

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



**Casa abierta al tiempo**

**Optimización de la producción de lipasas de *Rhizopus homothallicus* por fermentación en medio sólido**

**T E S I S**

para obtener el grado de Maestra en Biotecnología

**P R E S E N T A**

Daniela Nava Estrada

Ernesto Favela Torres  
Héctor Bernardo Escalona Buendía  
Jorge Alberto Rodríguez González

Director  
Asesor  
Asesor

Fecha (Septiembre 2011)

México D.F. a 05 de septiembre del 2011.

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

**Optimización de la producción de lipasas de *Rhizopus homothallicus* por  
fermentación en medio sólido**

Que presentó:

Daniela Nava Estrada

**Comité Tutorial**

- Director:** Dr. Ernesto Favela Torres.  
Universidad Autónoma Metropolitana
- Asesor:** Dr. Héctor Bernardo Escalona Buendía.  
Universidad Autónoma Metropolitana
- Asesor:** Dr. Jorge Alberto Rodríguez González.  
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño  
del Estado de Jalisco A. C.

**Jurado**

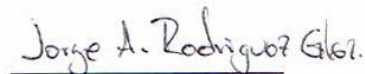
**Presidente:** Dr. Octavio Loera Corral.



**Secretario:** Dr. Héctor Bernardo Escalona Buendía.



**Vocal:** Dr. Jorge Alberto Rodríguez González.



**Vocal:** Dr. Alejandro Téllez Jurado.



## RESUMEN

Las lipasas son enzimas ampliamente utilizadas en procesos biotecnológicos; especialmente en industrias alimenticias, farmacéuticas, cosméticas, detergentes, entre otras. Estas son producidas principalmente por bacterias, levaduras y hongos, ya sea por fermentación en medio sólido o en medio líquido. Dentro de los hongos, el género *Rhizopus* produce estas enzimas con alto interés industrial.

En este trabajo se optimizó la producción de lipasas con *Rhizopus homothallicus* por fermentación en medio sólido. En una primera etapa, se evaluó la edad del inóculo, decidiendo utilizar inóculo con 7 días de cultivo. Posteriormente, a partir de 2 medios basales; se seleccionó el medio de cultivo con mayor actividad lipolítica (15.52 U/g ssf) en 20 h de fermentación, lo que permitió definir las condiciones de extracción de la enzima a partir de agua, buffer Tris-HCl y los detergentes NLS y tritón X-100. El uso de estos 2 últimos a una concentración de 0.16% (p/v) permitió un incremento en la actividad enzimática de tan solo 10% comparado con el buffer; por lo se decidió usar el buffer Tris-HCl manteniendo una relación 1:100 (p/v) y en otros casos 9:100 (p/v) como agente de extracción.

Para la etapa de optimización, se realizó la metodología de superficie de respuesta iniciando con una etapa de cribado a partir de 15 factores de interés relacionados con la composición del medio y condiciones ambientales. Los medios de los diseños experimentales fueron preparados a partir de soluciones concentradas de las diferentes sales, se ajustó el pH con HCl al 10% y se agregó el inóculo a una concentración  $3 \cdot 10^7$  o  $1 \cdot 10^7$  esporas/g si, se aforó a 25 mL, se agregó el aceite de oliva y se emulsificó con un vórtex durante 45 seg. Estadísticamente, los factores fueron analizados en 2 niveles (alta y bajo) y un punto central, la variable respuesta fue la actividad enzimática. Los resultados fueron analizados en el programa Statgraphics ® Plus versión 4.0 (1999). Los factores más importantes sobre la producción de lipasas fueron la concentración de oligoelementos y EDTA, aumentando la actividad cerca del 90%. El medio optimizado tiene la siguiente composición (g/L): urea, 6; lactosa, 7; aceite de oliva, 40;  $K_2HPO_4$ , 5;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 1.5; EDTA, 0.022; PVA, 1.6 y oligoelementos, 9.7 mL. Bajo estas condiciones se

obtuvo un incremento de aproximadamente 0.9 y 1.27 veces la producción y productividad de lipasa, respectivamente.

## **ABSTRACT**

Lipases are enzymes widely used in biotechnological processes, especially in the food industry, pharmaceutical, cosmetics, detergents, among others. Bacteria, fungi and yeast mainly produce these by solid and submerged fermentation. In fungi, *Rhizopus* genus produces these enzymes with a high industrial interest.

In this work we optimized the lipase production by solid state fermentation with *Rhizopus homothallicus*. In a first step, we assessed the inoculum age; we decided to use 7 days of culture. Subsequently, one basal media yielding 15.52 U/gdm was selected to carry out the optimization studies. Enzyme extraction studies with water, Tris-HCl buffer and 2 detergents (NLS and Triton) revealed that detergent extraction allows increasing activity in 10% as compared with the activity obtained with buffer. For that, Tris-HCl buffer was used for enzyme extraction.

