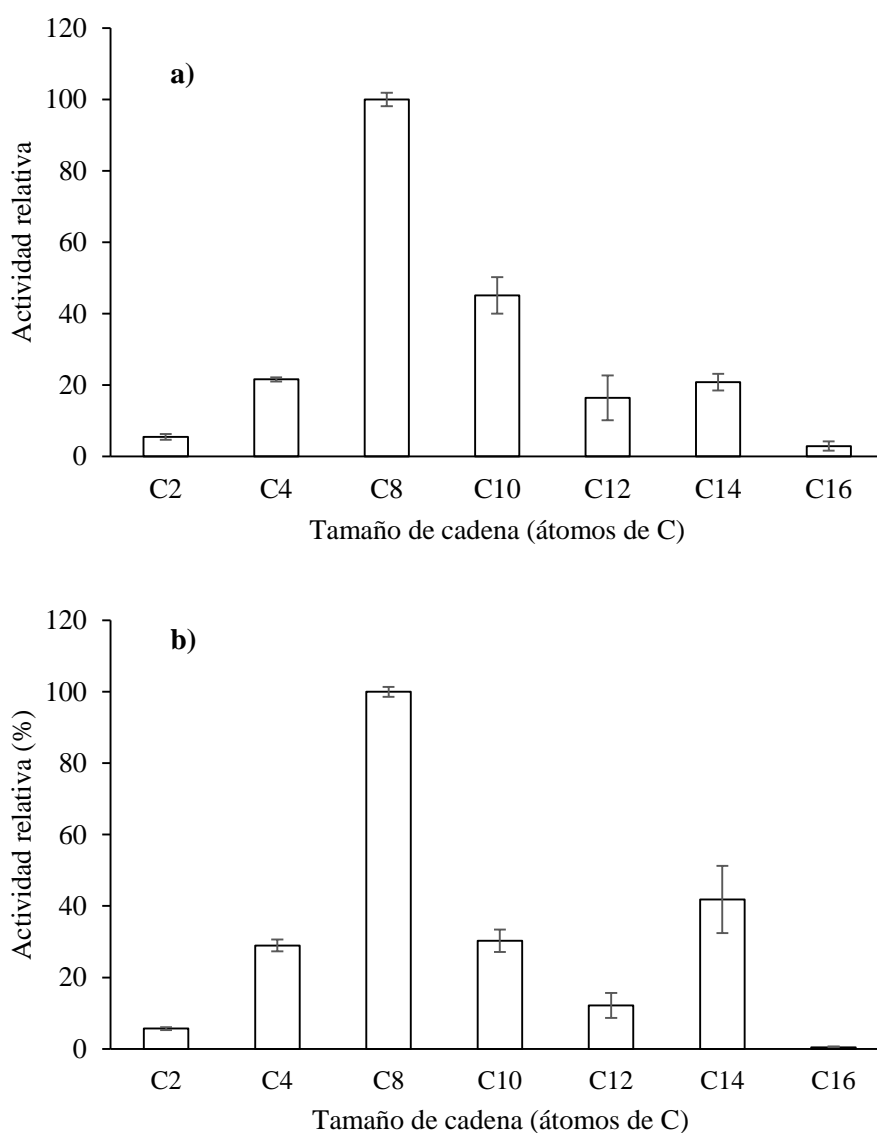


Fig. 10.3 Perfiles de acilespecificidad obtenidos para las cepas a) T110 y b) T5S empleando diferentes ésteres de *p*-nitrofenol (C2-C16). Las barras de error indican la desviación estándar de los experimentos realizados por duplicado.

La especificidad de los extractos evaluados fue comparada con lo reportado por Mateos y col., (2006), demostrando que la acilespecificidad de la lipasa producida por la cepa 13a, una especie termotolerante de *Rhizopus homothallicus* presenta mayor actividad por sustrato de cadena entre 10 y 12 átomos de carbono, y de 6 y 8 átomos de carbono en presencia y ausencia de tritón X-100, este último dato coincide con lo reportado con los biocatalizadores producidos en nuestro trabajo. Sin embargo, en nuestro caso particular ningún detergente fue utilizado durante los estudios de extracción y caracterización de la enzima.

Capítulo 11

Hidrólisis de aceite de sardina

11.1 Reacciones de hidrólisis catalizadas por lipasas

Las lipasas son enzimas que han demostrado ser altamente versátiles y atractivas; por lo que son usadas en numerosos procesos industriales. Dentro de las características más importantes de las lipasas destaca su regioselectividad. La hidrólisis de triglicéridos de origen animal; particularmente de sardina, para la liberación de ácidos omega-3 EPA y DHA (ácido eicosapentanoico y ácido docosahexanoico) es una reacción regio selectiva característica de las lipasas (Akanbi y col., 2013). Estos ácidos orgánicos son importantes para la prevención de desórdenes cardiovasculares y tratamiento de enfermedades como Alzheimer y Parkinson (Phillips, 2010).

El aceite de soya también ha sido utilizado como fuente de triglicéridos para producción de ácidos grasos utilizados en manufactura de jabones, surfactantes, y detergentes empleados en la industria de los alimentos (Akanbi y col., 2013). En contraste algunos triglicéridos como tributirina han sido reportados en reacciones de hidrólisis por lipasas comerciales inmovilizadas procedentes de *T. lanuginosus*, cuyas aplicaciones principales se encuentran dentro de la industria de los detergentes, tratamientos de aguas residuales y procesos de lavado (Jurado y col. 2008).

11.1.1 Hidrólisis del aceite de sardina catalizado por la lipasa producida por la cepa termófila T5S

Las lipasas son enzimas que han sido exitosamente empleadas en la producción de ácidos grasos omega poliinsaturados como EPA y DHA (Rubio-Rodríguez y col., 2010). Algunas especies de pescado han resultado ser excelentes fuentes de EPA y DHA, que llegan a representar hasta el 30 % de peso total de sus aceites. En este trabajo se determinó la liberación de EPA y DHA durante la hidrólisis selectiva de aceite de sardina. Para ello, se evaluaron dos tipos de catalizadores producidos por T5S, el biocatalizador naturalmente inmovilizado y la enzima presente en un extracto líquido seguida de inmovilización sobre octil agarosa, la cual ha dado buenos resultados (Fernández-Lorente y col., 2011; Fernández Lorente y col., 2012). Se eligió el biocatalizador de la cepa T5S por su estabilidad a altas temperaturas y por la menor presencia de actividad proteolítica en los extractos originales.

La hidrólisis de aceite de sardina se llevó a cabo empleando la metodología citada por Fernández-Lorente y col., (2012). En una primera etapa se obtuvo la curva estándar para la determinación cuantitativa de EPA y DHA (Fig. 11.1).

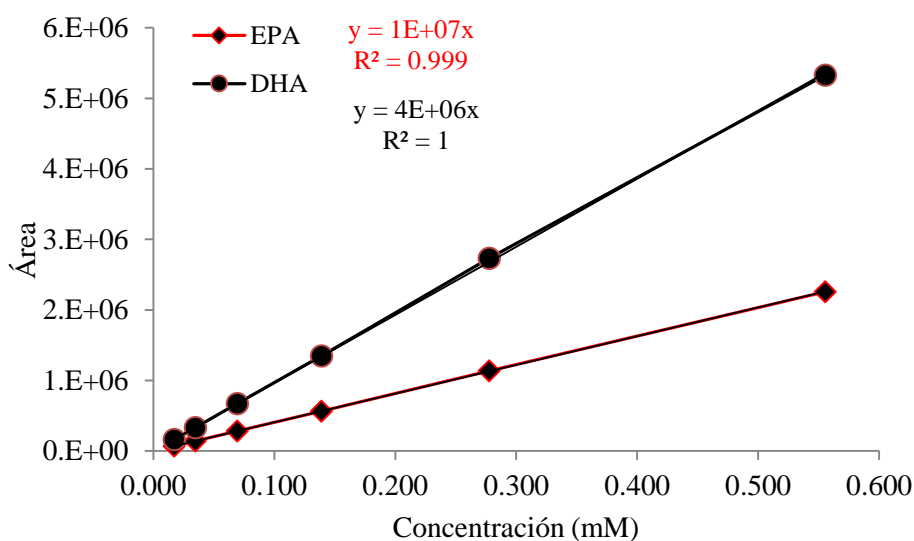


Fig. 11.1 Curva patrón de los ácidos grasos omega-3: EPA y DHA.

Una vez obtenida la curva de calibración, se establecieron las condiciones de reacción para liberar alrededor del 80 % del contenido de EPA/DHA en menos de 20 h (Fig.11.2). En ausencia de la enzima, la liberación de EPA /DHA fue menor al 0.5 %. Además, durante la hidrólisis de aceite de sardina los dos biocatalizadores liberaron EPA de forma mayoritaria. Esta alta preferencia por EPA también ha sido reportado para lipasas comerciales inmovilizadas de TLL como Lipozyme TL IM (Martín-Valverde y col., 2012). Es importante destacar que algunos autores han reportado para la composición del aceite de sardina un porcentaje de 18.6% EPA y de 12.7% DHA en el aceite de sardina (Fernández- Lorente y col., 2011).