For the optimization phase, we performed the response surface methodology starting with a screening stage from 15 factors of interest related to the medium composition and environmental conditions. For experimental designs media were prepared from concentrated solutions of different salts, the pH was adjusted with 10% HCl and added the inoculum at a concentration  $3 \cdot 10^7$  or  $1 \cdot 10^7$  spores/gis. The factors were statistically analyzed at 2 levels (low and high) and a central point. The response variable was the enzyme activity. Results were analyzed with the Statgraphics® Plus version 4.0 (1999) which showed that the most important factors on the production of lipases were the concentration of trace elements and EDTA. The enzymatic activity was increased nearly 90% through using the following medium (g/L): urea, 6, lactose, 7, olive oil, 40;  $K_2HPO_4$ , 5;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 1.5; EDTA, 0.022; PVA, 1.6 and trace elements, 9.7 mL. Under these conditions there was an increase of about 0.9 and 1.27 times the production and productivity of lipase, respectively.

## **AGRADECIMIENTOS**

Esta tesis representa un esfuerzo que incluye la participación de varias personas leyendo, comentando, corrigiendo, teniéndome paciencia, dando ánimo, acompañándome en cada momento bueno o malo.

Muchas gracias al Dr. Ernesto Favela Torres, mi director de tesis, por su conocimiento compartido, por la confianza puesta en mí y por su paciencia. Al Dr. Héctor Bernardo Escalona Buendía y al Dr. Jorge Alberto Rodríguez González, mis asesores, por sus comentarios y consejos acertados durante el desarrollo de este trabajo y por sus atinadas correcciones en la elaboración de esta tesis.

Gracias también a todas las personas que conforman la Planta Piloto 4, por cada una de sus aportaciones y comentarios sobre este trabajo, así como por su amistad y compañerismo durante este tiempo.

A mis papás y hermanos por su apoyo incondicional y por siempre demostrarme a través de su ejemplo que con esfuerzo y entrega se pueden cumplir nuestros sueños. A mi familia, en especial a Mamá Trini y Mamá Licha que siempre estuvieron durante este proceso preocupándose por mí.

A mis amigos, por su apoyo en las noches de trabajo pero sobre todo por aquellos momentos inolvidables que siempre llevaré en mi corazón.

A aquella personita que estuvo a mi lado durante todo este tiempo, motivándome y aconsejándome; gracias por estar en mi vida.

Gracias a mi Papá Periquito por ser un ángel guiador en mi vida y sobre todo, gracias a Diosito por permitirme cumplir una meta más y darme la oportunidad de compartirla al lado de todos mis seres queridos.

# ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.	1
2. REVISION BIBLIOGRÁFICA.	3
2.1. Generalidades de las lipasas.	3
2.1.1. Reacciones catalizadas por lipasas de importancia industrial biotecnológica.	6
2.1.2. Aplicaciones biotecnológicas de las lipasas.	7
2.1.3. Producción de lipasas.	8
2.2. Fermentación en medio sólido.	11
2.3. Nutrición microbiana.	14
2.3.1. Requerimientos nutricionales.	15
2.3.2. Disponibilidad de los componentes.	16
2.4. Optimización del medio de cultivo.	18
2.4.1. Diseños de Metodología de Superficie de Respuesta (MSR).	19
3. ANTECEDENTES.	23
4. HIPÓTESIS.	26
5. OBJETIVO GENERAL.	27
6. OBJETIVOS PARTICULARES.	27
7. MATERIALES Y MÉTODOS.	28
7.1. Microorganismo.	28
7.2. Medio de propagación para <i>Rhizopus homothallicus</i> .	28
7.3. Soporte inerte.	28
7.4. Preparación del medio de cultivo.	29
7.6. Fermentación.	30
7.7. Determinaciones analíticas.	30
7.8. Cinética de esporulación.	31
7.9. Selección del agente de extracción.	32
7.10. Diseños experimentales.	32
7.10.1. Diseño experimental $2^{15-11}$ y $2^{15-10}$ con punto central.	33
7.10.2. Diseño experimental $(2^{5-1})$ resolución V.	35
7.10.3. Diseño experimental $(2^4)$ .	36
7.10.4. Diseño de segundo orden: Box Behnken.	37

7.10.5.	Diseño de composición central rotatable más estrella.	38
7.11.	Cinética de producción de lipasas con el medio mejorado por MSR.	39
8.	RESULTADOS.	40
8.1.	Cinética de esporulación.	41
8.2.	Efecto de la concentración del medio de cultivo.	41
8.3.	Determinación del tiempo de cultivo para la fermentación.	43
8.4.	Selección del agente de extracción.	43
8.5.	Resultados de los diseños experimentales.	44
8.5.1.	Diseño factorial $2^{15-11}$ (Resolución III) y $2^{15-10}$ (Resolución IV).	44
	Diseño factorial $2^{15-11}$ (Resolución III).	44
	Resultados del diseño factorial $2^{15-10}$ (Resolución IV).	46
8.5.2.	Diseño factorial $2^{5-1}$ .	48
8.5.3.	Diseño factorial $2^4$ .	51
8.5.4.	Diseño de segundo orden: Box Behnken.	53
8.5.5.	Diseño de composición central rotatable + estrella.	57
8.6.	Comparación de la actividad enzimática obtenida en el medio Rodríguez y col., 2006 y medio mejorado por MSR en este trabajo.	60
10.	CONCLUSIONES.	68
10.1.	Conclusiones particulares.	68
10.2.	Recomendaciones y/o perspectivas.	69
11.	BIBLIOGRAFÍA.	70
12.	ANEXOS.	77

## ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Estructura de la lipasa Lip1 de <i>Candida rugosa</i> .....	3
Figura 2. Fenómeno de activación interfacial.....	4
Figura 3. Reacción de hidrólisis de acilglicéridos de lipasas.....	5
Figura 4. Transesterificación del tipo alcoholólisis.....	7
Figura 5. Transesterificación del tipo glicerólisis.....	7
Figura 6. Reacción de interesterificación.....	7
Figura 7. Método de extracción.....	30

## ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Condiciones óptimas para microorganismos productores de lipasas.....	9
Tabla 2. Factores y niveles analizados en el diseño factorial $2^{15-11}$ y $2^{15-10}$ .....	34
Tabla 3. Factores y niveles analizados en el diseño $2^{5-1}$ .....	35
Tabla 4. Factores y niveles analizados en el diseño factorial $2^4$ .....	36
Tabla 5. Factores analizados en el diseño de segundo orden tipo Box Behnken. ....	37
Tabla 6. Factores y niveles analizados del diseño de segundo orden de composición más estrella.....	38
Tabla 7. Concentración de los nutrientes del Medio Rodríguez y medio mejorado por MSR.....	39
Tabla 8. Resultado de las concentraciones y factores analizados en los diseños experimentales.....	65



## ÍNDICE DE GRÁFICAS.

Gráfica 1. Cinética de esporulación de <i>Rhizopus homothallicus</i> 13a.....	41
Gráfica 2. Cinética de producción de lipasa por <i>R. homothallicus</i> con medios concentrados.....	42
Gráfica 3. Cinética de producción de lipasa con el medio Rodríguez por FMS.....	43
Gráfica 4. Extracción de la actividad enzimática con diferentes agentes. ....	44
Gráfica 5. Diagrama de Pareto del diseño factorial $2^{15-10}$ (Resolución III). ....	45
Gráfica 6. Efecto de los factores principales sobre la actividad enzimática del diseño factorial $2^{15-11}$ (Resolución III).....	45
Gráfica 7. Actividad enzimática obtenida en los tratamientos del diseño factorial $2^{15-10}$ . .....	46
Gráfica 8. Diagrama de Pareto del diseño factorial $2^{15-10}$ (Resolución IV). ....	47
Gráfica 9. Efecto de los factores principales sobre la actividad enzimática del diseño factorial $2^{15-10}$ (Resolución IV). ....	47
Gráfica 10. Actividad enzimática del diseño $2^{5-1}$ . ....	48
Gráfica 11. Diagrama de Pareto del diseño $2^{5-1}$ (Resolución V). ....	49
Gráfica 12. Efecto de los factores principales sobre la actividad enzimática del diseño factorial $2^{5-1}$ (Resolución V). ....	50
Gráfica 13. Actividad enzimática del diseño $2^4$ .....	51
Gráfica 14. Diagrama de Pareto del diseño factorial $2^4$ (Resolución V). ....	52
Gráfica 15. Efecto de los factores principales sobre la actividad enzimática del diseño factorial $2^4$ (Resolución V). ....	53
Gráfica 16. Efecto de las interacciones de los factores principales sobre la actividad enzimática del diseño factorial $2^4$ (Resolución V). ....	53
Gráfica 17. Actividad enzimática del diseño de segundo orden Box Behnken.....	54

Gráfica 18. Diagrama de Pareto del diseño de segundo orden tipo Box Behnken....	55
Gráfica 19. Efecto de los factores principales del diseño de segundo orden tipo Box Behnken. ....	56
Gráfica 20. Superficie de respuesta de los factores humedad, EDTA y oligoelementos. ....	57
Gráfica 21. Actividad enzimática de los tratamientos del diseño de composición central + estrella. ....	58
Gráfica 22. Diagrama de Pareto del diseño de segundo orden de composición central + estrella. ....	58
Gráfica 23. Efecto de los factores principales sobre la actividad enzimática del diseño de segundo orden de composición central + estrella. ....	59
Gráfica 24. Superficie de respuesta de los factores EDTA y oligoelementos. ....	60
Gráfica 25. Cinética de comparación del medio de Rodríguez y col., (2006) y el medio mejorado por MSR. ....	61