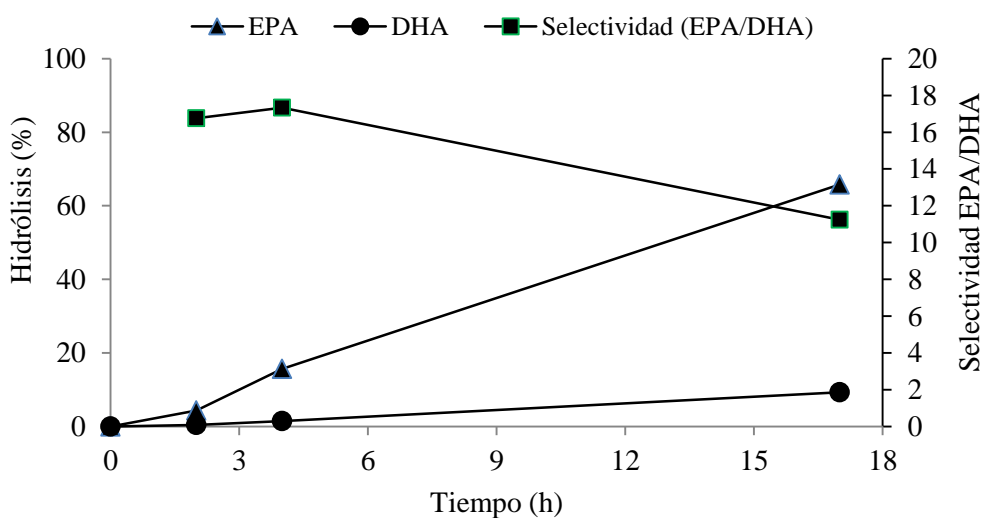


Fig. 11.2 Liberación de los ácidos omega-3 EPA y DHA durante la hidrólisis de aceite de sardina.

La selectividad EPA/DHA del biocatalizador producido por FMS (Tabla 11.1.) fue 3.7 veces más alta que el valor obtenido utilizando el biocatalizador inmovilizado en octil agarosa a pH 6, este comportamiento puede ser explicado debido a que la enzima producida y extraída en solución acuosa no resultó ser activa a este valor de pH. Además, cabe destacar que se obtuvo un incremento de hasta 2 veces en la selectividad EPA/DHA usando la lipasa comercial TLL inmovilizada en octil agarosa en comparación con la inmovilizada en bromo cianógeno CNBr-agarosa (Fernández-Lorente y col., 2012).

Otro aspecto importante durante la reacción de hidrólisis selectiva de aceite de sardina, fue el efecto del pH. Se observó un bajo incremento en la selectividad (1.5 veces) cuando el pH de la reacción se incrementó de pH 6 a 8. Un comportamiento similar ha sido reportado por la lipasa comercial de TLL (Tabla 11.1). Asimismo la selectividad EPA/DHA obtenida con el biocatalizador producido por FMS en agrolita y naturalmente inmovilizado fue 4 veces más alto que el obtenido con una lipasa comercial, inclusive para algunas otras preparaciones comerciales en diversos soportes con diferentes modificaciones químicas (Fernández-Lorente y col., 2012).

Estos resultados sugieren que este biocatalizador producido por FMS puede ser aplicado para la hidrólisis selectiva del aceite de sardina, sin más operaciones unitarias como: extracción, purificación, inmovilización, modificaciones genéticas, modificación química o pasos adicionales.

Además, es importante mencionar que la hidrólisis de aceite de sardina con ambos biocatalizadores (naturalmente inmovilizado en perlita y en octil-agarosa) fue conducido a 25 °C debido a que la actividad fue 6 veces más alta (0.0054 U/gmsi), comparado con una temperatura de 60 °C. La reducción aparente de la hidrólisis del aceite de sardina a 60 °C, podría ser explicada por la oxidación del EPA y DHA debida al largo tiempo de incubación (xx) que modifica su detección espectrofotométrica (Bhale y col., 2007).

Asimismo, la selectividad EPA/DHA obtenida con el biocatalizador naturalmente inmovilizado fue más alta que la mayoría de otros resultados reportados para lipasas comerciales inmovilizadas. Sin embargo, es importante enfatizar que la lipasa de *T. lanuginosus* presente en el biocatalizador, recuperada con polietilenimina mostró relaciones de selectividad comparables con los alcanzados en este trabajo; así como, con los obtenidos con la lipasa succinilada e inmovilizada en CNBr de *Rhizomucor miehei* (Tabla 11.1).

Tabla 11.1. Selectividad de diferentes lipasas que hidrolizan el aceite de sardina.

| Microorganismo | Soporte de inmovilización | pH | Selectividad | Referencia |
|-------------------------|---------------------------|----|--------------|--------------------------------|
| <i>T. lanuginosus</i> | Agrolita | 6 | 11.2 | Este trabajo |
| | Octil | 6 | 3.0 | |
| | Agrolita | 8 | 16.6 | |
| <i>T. lanuginosus</i> * | Ninguno | 8 | 4.1 | |
| <i>C. antártica B</i> * | Ninguno | 8 | 3.0 | |
| <i>R. miehei</i> | CNBr | 8 | 9 | Fernández-Lorente y col., 2012 |
| | Octil | 8 | 6 | |
| | Octil ^P | 6 | 9 | |
| | CNBr ^S | 6 | 34 | |
| <i>C. antarctica B</i> | CNBr | 6 | 3 | |
| | Octil | 6 | 3 | |
| <i>T. lanuginosus</i> | CNBr | 6 | 3 | |
| | Octil | 8 | 6 | |
| | Octil ^P | 6 | 12 | |
| <i>C. rugosa</i> | CNBr | 7 | 2.5 | |
| | Octil | 7 | 4.8 | |
| <i>P. fluorescens</i> | CNBr | 7 | 1.5 | Fernández-Lorente y col., 2011 |
| | Octil | 7 | 1.1 | |
| <i>R. oryzae</i> | CNBr | 7 | 6.9 | |
| | Octil | 7 | 9.8 | |
| <i>Y. lipolytica</i> | CNBr | 7 | 1.1 | |
| | Octil | 7 | 10.5 | |

* *Enzima comercial libre*

Capítulo 12

Conclusiones

- ❖ Los resultados obtenidos señalan que las 2 cepas seleccionadas T110 y T5S, resultaron ser cepas termófilas productoras de lipasas termoestables, alcanzando títulos de actividad de 30 U/gms en FMS, empleando como soporte inerte agrolita.
- ❖ El bajo nivel de esporulación presentado por ambas cepas T110 y T5S nos obligó a producir el inóculo en medio líquido. Para ello una estrategia exitosa de producción de pre-inóculo e inóculo en medio líquido fue diseñada empleando membranas de celofán que facilitaron la desagregación del micelio.
- ❖ Las condiciones de producción de inóculo en medio líquido fueron: pre-inóculo crecido durante 7 días, desagregación manual de 3 discos de micelio durante 2 min en 2 mL que contenían 4 g de perlas de vidrio y un tiempo de incubación de 72 h de cultivo a una temperatura de 40 °C. Estas condiciones aseguraron un buen estado fisiológico del micelio producido en medio líquido y empleado en FMS.
- ❖ Los biocatalizadores producidos por FMS, resultaron ser altamente termoactivos a una temperatura óptima de actividad enzimática de 60 °C, e inclusive presentaron actividad hasta temperaturas superiores como 85 °C manteniendo el 100% de su actividad original.
- ❖ La estimación realizada para energías de activación y desactivación ($E_a = 27$ y 23 KJ/mol, $E_d = 11$ y 6 KJ/mol), demostró que ambos biocatalizadores pueden ser empleados en procesos llevados a altas temperaturas, debido a la relación obtenida de E_a/E_d . Inclusive sus bajos valores de E_d , muestra las ventajas de este tipo de biocatalizadores en reacciones que involucran altas temperaturas.
- ❖ Los estudios de estabilidad frente a la temperatura demostraron que los biocatalizadores producidos por FMS fueron altamente termoestables a temperaturas superiores de 50 °C, durante 4 h de incubación. Asimismo valores de vida media de 30 min fueron obtenidos para la cepa T110 a una temperatura de 70 °C. En el caso de la lipasa producida por la cepa T5S un valores de vida media $V_m = 120$ min, fue obtenida a una temperatura de 60 °C.

- ❖ Las cepas termófilas empleadas en este trabajo mostraron que bajo condiciones isotérmicas no existe diferencia significativa al incrementar la temperatura en los parámetros cinéticos de la fermentación y la producción de lipasas por ambas cepas, por lo que no existen condiciones de acumulación de calor.

- ❖ La caracterización de los biocatalizadores en términos de estabilidad frente al pH, mostraron que ambas enzimas son estables a pH alcalinos, por lo tanto existe la posibilidad de emplear estas enzimas producidas por FMS en la industria de los detergentes; y en reacciones que se llevan cabo a altas temperaturas y pH alcalinos.