## 1. INTRODUCCIÓN.

Las lipasas son triacilglicerol éster hidrolasas que hidrolizan los enlaces ésteres de triglicéridos formando como producto ácidos grasos libres o diglicéridos, monoglicéridos y en algunos casos glicerol. La mayoría de estas enzimas poseen un centro activo oculto bajo un fragmento polipeptídico (tapa), que sufre un cambio conformacional al entrar en contacto con una interfase lipídica, dejando accesible su centro activo que se encuentra dentro una cavidad de carácter hidrofóbico, que posee gran afinidad por el sustrato lipídico. Por lo cual, se pueden encontrar en dos conformaciones: Conformación cerrada o inactiva (medio acuoso) y conformación abierta (interfase o medio orgánico) debido a que los sustratos propios de las lipasas son ésteres insolubles; estas también poseen una característica que las hace importantes en procesos biotecnológicos ya que la presencia de solventes orgánicos también pueden catalizar reacciones de síntesis o de intercambio de grupos (transesterificación e interesterificación) logrando una alta especificidad de sustrato y de forma regio o enantioespecífica.

Las lipasas son enzimas ubicuas que pueden ser encontradas en animales, plantas y microorganismos, siendo el páncreas de mamíferos; la primera fuente de obtención de estas enzimas. Actualmente, éstas son producidas por vía fermentativa (medio solido y en medio líquido) por una amplia variedad de microorganismos, entre ellos bacterias como *Pseudomonas*, levaduras como *Candida* y hongos como *Rhizomucor*, *Penicillium*, *Rhizopus* y *Geotrichum*; siendo la fermentación en medio sólido la que ha despertado gran interés, debido a que comparada con la fermentación en medio líquido, esta presenta mayor productividad, menos capital invertido, además de fácil recuperación de enzimas extracelulares. Para tener una buena producción enzimática, es importante tomar en cuenta que las enzimas pueden ser inestables en condiciones diferentes a su ambiente fisiológico, es decir, que estas enzimas pueden presentar una alta dependencia a factores ambientales como humedad, temperatura, pH, aireación y

a factores nutricionales en el medio como la fuente de carbono, nitrógeno y oligoelementos, entre otros.

Recientemente, se ha dado mucha importancia a procesos que conduzcan a la optimización de las condiciones que inciden directamente sobre la producción de enzimas; ya sea mediante la modificación de factores ambientales, requerimientos nutricionales, o a través del uso de nuevas cepas o modificaciones genéticas en microorganismos productores de dichas enzimas.

Rodríguez y col. (2006) evaluaron el efecto de diversos nutrientes sobre la producción de lipasas por fermentación en medio sólido con la cepa 13a de *Rhizopus homothallicus* utilizando bagazo de caña como soporte; estos estudios se realizaron probando uno a uno diferentes fuentes de carbono, nitrógeno e inductores de la síntesis de lipasas. En este proyecto, se tomó como base este medio para optimizar la producción de lipasas por fermentación en medio sólido utilizando la misma cepa; para ello se usó una metodología de superficie de respuesta. Este tipo de métodos se utiliza cuando el nivel de mejora en la variable respuesta no es suficiente; además, nos permite encontrar las condiciones de operación óptimas de un proceso a través de la evaluación del efecto de varias variables y sus interacciones mediante un número limitado de experimentos; lo que nos permitirá conocer las concentraciones óptimas de los nutrientes en el medio de cultivo, para obtener una mayor productividad y actividad lipasa comparada con la reportada en la bibliografía.

Este documento contiene inicialmente una introducción general, donde se describen los nutrientes necesarios para la nutrición microbiana y producción de lipasas, así como las reacciones y características más importantes de estas enzimas; además de mencionarse las ventajas de producirlas por fermentación en medio sólido. También se describe brevemente el proceso de optimización mediante la metodología de superficie de respuesta a través de la cual se podrán determinar las concentraciones óptimas de los nutrientes para la producción de estas enzimas; posteriormente se muestran los resultados obtenidos, las discusiones comparando los resultados con la bibliografía, terminando con conclusiones de cada etapa y perspectivas.

## 2. REVISION BIBLIOGRÁFICA.

### 2.1. Generalidades de las lipasas.

Las lipasas (triacilglicerol éster hidrolasas E.C.3.1.1.3) pertenecen al grupo de las enzimas hidrolasas (Brockerohoff y Jensen, 1974; Macre y Hammond, 1985).

La estructura de las lipasas pertenece a la de proteínas  $\alpha/\beta$  hidrolasas, que consiste en una estructura central formada por 8 láminas  $\beta$  interconectadas por hélices  $\alpha$ . Las lipasas poseen un centro activo formado por una tríada catalítica (Ser-His-Asp ó Glu) oculto generalmente bajo un fragmento polipeptídico o tapadera de estructura  $\alpha$ -helicoidal. Al entrar en contacto con una interfase lipídica, existen cambios conformacionales y en particular este fragmento se desplaza dejando accesible el centro activo que se encuentra dentro de una cavidad hidrofóbica que presenta gran afinidad por sustratos lipídicos, cuales debido a lo anterior, las lipasas se pueden encontrar en dos conformaciones: Conformación cerrada o inactiva (medio acuoso) y conformación abierta (en interfase o medio orgánico) (Figura 1).

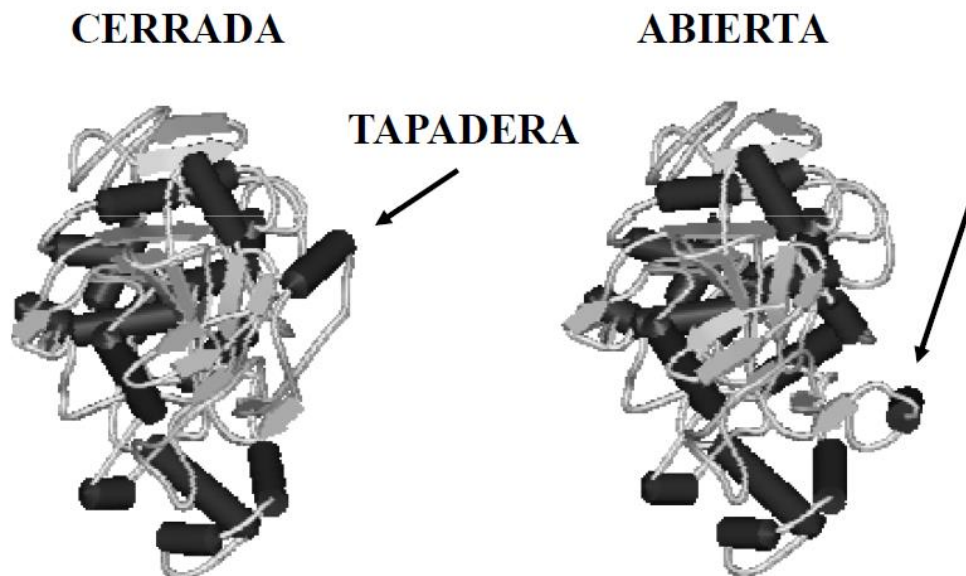


Figura 1. Estructura de la lipasa Lip1 de *Candida rugosa*.

Las lipasas actúan en interfase orgánica-acuosa, y su modelo cinético no se ajusta al modelo de Michaelis- Menten (Verger, 1997). Los sustratos propios de las lipasas son ésteres insolubles, necesitando la lipasa de una interfase orgánica-acuosa para su activación. Esta activación se produce mediante un fenómeno de adsorción inicial sobre la fase orgánica-acuosa, al que sigue la reacción propiamente dicha sobre la interfase, con la formación de complejo enzimático y posterior liberación de los productos a la fase acuosa con la posterior regeneración de la enzima (Jaeger y col., 1994). Debido a la baja solubilidad de sus sustratos, las lipasas interaccionan con la interfase de sus sustratos agregados. Se caracterizan porque cuando se adsorben a la interfase desarrollan una actividad muy superior a la que muestra en la fase acuosa, fenómeno llamado activación interfacial (Verger, 1997) (Figura 2).

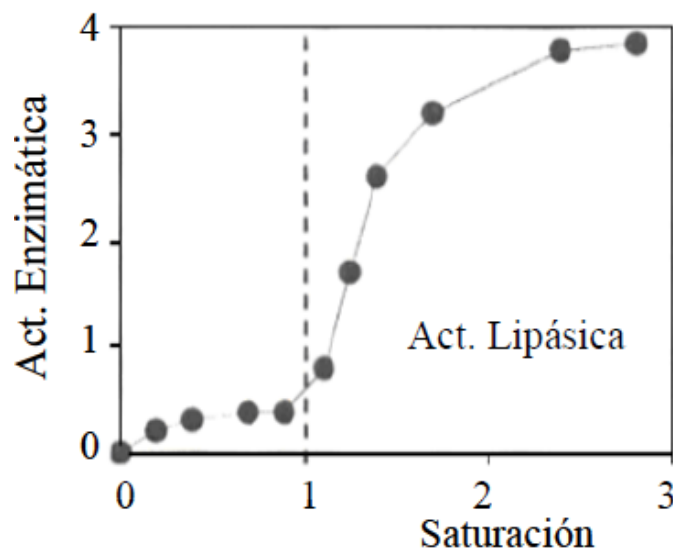


Figura 2. Fenómeno de activación interfacial.

Por otro lado, el mecanismo catalítico de las lipasas se basa en un sistema de intercambio de cargas que consta de 4 etapas. Tras la unión del sustrato, se produce el ataque nucleofílico por parte del grupo hidroxilo de la serina catalítica sobre el enlace éster del lípido, lo que lleva a la ruptura del enlace y a la formación de un intermediario entre el ácido graso y la serina nucleofílica. Seguidamente se libera el alcohol y se produce un segundo ataque nucleofílico por parte de una molécula de agua que ataca el enlace éster del intermediario transitorio, lo que

produce la liberación del ácido graso y la regeneración del centro catalítico (Bornscheuer, 2002).