- ❖ La reacción de hidrólisis selectiva de aceite de sardina, presentó resultados relevantes exhibiendo una alta relación de selectividad EPA/DHA 16.6, la cual fue 4 veces mayor que la reportada para otras preparaciones comerciales. Estos resultados sugieren que el biocatalizador podría ser eficientemente usado para la separación de aceite de sardina enriquecido con EPA y DHA.

Capítulo 13

Bibliografía

13.-Bibliografía

A

Aguilar, C y Huitrón, C. (1987). *Enzyme Microbial Technology*, 9, 690-696

Aguilar, C.N., Augur, C., Favela-Torres, E. Viniegra-González G. (2001). *Process Biochemistry*, 36, 565-570.

Akanbi, T.O., Adcock, J. L. Barrow, C.J. (2013). *Food Chemistry*, 138, 615-620.

Akoh, C.C. and Yee, L. N. (1997). *Journal of the American Oil Chemists Society*, 74, 1409–1413.

Alexandrov, V.Y. (1977). *Springer-Verlag KG*, Berlin, Germany.

Aryee, ANA., Simpson, BK., Villalonga, R. (2007). *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 3, 394-402.

Ali, S., Farooq L., Akhtar, A., Rajoka M. (2010). *Annals of Microbiology*, 60, 21–29.

Allen, D. R., Mozhaev, V.V., Valivety, R.H. U.S. (2006). *Patent 7,067,291*

Arima, K., Liu, W.H., Beppu, T. (1972). *Agricultural and Biological Chemistry*, 36, 11, 1913-1917.

Azeredo, L., Gomes, P., Sant Anna, G., Casthilo, L. Freire, D. (2007). *Current Microbiology*, 54, 361-365

Azevedo, A.M., Prazeres D.M., Cabral, J. M., Fonseca L. P. (2001). *Journal of Molecular Catalysis. B: Enzyme*, 15, 147–153.

B

Bancerz, R., and Ginalska G. (2007). *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 34, 553–560.

Babitha, S., Soccol, C.R., Pandey, A. (2007). *Bioresource. Technology*, 98, 1554–1560.

Bhale, S. D., Xu, Z., Prinyawiwatkul, W., King, J. M. Godber, J. S. (2007). *Journal of Food Science*, 72, C504-C508.

Beisson, F., Tiss, A., Riviere, C., Verger, R. (2000). *European Journal of Lipid Science and Technology*, 133–153

Ben, Bacha A., Gargouri, Y., Ben Ali, Y., Miled, N., Reinbolt, J., Mejdoub, H. (2005). *Enzyme and Microbial Technology*, 37, 3, 309-317.

Bokhari, S. A. I., Rajoka, M. I., Javaid, A., Shafiqur, R., Ishtiaqur, R., Latif, F. (2010). *Bioresource Technology*, 101, 2800-2808.

Bornscheuer, T.U., Bessler, C., Srinivas, R., Krishna, S.H. (2002). *Trends Biotechnology*, 20, 433-437.

C

Chaudhuri, A., Bharadwaj, G., Maheshwari, R. (1999). *FEMS Microbiology Letters*, 177, 39-45

Chakravorty, D., Parameswaran, S., Dubey, V.K., Patra, S. (2011). *Extremophiles*, 15, 89–103

Cao, L. (2005). *Current Opinion in Chemical Biology*, 9, 217–26.

Cao, L., Bornscheuer, UT., Schmid, RD. (1999). *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 6, 279–285.

Ciafardini, G., Zullo, BA., Cioccia, G. (2005). *European Journal of Lipid Science and Technology*, 107, 12, 851-856

Ciafardini, G., Zullo, BA., D'Amico, A., Cioccia, G., Maiuro, L. (2006). *Annals of Microbiology*, 56, 3, 231-235

Chang, SW., Shaw, JF. (2009). *New Biotechnology*, 26, 109–16.

Cooney, D. G., and Emerson, R. (1964). *Thermophilic fungi*.

Cordenons, A., Gonzalez, R., Kok, R., Hellingwerf, K., Nudel, C. (1996). *Biotechnology Letters*, 18, 633–638

Córdova, J., Nemmaoui, M., Ismaili-Alaoui, M., Morin, A., Roussos, S., Raimbault, M., Benjlali, B. (1998). *Journal of Molecular Catalysis. B: Enzymatic*, 5, 75-78.

Córdova, J., Roussos, S., Baratti, J., Nungaray, J., Loera, O. (2003). *Micology Applied. International*, 15, 2, 37-44.

Comeau, L., Essamri, M., Deyris, V. (1998). *Journal of Biotechnology*, 60, 1, 97-103

Cowan, A., Fernández-Lafuente, R., (2011). *Enzyme and Microbial Technology*, 49, 326–346

Couri, E.P., Mercés, B.C.V., Neves, L.F. (2006). *Journal of Microscopy*, 224, 3, 290–297

D

Darvishi, F., Destain, J., Nahvi, I., Thonart, P., Zarkesh-Esfahani, H. (2011). *Nature Biotechnology*, 28, 6, 756–760

Domínguez, A., Costas, M., Longo, M.A, (2003). *Biotechnology Letters*, 25, 1225-1229.

E

Elibol, M., Ozer, D. (2000). *Process Biochemistry*, 36, 325-329.

F

Fernández- Lafuente, R. (2010). *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 62, 197–212

Fernández-Lorente, G., Cabrera, Z., Godoy, C., Fernández-Lafuente, R., Palomo, J.M., Guisán, J.M. (2008). *Process Biochemistry*, 43, 1061–1067.

Fernández-Lorente, G., Betancor, L., Carrascosa, A. V., Guisán, J. M. (2011). *Journal of the American Oil Chemists Society*, 88, 1173-1178.

Fernández-Lorente, G., Betancor, L., Carrascosa, A. V., Palomo, J. M., Guisan, J. M. (2012). *Journal of the American Oil Chemists Society*, 89, 97–102.

Freitas, L., Bueno, T., Perez, V.H., Santos, J.C., De Castro, H.F. (2007). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23, 1725–1731.

Fuciños, P., Abadin, C.M., San Román, A., Longo, M.A., Pastrana, L., Rúa, M.L. J. (2005). *Journal of Biotechnology*, 117, 233–241.

G

Gaffney, M., Doyle, S., Murphy, R. (2009). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 73, 2640-2644.

Goldstein, L. (1976). *Methods of Enzymology*, 44, 397-443.

Gomes, E., Regina de Souza, S., Picolo Grand, R., Da Silva, R. (2005). *Brazilian Journal of Microbiology*, 36, 75-82

Gomes, J., Purkarthofer, H., Hayn, M., Kapplmuller, J., Sinner, M., Steiner, W. (1993). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 39, 700-707

Gruber, K., Klintschar, G., Hayn, M., Schlacher, A., Steiner, W., Kratky, C. (1998). *Biochemistry*, 37, 13475–13485.

Gulati, H. K., Chadha, B. S., Saini, H. S. (2007). *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 54,121–138

Gunstone, FD. (1999). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79, 12, 1535-1549

Gumel, A. M., Annuar, M. S. M., Heidelberg, T., Chisti, Y. (2011). *Process Biochemistry*, 46, 2079-2090.

Gutarra, M., Godoy, M., Maugeria, F., Rodríguez, MI., Freire, D., Castilho, L. (2009). *Bioresource Technology*, 100, 5249–5254

Gupta, A., Ray, S., Kapoor, S., Khare, S. K. (2008). *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 15, 234–243.

H

Haki, G.D., Rakshit, S.K. (2003). *Bioresource Technology*, 89, 17-34

Hernández-Rodríguez, B., Córdova, J., Bárzana, E. y Favela-Torres, E. (2009). *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 61, 136-142.

Hiol, A., Jonzo, MD., Rugani, N., Druet, D., Sarda, L., Comeau, LC. (2000). *Enzyme Microbiology and Technology*, 26, 421–430

Hölker, U., Höfer, M., Lenz, J. (2004). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64, 175-186.

Houde, A., Kademi, A., Leblanc, D. (2004). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 118, 155-169

J

Jaeger, K.E., Reetz, M.T. (1998). *Biotechnology Letters*, 16, 396-403.

Jensen, B., Olsen, J., Allermann, K. (1987). *Biotechnology Letters*, 9, 5, 313-316

Jensen, B., Nebelong, P., Olsen, J., Reeslev, M. (2002). *Biotechnology Letters*, 24, 41-45

Jurado, E., Camacho, F., Luzon, G., Fernandez-Serrano, M., Garcia-Roman, M. (2008).

Biochemical. Engineering Journal, 40, 473-484.

K

Kademi, A., Lee, B., Houde, A. (2003). *Indian Journal Biotechnolgy*, 2, 346-355.

Kamra, P., and Satyanarayana, T. (2004). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 19, 150-163

Karabulut, I., Durmaz, G., Hayaloglu, A.A. (2009). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 10466-10470

Kheadr, E. E., Vuilleumard, J. C., El-Deeb, A. A. (2002). *Journal of Food Science*, 67, 485-492.

Kheadr, E. E., Vuilleumard, J. C., El-Deeb, A. A. (2003). *Food Research International*, 36, 241-252.

Kim, B.S., and Hou C.T. (2006). *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 29, 1, 59-64

Khor, G. K., Sim, J. H., Kamaruddin, A. H., Uzir, M. H. (2010). *Bioresource Technology*, 101, 6558-6561.

Kota, K.P., Sridhar, P. (1999). *Process Biochemistry*, 34, 325-328.

Kumar, S., Ola, R.P., Pahujani, S., Kaushal, R., Kanwar, S.S., Gupta, R. (2006). *Journal of Applied Polymer Science*, 102, 4, 3986-3993

Kumar, S.S., Gupta, R., (2008). *Process Biochemistry*, 43, 10, 1054-1060

Kumar, S., and Nussinov, R. (2001). *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58, 1216-1233

Kuthubutheen, A. J. (1983). *Mycopathologia*, 82, 45-48.

Kunamneni, A., Permaul, K., Singh, S. (2005). *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100, 2, 168-171.

L

Lailaja, V.P., Chandrasekaran, M. (2013). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29, 8, 1349-1360

Li, X., Jia, R. (2008). *Bioresource. Technology*, 99, 15, 6885–6892.

Lima, V.M., Krieger, N., Sarquis, M.I.M., Mitchell, D.A., Ramos, L.P., Fontana, J.D. (2003). *Food Technology and Biotechnology*, 41, 105-110.

Lin, S.F., Chiou, C.M., Tsai, Y.C. (1995). *Biotechnology. Letters*, 17, 959-962.

Liu, D., Schmid, R.D., Rusnak, M. (2006). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72, 1024–1032

M

Macrae, A.R., Hammond, R.C. (1985). *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 3, 193-217

Mala, J.S., Takeuchi S. (2008). *Journal Analytical Chemistry Insights*, 3, 9–19

Maheshwari, R., Bharadwaj, G., Mahalingeshwara, K.B. (2000). *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64, 461-488.

Martín Valverde, L., González Moreno, P. A., Rodríguez Quevedo, A., Hita Peña, E., Jiménez Callejón, M. J., Esteban Cerdán, L., Molina Grima, E., & Robles Medina, A. (2012). *Journal of the American Oil Chemists Society*, 89, 1633–1645.

Mateo, C., Palomo, J.M., Fernández-Lorente, G., Guisan, J.M., Fernández-Lafuente, R. (2007). *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 6, 1451-1463.

Mateos Diaz, J. C., Rodríguez, J. A., Roussos, S., Cordova, J., Abousalham, A., Carriere, F., Baratti, J. (2006). *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 1042-1050.

Mitchell, D.A., Krieger, N., Stuart, D.M., Pandey, A. (2000). *Process Biochemistry*, 35, 1211–1225

Morinaga, T., Kanda, S. Nomi R., (1986). *Journal of Fermentation Technology*, 64, 451-453

N

Namoodiri, V. M. H. and Chattopadhyaya, R. (2011). *Lipids*, 35, 495-502.

Nawani, N., Khurana, J., Kaur, J. (2006). *Molecular and Cellular Biochemistry*, 290, 17–22

Nunes, P. A., Pires-Cabral, P., Ferreira-Dias, S. (2011). *Food Chemistry*, 127, 993

Ng, IS, Tsai, SW. (2006). *Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers*, 37, 4, 375-382

O

- Ogino, H., Uchiho, T., Doukyu, N., Yasuda, M., Ishimi, K., Ishikawa, H. (2007). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 358, 1028–1033.
- Omar, I. C., Nishio, N., Nagai, S. (1987). *Agricultural and Biological Chemistry*, 51, 2145-2151.
- Osborn, H. T. and Akoh C. C. (2002). *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 3, 93–103.

P

- Palomo, J.M., Fernández-Lorente, G., Guisán, J.M., Fernández-Lafuente, R. (2007). *Advanced Synthesis and Catalysis*, 349, 1119–1127.
- Pandey, A., Benjamin, B., (1996). *Bioresource Technology*, 55, 167-170.
- Pandey, A., Benjamin, S., Soccol, C. R., Nigam, P., Krieger, N., Soccol, V. (1999). *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 29,119–131.
- Pandey, A. (2003). *Biochemical Engineering Journal*, 13, 2, 81–84
- Pandey, A., Soccol, C.R., Larroche, C., (2007). *Springer Science Asiatech Publishers, Inc. New York, USA New Delhi, India.* 13–25.
- Pazhang, M., Khajeh, K., Ranjbar, B., Hosseinkhani, S. J. (2006). *Biotechnology*, 127, 45–53.
- Pan, WZ ., Huang, XW ., Wei, KB ., Zhang, CM ., Yang, DM ., Ding, JM ., Zhang, KQ. (2010). *Journal of Microbiology*, 48, 2, 146-152.
- Pereira, E. B., De Castro, H. F., De Moraes, F. F., Zanin, G. M. (2001). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 91–93, 739–752
- Phillips, M.A. (2010). *Rev Clin Gerontol*, 20, 219–238
- Pirt, S.J. (1975). *Blackwell Scientific Publications, Oxford.*
- Prathumpai, W., Flitter, S. J., McIntyre, M., Nielsen, J. (2004). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65, 714–719.

Puchart, V., Vrsanskaa, M., Svobodab, P., Pohl, J., Bielya, P. (2008). *Biochimica et Biophysica Acta*, 1674, 239–250

R

Ramachandran, S., Larroche, C., Pandey, A., (2007). *Springer Science Asiatech Publishers, Inc., New York, USA New Delhi, India*, 230–252.

Rashid, F.A.A., Rahim, R.A., Ibrahim, D., Balan, A., Abu Bakar, N.M. (2013). *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 7, 3, 1635-1645

Rodrigues, R. C., Godoy, C. A., Volpato, G., Ayub, M. A. Z., Fernandez-Lafuente, R. y Guisan, J. M. (2009). *Process Biochemistry*, 44, 963-968.

Rodríguez, J.A., Mateos, J.C., Nungaray, J., Gonzalez-Viniegra, G., Bhagnagar, T., Roussos, S., Cordova, J., Baratti, J. (2006). *Process Biochemistry*, 41, 2264–2269

Rodriguez, R. C., Ortiz, C., Berenguer-Murcia, A., Torres, R., Fernández-Lafuente, R. (2013). *Chemical Society Reviews*, 42, 6290–6307.

Robledo-Olivo, A., Contreras-Esquivel, J.C., Rodríguez-Herrera, R., Aguilar, C.N. (2009). *International Journal of Food Engineering*, 5, 1-13

Rubio-Rodríguez, N., Beltrán, S., Jaime, I., Diego, S. M., Sanz, M. T., Carballido, J. R. (2010). *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11, 1–12

S

Salihu, A., Alam, M.Z. AbdulKarim, M.I., Salleh, H.M. (2012). *Resources Conservation and Recycling*, 58, 36-44

Sandana Mala, J.G., Edwinoliver, N.G., Kamini, N.R., Puvanakrishnan, R. (2008) *Journal of General and Applied Microbiology*, 53, 4; 247-253

Santos, A. M. P., & Mauger, F. (2007). *Food Technology & Biotechnology*, 45, 181–186

Saucedo-Castañeda, G., Trejo-Hernández, M.R., Lonsane, B.K., Navarro, J.M., Roussos, S.,

Dufour, D., Raimbault, M. (1994). *Process Biochemistry*, 29, 13-24.

Saucedo-Castañeda, G., Favela-Torres, E., Viniegra-González, G., Torres-Mancera, M.T., Figueroa-Montero, A.A. Rosales-Zamora G. (2013). *Solicitud de patente IMPI, MX/a/2013/004638*.

Schmidt-Dannert, C., Sztajer, H., Stocklein, W., Menge, U., Schmid, R.D. (1994). *Biochemistry Biophysics Acta*, 1214, 43–53.

Sharma, R., Soni, S., Vohra, R., Gupta, L., Gupta J. (2002). *Process Biochemistry*, 37, 1075–1084.

Shrivastava, S., Shukla, P., Deepalakshmi, PD., Mukhopadhyay, K (2013). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29, 12, 2407-2415

Singhania, R.R., Kumar, A.P., Soccol, C.R., Pandey, A. (2009). *Biochemical Engineering Journal*, 44, 13–18

Stepankova, V., Bidmanova, S., Koudelakova, T., Prokop, Z., Chaloupkova, R., & Damborsky, J. (2011). *ACS Catalysis*, 3, 2823–2836

Svensson, I., Adlercreutz, P., Mattiasson, B. (1990). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 33, 255–258.

T

Tiller, J. C., Bruns, N. (2005). *Nano Letters (ACS Publications)*, 5, 45–48.

Tomasini, A., Barrios-Gonzalez, J., Mejia, A. (1997). *Advances in Solid State Fermentation*, 417-425

Treichel, H., Oliveira, D., Mazutti, M.A., Di Luccio, M., Oliveira, J.V. (2010). *Food Bioprocess Technology*, 3, 182–196.

Turki, S. (2013). *Biotechnology Letters*, 35, 1551–1560

V

Viniegra-González, G., Favela-Torres, E., Aguilar, C., Romero-Gomez, S. D. J., Díaz-Godínez, G., & Augur, C. (2003). *Biochemical Engineering Journal*, 13, 157–167.