La función principal de las lipasas es catalizar la hidrólisis de triglicéridos para obtener como productos finales ácidos grasos libres y glicerol o productos intermedios como mono o diglicéridos (Figura 3)

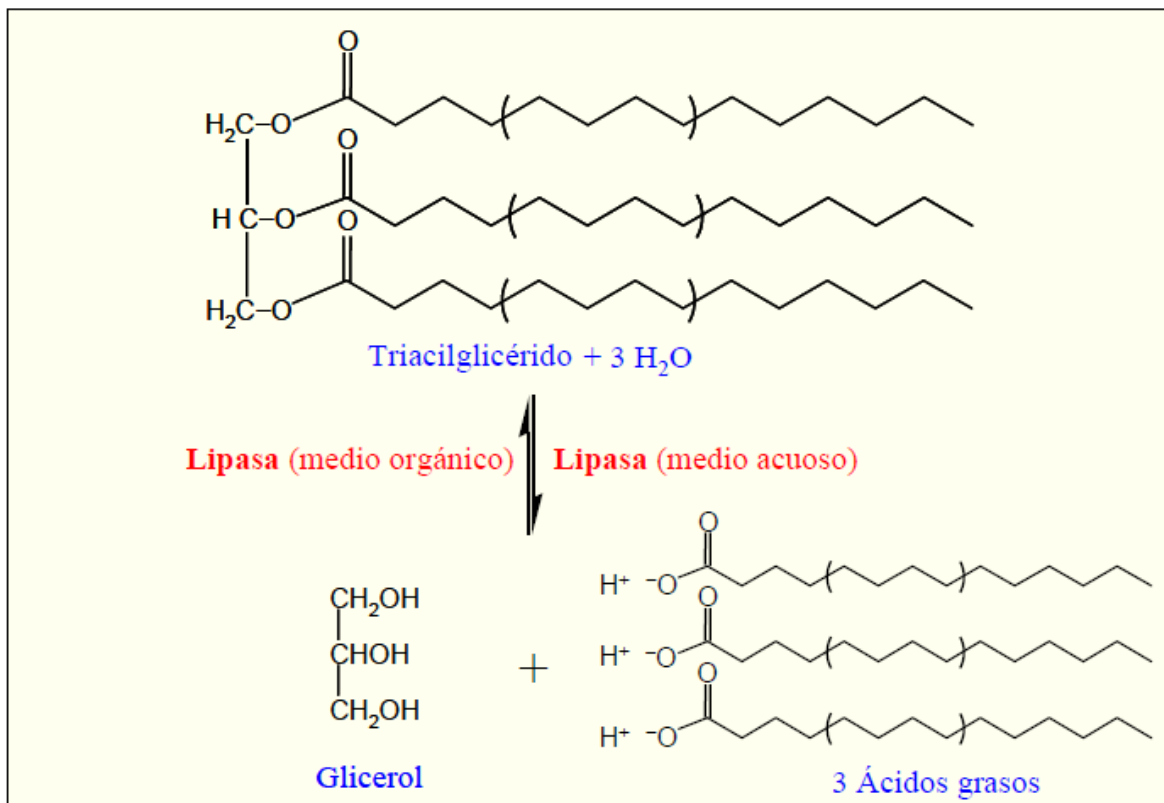


Figura 3. Reacción de hidrólisis de acilglicéridos de lipasas.

Una característica importante de estas enzimas es que en presencia de solventes orgánicos también pueden catalizar reacciones de síntesis o de intercambio de grupos (transesterificación e interesterificación) entre diferentes moléculas, como lípidos, glúcidos y aminoácidos, lográndolo con una elevada especificidad de sustrato, de forma regio o enantioespecífica, lo que aumenta su interés biotecnológico (Pandey y col., 1999; Gunstone, 1999; Bornscheuer, 2002).

Debido a que las lipasas son enzimas solubles en medio acuoso que actúan sobre sustratos hidrofóbicos, se han desarrollado varios métodos para determinar la actividad lipolítica y su inhibición como: ensayos en placas con triacilglicéridos, ensayos espectrofotométricos con sustratos naturales, derivados del *p*-nitrofenol o ésteres de resorufina, ensayos cromatográficos para la detección de moléculas como los ácidos grasos, el  $\beta$ -naftol o el *p*-nitrofenol liberados por las lipasas al hidrolizar los acilglicéridos o sus correspondientes análogos y métodos titrimétricos, basados en la neutralización de la acidez generada por los ácidos grasos libres (Beisson y col., 2000; Wahler y Reymond, 2001).

### **2.1.1. Reacciones catalizadas por lipasas de importancia industrial biotecnológica.**

Las lipasas han despertado un gran interés en procesos biotecnológicos debido a su alta especificidad sobre algunos enlaces químicos.

La hidrólisis de ésteres que realizan estas enzimas permite la resolución de compuestos quirales y obtención de ácidos grasos de alta pureza a partir de aceites y grasas. Además, las lipasas realizan otro tipo de reacciones no lipolíticas, que aumentan su utilización en reacciones diversas.