W

Wen Hsiung, L., Beppu, T., Arima K., (1972). *Agricultural and Biological Chemistry*, 36, 1919-1924.

Wolski, E., Menusi, E., Remonatto, D., Vardanega, R., Arbter, F., Rigo, E., Ninow, J., Mazutti, M. A., Di Luccio, M., de Oliveira, D., Treichel, H. (2009). *Food Science and Technology*, 42, 1557-1560.

Wu, X., Jaaskelainen, S., Linko, Y., (1996). *Enzyme Microbial Technology*, 19, 226–231.

X

Xu, J.H., Kato, Y., Asano, Y. (2001). *Biotechnology and Bioengineering*, 73, 493–499.

Y

Yadav, GD., Borkar, IV. (2010). *Procces Biochemistry*, 45, 4, 586-592.

Z

Zhang, J., Guo, N., Zhou, HB.(2014). *Journal of Basic Microbiology*, 54, 12, 1410-1416.

Zheng, YY., Guo, XH., Song, NN ., Li, D.C. (2006). *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 69, 3, 127-132.

Zhu, K., Jutila, A., KJ. Tuominen, A., Svendsen, A., Paavo K.J. (2001). *Biochimica et Biophysica Acta*, 1547, 329-338.

Anexos

ANEXO A

Pretratamiento y tamizado del soporte

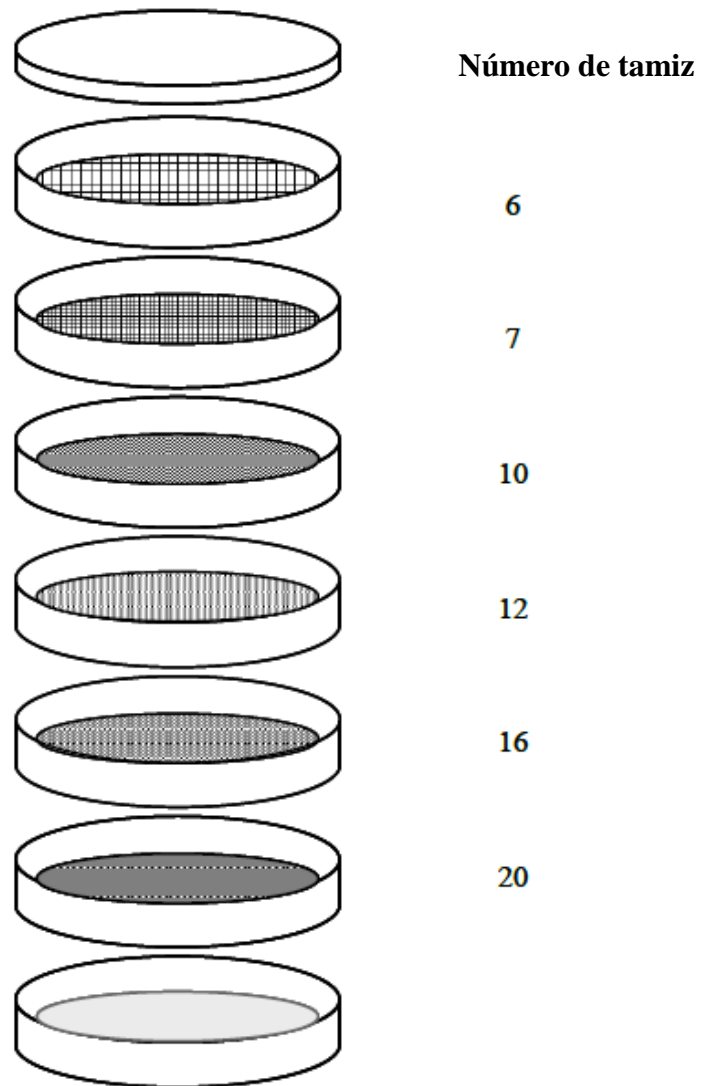


Fig. A1. Secuencia de ordenamiento para el tamizado de agrolita como soporte inerte empleado en FMS.

ANEXO B

Secuenciación de las cepas *T. lanuginosus*

Microorganismo: *Thermomyces lanuginosus* T5S

ID Genbank:

Por ITS: *Thermomyces lanuginosus* strain SS-2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence, ; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence. Max ident:

Sequence

TAAGTTCAGCGGGTACTCCTACCTGATCCGAGGTCAACCTTGGAAGA
ATTGACCTTCAGAGGCTATGGCCCCGGCCGGACCCCTCCTTGAGCGC
GTGACAGAGCCCCATACGCTCGAGGACCGGACGCGACGCCGCCGCT
GCCTTTCAGGCCCGTCCCCTCCAAACGAGGGGACGGCGGCCCAACAC
ACAAGCCGTGCTTGAGGGTTCGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCC
CCCGGAATACCAGAGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTC
ACGGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTC
ATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCATTGTTGAAAGTTTTGAACGATT
GCATTTTCGTCACTCAGACAATCCTCGCATTACAAAAGCGTTCACAGT
GAGTGCCTCTGGCGGGCACGGGCCCGGGGGCACACCGCGCCCCGG
GACGACCCCCCGGCGGAACACCGGAGGAGTGGGCCCCGCCAAAGCA
ACACTAGGTGTGGTAGACACGGGTGGGAGATTGGGACCCGACTGGG
TTCCCGCACTCGGTAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAACC
TTGTTACGAAACTTTTACATCCA

Microorganismo: *Thermomyces lanuginosus* T110

ID Genbank:

Thermomyces lanuginosus strain T1.10aB 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence.

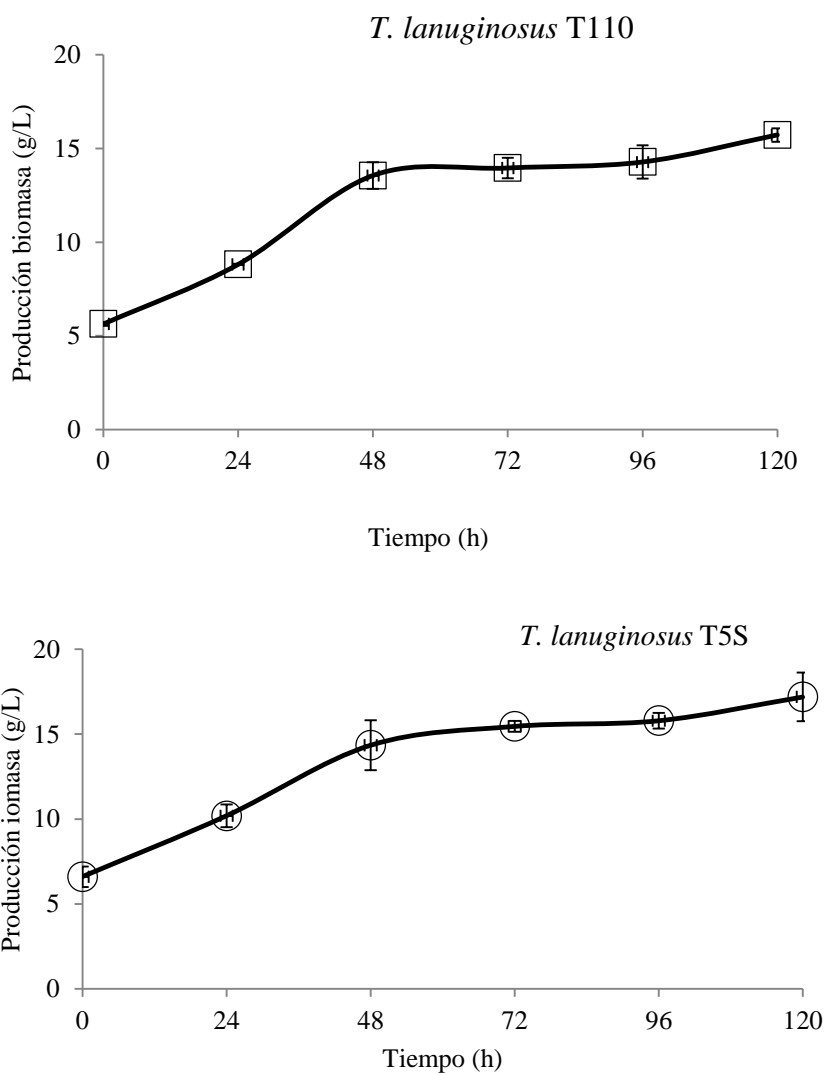
Sequence

**TAGTCGCGGGTACTCCTACCTGATCCGAGGTCACCTTGGAA
GAATTGACCTTCAGAGGCTATGGCCCCGGCCGGACCCCTCC
TTGAGCGCGTGACAGAGCCCCATACGCTCGAGGACCGGACG
CGACGCCGCCGCTGCCTTTCAGGCCCGTCCCCTCCAAACGA
GGGGACGGCGGCCCAACACACAAGCCGTGCTTGAGGGTTC
GCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATACCAGAG
GGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACGGAATTC
TGCAATTCACATTA TACTTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATC
GATGCCGGAACCAAGAGATCCATTGTTGAAAGTTTTGAACG
ATTGCATTTCGTCACTCAGACAATCCTCGCATTACAAAAGC
GTTACAGTGAGTGCTTCTGGCGGGCACGGGCCCCGGGGG
CACACCGCGCCCCGGGACGACCCCCCGGCGGAACACCGG
AGGAGTGGGCCCGCCAAAGCAACTAGGTGTGGTAGACAC
GGGTGGGAGCATGGGACCCGACTGGGTTCGCGCACTCGGT
AATGATCCTTCCGCACGTTACCTAA**

ANEXO C

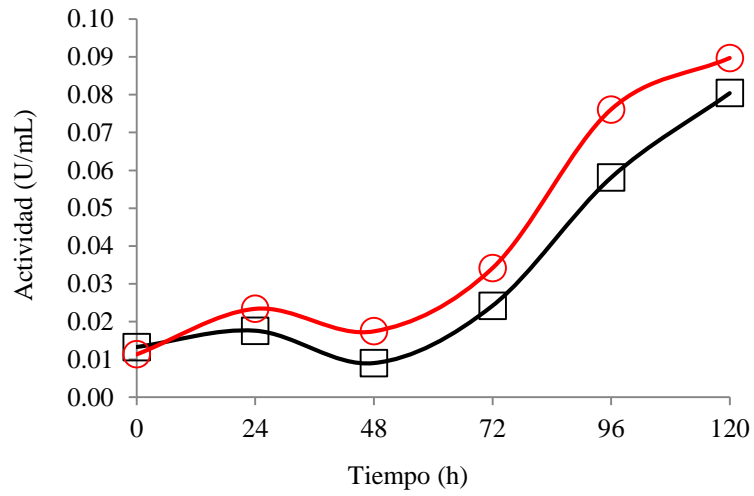
Estandarización de inóculo en medio líquido

Cinética 1. Producción de biomasa



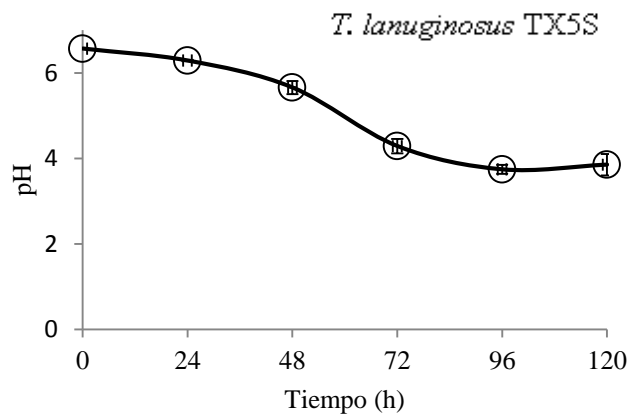
C1.- Producción de biomasa obtenida por el hongo termófilo *T. lanuginosus* T110 y T5S en cultivo líquido durante 120 h, pH inicial 6.5.

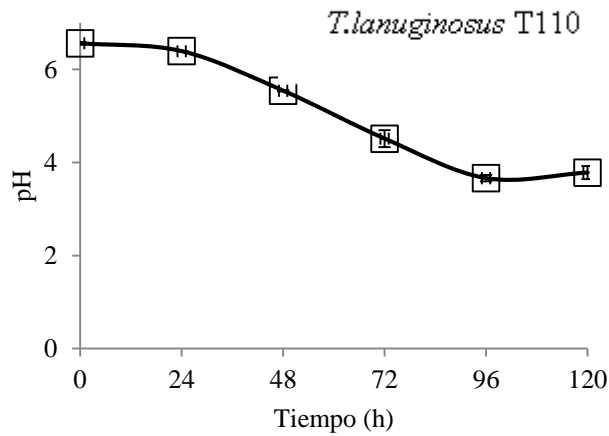
➤ **Actividad enzimática**



C2.- Determinación de actividad enzimática, en los extractos producidos por cultivo líquido durante 120 h para las cepas de *T. lanuginosus* T110 y *T. lanuginosus* T5S

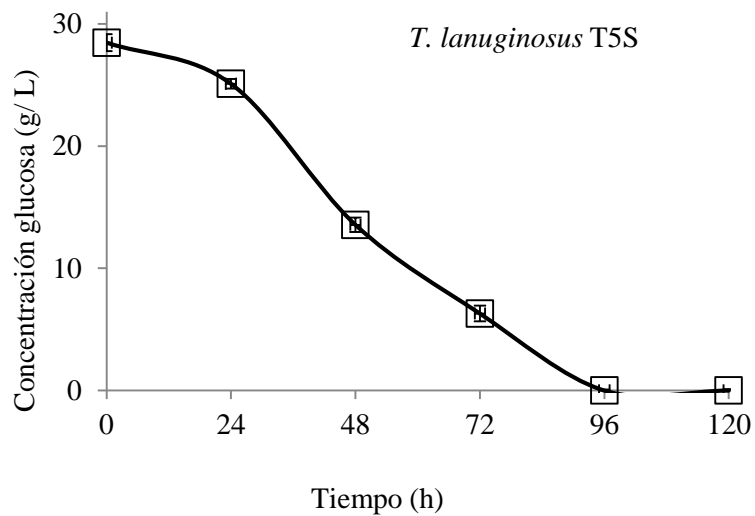
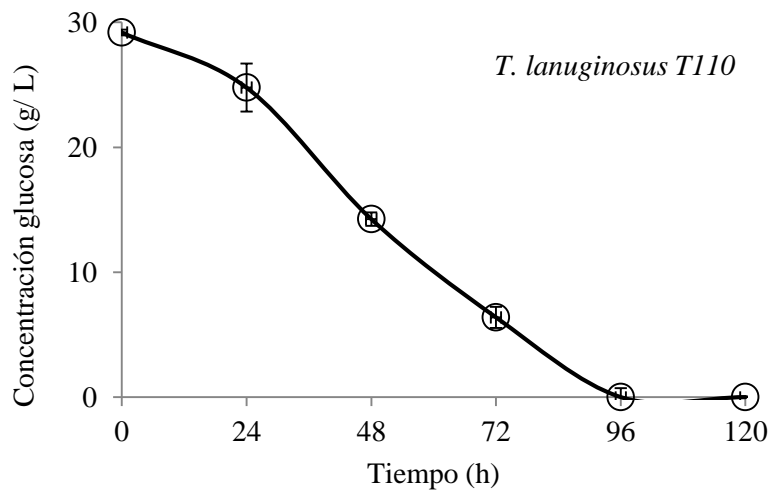
➤ **Comportamiento pH**





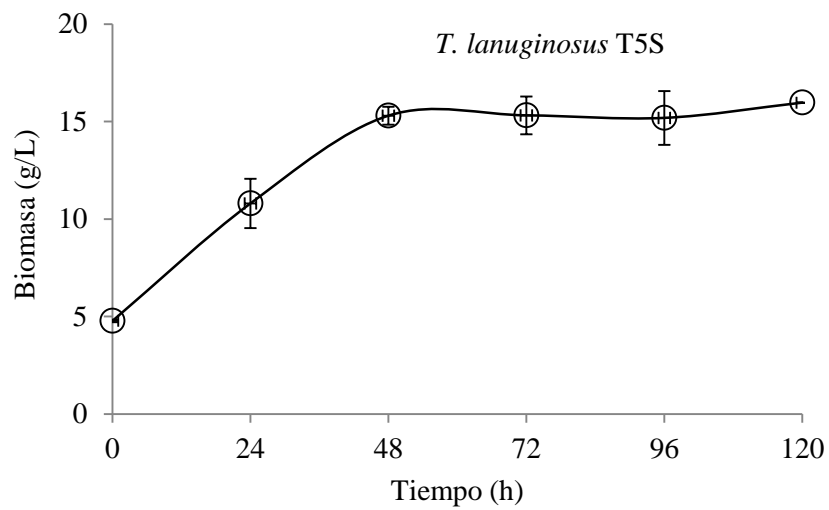
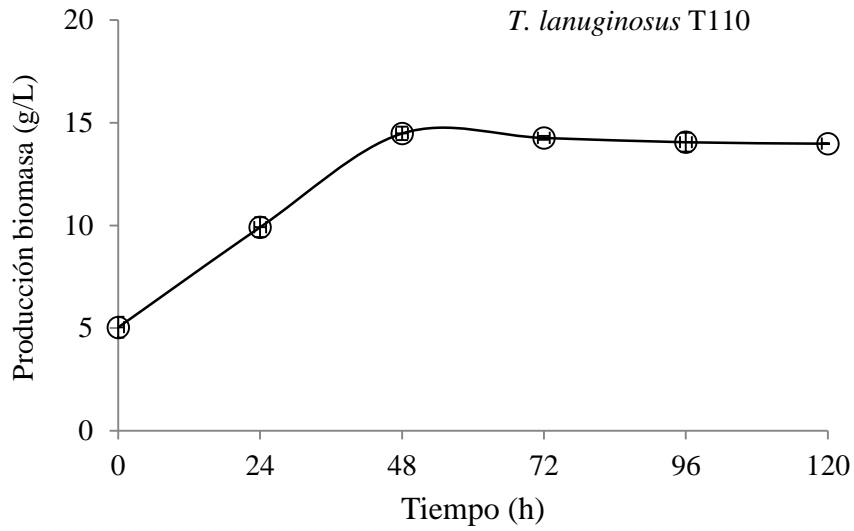
C3.- Comportamiento del pH durante la cinética en cultivo líquido en cepas de *T. lanuginosus* T5S y T110