Estas enzimas poseen la capacidad de catalizar la reacción inversa, lo que permite la síntesis de ésteres, reacciones de transesterificación e interesterificación (Jaeger y col., 1994). En estos casos, el agua en el medio será un parámetro para desplazar el equilibrio hacia la síntesis de los productos de interés, siendo comúnmente los sistemas de eliminación continua del agua formada durante la reacción (Kwon y col., 1995).

En las Figuras 4 y 5 se muestra la reacción de transesterificación en la cual el acil donador es un éster y se dividen en dos tipos: glicerólisis y alcoholólisis, según sea el glicerol o un alcohol el acil receptor.



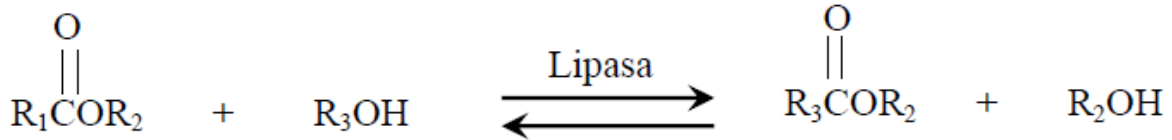


Figura 4. Transesterificación del tipo alcoholólisis.

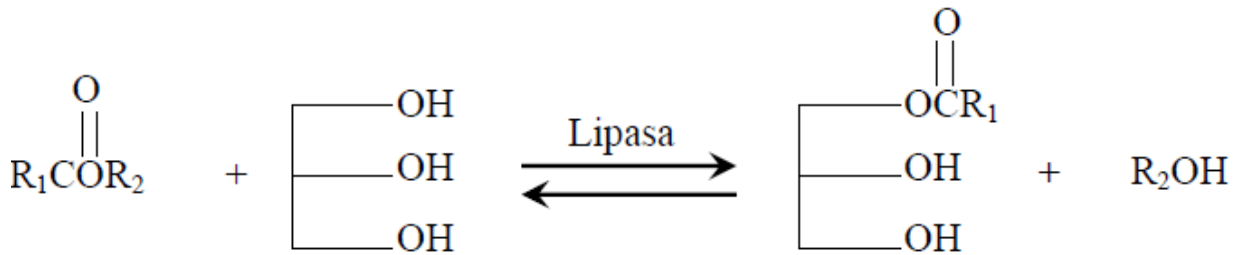


Figura 5. Transesterificación del tipo glicerólisis.

En cambio, la interesterificación es un proceso utilizado para cambiar la composición de ácidos grasos en un enlace éster, en el cual el grupo acil se intercambia entre un éster y un ácido graso (acidólisis) o entre dos ésteres (Figura 6).

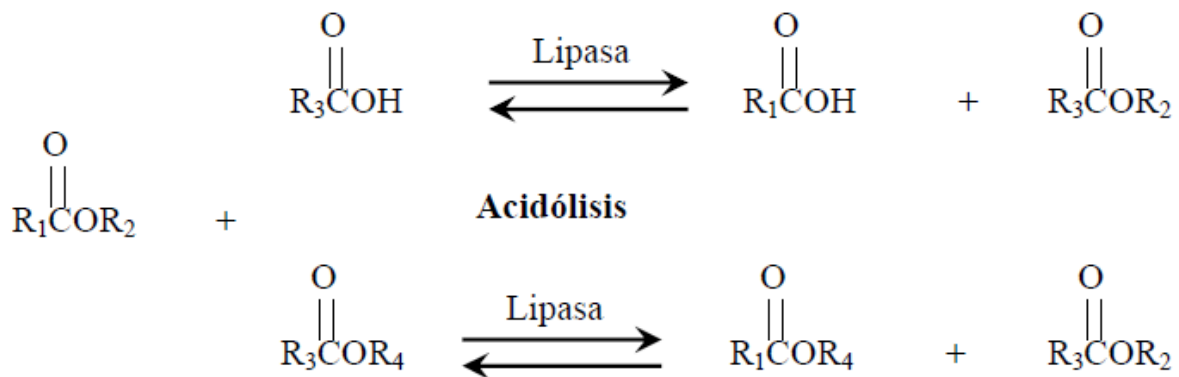


Figura 6. Reacción de interesterificación.

### 2.1.2. Aplicaciones biotecnológicas de las lipasas.

Las lipasas son utilizadas ampliamente en la industria como aditivos en detergentes, en la industria alimentaria, producción de aromas y maduración de quesos, en agroquímica, en la producción de insecticidas y otros pesticidas, y en

la industria farmacéutica, en la síntesis de drogas como naproxeno e ibuprofeno (Sharma y col., 2001; Pandey y col., 1999; Saxena y col., 1999).

Las aplicaciones biotecnológicas de estas enzimas están ligadas a los distintos tipos de reacciones que son capaces de llevar a cabo:

**a) Reacciones de hidrólisis**

- Ⓢ Hidrólisis de aceites vegetales en la industria oleoquímica.
- Ⓢ Producción de aromas y sabores para la industria alimentaria.
- Ⓢ Inclusión en detergentes para la eliminación de manchas de grasas.
- Ⓢ Aplicaciones analíticas para la determinación de la estructura de triglicéridos.
- Ⓢ Resolución de mezclas quirales.