➤ **Consumo de Glucosa**



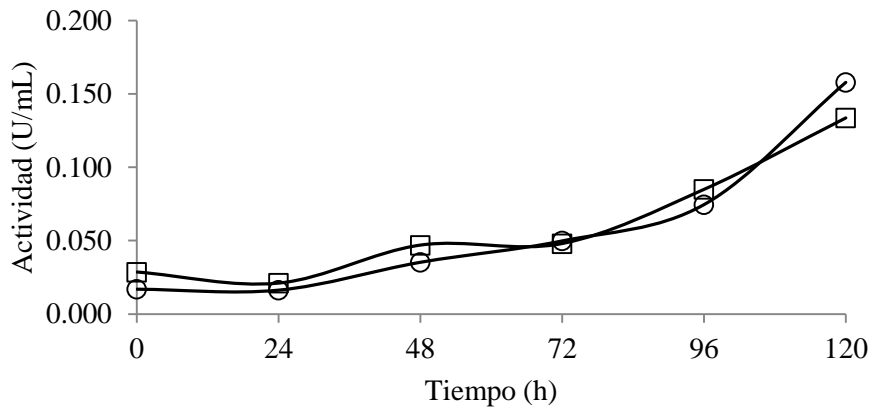
C.4.- Producción de biomasa obtenida por el hongo termófilo *T. lanuginosus* T110 y *T. lanuginosus* T5S en cultivo líquido durante 120 h, pH inicial 6.5.

Cinética 2. Producción de biomasa

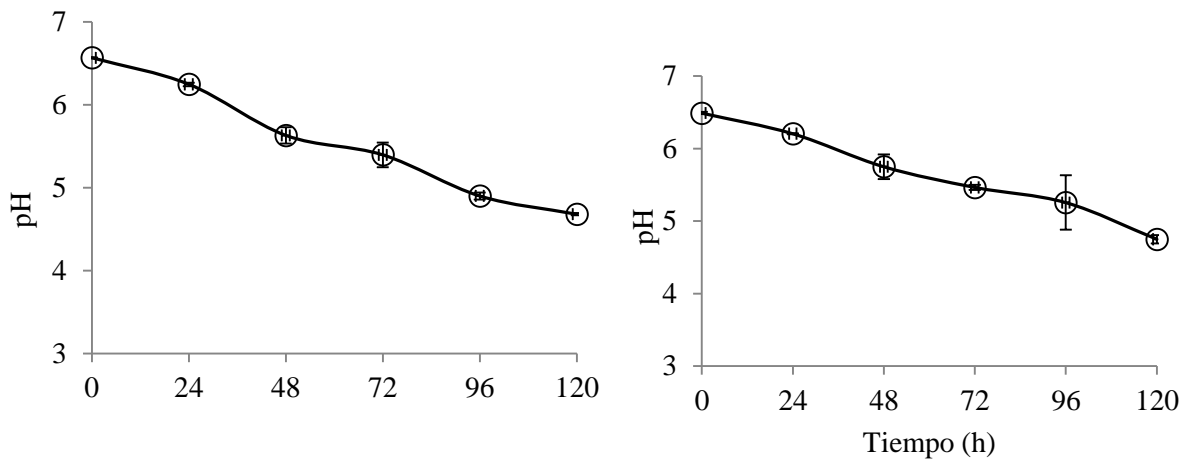


C5.- Producción de biomasa obtenida por el hongo termófilo *T. lanuginosus* T110 y T5S en cultivo líquido durante 120 h, pH inicial 6.5.

➤ **Actividad enzimática**

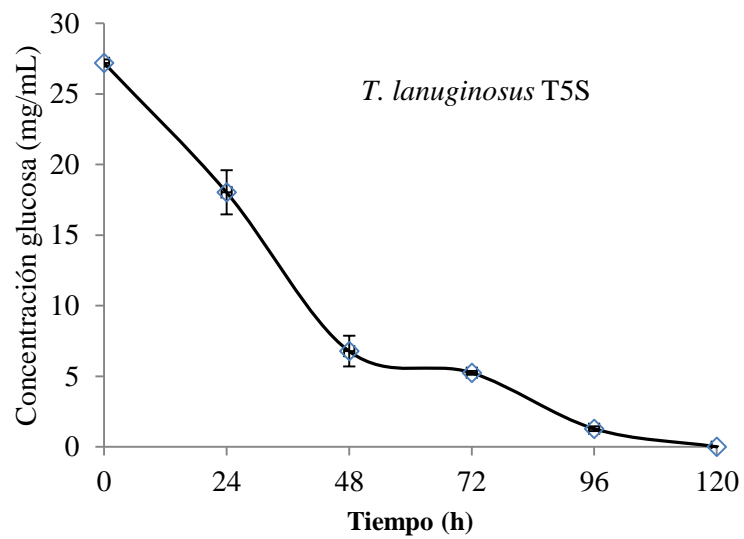
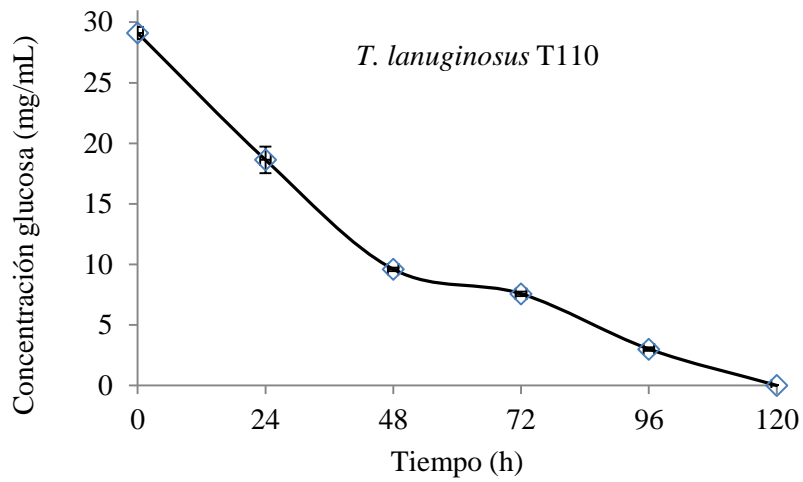


C6.- Determinación de actividad enzimática, en los extractos producidos por cultivo líquido durante 120 h para las cepas de *T. lanuginosus* T110 y *T. lanuginosus* T5S



C7.- Efecto del pH producido durante cultivo líquido de *T. lanuginosus* T110 y T5S

➤ **Consumo de Glucosa**



C.8.- Producción de biomasa obtenida por el hongo termófilo *T. lanuginosus* T110 y *T. lanuginosus* T5S en cultivo líquido durante 120 h, pH inicial 6.5.

ANEXO D

Curva estándar de *p*-nitrofenol (410 nm, pH 8, 45 °C)

Para la elaboración de la curva estándar se realizaron diluciones seriadas a partir de una solución patrón de *p*-nitrofenol a una concentración 10 mM en 2-propanol. Posteriormente cada una de las diluciones fue agitada en vórtex durante 10 s, incubados a 30 °C por 10 min y se midió la absorbancia de las muestras a 405 nm en un lector de microplaca (Biotek Elx808). Los valores obtenidos de absorbancia *versus* concentración de *p*NF (mol/mL) se graficaron y se realizó un ajuste de datos por regresión lineal simple. A partir de la pendiente se determinó el coeficiente de extinción molar CEM= 5879 M⁻¹cm⁻¹.

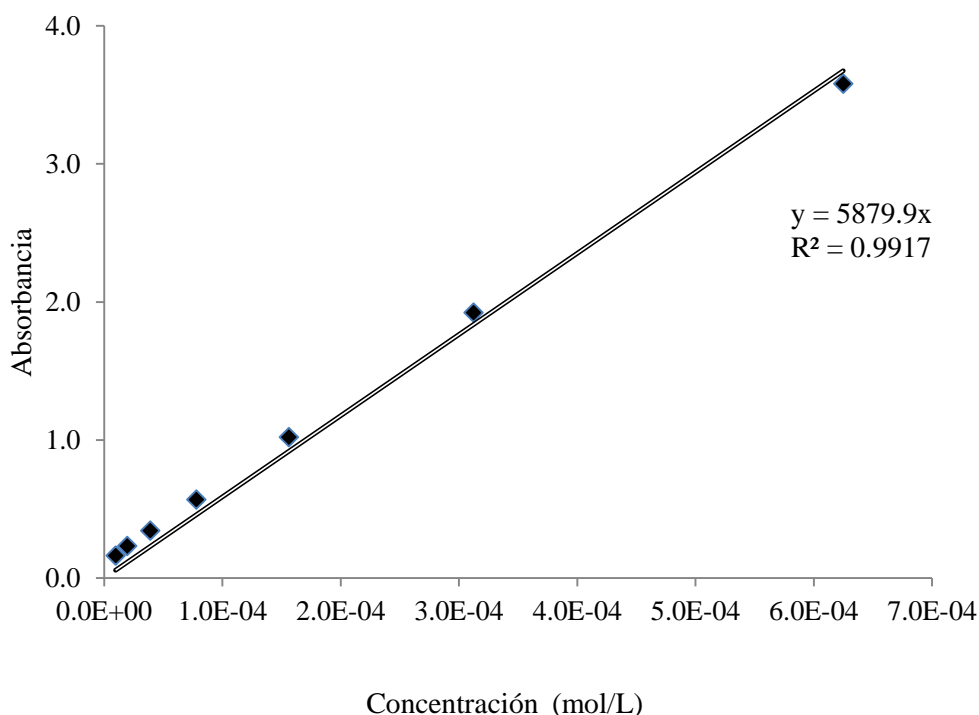


Figura AD. Curva estándar de *p*-nitrofenol a pH 8

ANEXO E

Cálculos de actividad enzimática

La actividad enzimática evaluada durante este trabajo fue evaluada a través de técnicas de ésteres de p-nitrofenol, y pH- Stat

Para realizar el cálculo de actividad enzimática, fue necesario realizar un ensayo control:

$$\frac{(\text{Absorbancia muestra} - \text{Absorbancia blanco}) * (\text{Volumen de reacción}) * (1000) * Fd}{\text{Coeficiente de extinción molar} \quad (\text{Volumen del extracto})}$$

Ejemplo:

Si m muestra=0.275 A

m blanco=0.021

Coeficiente= 5.879 mol/L ^{cm-1}

Volumen de reacción=0.15mL

Volumen del extracto=0.005mL

Fd=10, 100,1000.

Sustituyendo:

Actividad:

(0.275UA- 0.02UA1) * (0.015mL) (1000mL) (10mL) (10) (65gmh)

5879Mol/L cM-1 (0.05mL) (1L) (1gmh) (100gms)

Actividad= **34.787 U/gms**

ANEXO F

Cálculos de energías de activación y desactivación

Los cálculos de energía de activación fueron determinados a partir de los ensayos de efecto de temperatura en la actividad.

1.- La ecuación de Arrhenius fue empleada para determinar la E_a y E_d de ambas cepas;

Considerando;

$$\ln(k) = \ln(A) - \frac{E_a}{R} \left(\frac{1}{T} \right)$$

* *Calculamos los inversos de las temperaturas utilizadas (30-85 °C) y $\ln k$ de la velocidad enzimática reportada a las diferentes temperaturas:*

** *En donde la pendiente $m = -E_a/R$*

***Por lo tanto $E_a = -m \cdot R$*

** *$E_a = (3286) \cdot (8.324 \text{ KJ/mol.K}) / (1000)$*

** *$E_a = 27.3 \text{ KJ/mol}$*

2.- Para los cálculos de energía de desactivación temperaturas superiores a 60 °C, fueron consideradas para la desactivación térmica de las enzimas:

** *En donde la pendiente $m = -E_d/R$*

***Por lo tanto $E_d = -m \cdot R$*

** *$E_d = (3286) \cdot (8.324 \text{ KJ/mol.K}) / (1000)$*

** *$E_d = 11.01 \text{ KJ/mol}$*

ANEXO G

Resultados de análisis estadísticos

A continuación se presentan los resultados de los análisis de varianza (ANOVA), así como las pruebas de diferencia de medias obtenidas con ayuda del paquete estadístico SPSS21.

1.- Efecto del índice de potencia producido por las cepas termófilas del grupo I y II

ANOVA

INDICEP

| | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|------------------|-------------------|----|------------------|------|------|
| Entre grupos | .044 | 2 | .022 | .877 | .438 |
| Dentro de grupos | .348 | 14 | .025 | | |
| Total | .392 | 16 | | | |

INDICEP

| | | | Subconjunto para alfa = 0.05 |
|--------------------------|-------|---|------------------------------|
| | CEPAS | N | 1 |
| HSD Tukey ^{a,b} | R | 2 | 1.1500 |
| | X | 8 | 1.2975 |
| | T | 7 | 1.3143 |
| | Sig. | | .341 |

Conclusión: No existe diferencia significativa entre los valores de I.P obtenidos por los grupos de cepas empleados en el trabajo R= Género *Rhizopus*, T= *Thermomyces*, X= Cepas no identificadas.

2.- Efecto del tamaño de inóculo en los parámetros cinéticos de crecimiento por las cepas termófilas T110 y T5S.

- a) Máxima producción de CO₂
- b) Tasa de producción de CO₂
- c) Fase lag
- d) Tasa específica de crecimiento (μ)

ANOVA

| | | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|---------------------------------------|------------------|-------------------|----|------------------|-------|------|
| MAXCO ₂ | Entre grupos | 1347.039 | 2 | 673.520 | 1.825 | .303 |
| | Dentro de grupos | 1106.956 | 3 | 368.985 | | |
| | Total | 2453.996 | 5 | | | |
| Tasa de producción de CO ₂ | Entre grupos | 2.228 | 2 | 1.114 | 1.593 | .338 |
| | Dentro de grupos | 2.098 | 3 | .699 | | |
| | Total | 4.326 | 5 | | | |
| FASE LAG | Entre grupos | 2.657 | 2 | 1.329 | 6.656 | .079 |
| | Dentro de grupos | .599 | 3 | .200 | | |
| | Total | 3.256 | 5 | | | |
| μ | Entre grupos | .004 | 2 | .002 | .444 | .678 |
| | Dentro de grupos | .015 | 3 | .005 | | |
| | Total | .019 | 5 | | | |

Conclusión: No existe diferencia significativa entre los valores de los parámetros cinéticos obtenidos para las cepas.

3.- Efecto del tamaño de inóculo en la actividad enzimática producida por las cepas T110 y T5S.

ANOVA

ACTIVIDAD ENZIMATICA

| | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|------------------|-------------------|----|------------------|------|------|
| Entre grupos | 169.251 | 2 | 84.626 | .262 | .786 |
| Dentro de grupos | 970.499 | 3 | 323.500 | | |
| Total | 1139.751 | 5 | | | |

Conclusión: No existe diferencia significativa entre los valores de actividad enzimática, a los diferentes tamaños de inóculo

4.- Efecto del pH inicial en los parámetros cinéticos de crecimiento de las cepas termófilas T110 y T5S.

ANOVA

| | | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|--------------------|------------------|-------------------|----|------------------|-------|------|
| MAXCO ₂ | Entre grupos | 1971.790 | 3 | 657.263 | 1.479 | .347 |
| | Dentro de grupos | 1777.567 | 4 | 444.392 | | |
| | Total | 3749.356 | 7 | | | |
| FASE LAG | Entre grupos | 113.201 | 3 | 37.734 | 7.709 | .039 |
| | Dentro de grupos | 19.580 | 4 | 4.895 | | |
| | Total | 132.780 | 7 | | | |
| MU | Entre grupos | .004 | 3 | .001 | .108 | .951 |
| | Dentro de grupos | .051 | 4 | .013 | | |
| | Total | .055 | 7 | | | |

Conclusión: No existe diferencia significativa entre los valores Máxima producción de CO₂ y tasas específica de crecimiento al variar el valor de pH inicial del medio.

Conclusión: Existe diferencia significativa entre los valores de la tasa específica de crecimiento al varias el valor de pH inicial del medio

5.- Efecto del pH inicial en la actividad enzimática de las cepas termófilas T110 y T5S.

ANOVA

ACTIVIDAD

| | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|------------------|-------------------|----|------------------|------|------|
| Entre grupos | 98.454 | 3 | 32.818 | .914 | .510 |
| Dentro de grupos | 143.703 | 4 | 35.926 | | |
| Total | 242.157 | 7 | | | |

Conclusión: No existe diferencia significativa entre los valores de actividad enzimática obtenidos al modificar el pH inicial del medio.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00150

Matrícula: 210180309

PRODUCCION DE LIPASAS POR EL HONGO TERMOFILO *Thermomyces lanuginosus* EN FERMENTACION EN MEDIO SOLIDO

En México, D.F., se presentaron a las 10:00 horas del día 14 del mes de abril del año 2015 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DR. SERGIO HUERTA OCHOA
- DRA. BLANCA ELIZABETH HERNANDEZ RODRIGUEZ
- DRA. MARIA DE LOS DOLORES REYES DUARTE
- DRA. MARIA DEL CARMEN FAJARDO ORTIZ

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN BIOTECNOLOGIA

DE: NAYELI AVILA CISNEROS

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



Nayeli AC

NAYELI AVILA CISNEROS
ALUMNA

REVISÓ

[Signature]
LIC. JULIO CÉSAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

[Signature]
DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA

PRESIDENTE

[Signature]
DR. SERGIO HUERTA OCHOA

VOCAL

[Signature]
DRA. BLANCA ELIZABETH HERNANDEZ
RODRIGUEZ

VOCAL

[Signature]
DRA. MARIA DE LOS DOLORES REYES
DUARTE

SECRETARIA

[Signature]
DRA. MARIA DEL CARMEN FAJARDO ORTIZ