**b) Reacciones de síntesis**

- Ⓢ Síntesis de triglicéridos.
- Ⓢ Síntesis de precursores de péptidos.
- Ⓢ Producción de esteroides para la industria farmacéutica.
- Ⓢ Resolución de mezclas recémicas de alcoholes en la industria farmacéutica.
- Ⓢ Síntesis de alcoholes terpénicos como saborizantes.

**c) Reacciones de interesterificación**

- Ⓢ Variación de la composición de ácidos grasos en mezclas de triglicéridos.
- Ⓢ Eliminación de ácidos grasos responsables de causar inestabilidad en el sabor de ciertos aceites y mantequillas.

**d) Reacciones de transesterificación**

- Ⓢ Preparación de compuestos enantioméricamente puros.
- Ⓢ Transesterificaciones enantioselectivas dobles.

**2.1.3. Producción de lipasas.**

Debido a sus diversas aplicaciones en la industria, es necesario producirlas mediante procesos que impliquen bajo costo y una fácil recuperación. Por lo cual, es importante mencionar que las primeras lipasas fueron obtenidas a partir del páncreas de mamíferos, generalmente cerdos, aunque también se obtenían de páncreas de humanos y de caballos. En la actualidad estas enzimas son

producidas por vía fermentativa por una amplia variedad de microorganismos, entre ellos, bacterias como *Pseudomonas* (Jaeger y col., 1994), levaduras como *Candida* y hongos como *Rhizomucor*, *Penicillium*, *Rhizopus* y *Geotrichum* (Rapp y Backhaus, 1992).

Una de las primeras fuentes microbianas fueron bacterias del género *Bacillus*, la cual, además de la producción de lipasas, produce otras enzimas de interés industrial como celulasas, amilasas, entre otras (Rivera y García, 2007). Recientemente, más de 30 lipasas fueron aisladas de cepas de *Rhizopus* y caracterizadas (Rivera y García, 2007). Las lipasas de *Rhizopus* están relacionadas con las lipasas de *Rhizomucor miehei* (existe una homología >55%), estas tienen una alta especificidad en la posición *sn*-1,3 de triglicéridos, las cuales las hacen muy versátiles en la modificación de lípidos.

Las enzimas termoestables pueden ser obtenidas de organismos mesofílicos y termofílicos; se han obtenido algunas enzimas termofílicas a partir de organismos psicrófilos (Imamura y Kitaura, 2000). Los principales organismos, de los cuales se han extraído enzimas de interés industrial son hipertermófilos *Pyrococcus furiosus* y *Thermotoga* sp. (Adams y col., 1995). Algunos organismos son productores de lipasas termoestables (Tabla 1).

**Tabla 1. Condiciones óptimas para microorganismos productores de lipasas.**

<b>Organismo</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>pH</b>
<i>Penicillium simplicissimum</i>	50	5
<i>Burkholderia cepacia</i>	45	7
<i>Candida antártica</i> (Lipasa A)	50-70	7

Fuente: Gutarra y col., (2009), Rathi y col., (2002), Pfeffer y col., (2006).

Asimismo, las lipasas son producidas por muchos microorganismos, siendo las fuentes tradicionales para la producción comercial: *Pseudomonas* sp., *Serratia* sp., *Rhizopus* sp., *Mucor* sp., *Aspergillus* sp., y *Candida*. Algunos de los microorganismos producen lipasas cuya especificidad varía con respecto a los ácidos grasos y a la posición en el triglicérido (López, 1999).

Entre los microorganismos reportados como mayores productores de enzimas lipasas termofílicas se encuentra el género de *Bacillus* sp., siendo la especie más destacada *B. thermocatenolatus*, los cuales producen dos lipasas extracelulares termoestables (Neerupmaa y Jagdeep, 2006).

*Candida rugosa* produce lipasas extracelularmente y es ampliamente utilizada para propósitos industriales. Una preparación comercial de esta levadura puede separarse en varias isoenzimas con diferentes contenido de carbohidratos, punto isoeléctrico, sustrato específico y secuencia primaria (Neerupmaa y Jagdeep, 2006).

En la actualidad, la producción de lipasas por fermentación en medio sólido ha despertado gran interés, ya que es un proceso que genera una mayor cantidad de lipasas a comparación de la fermentación en medio líquido (Christen y col., 1995). Rivera y col. (1991) compararon la producción de lipasas por *Penicillium candidum* en FMS y FML, observando menos capital invertido y fácil recuperación de enzimas extracelulares, por otro lado Adinarayana y col., (2003) obtuvieron 2 veces más producción de lipasas por FMS que por FML. También es importante mencionar que para lograr una buena producción de estas enzimas es importante tomar en cuenta que esta depende directamente de factores ambientales como pH o temperatura, composición del medio de fermentación: fuente de carbono, nitrógeno, concentración de sales inorgánicas y oxígeno disuelto, debido a que estos pueden alterar la estructura de la enzima y por lo tanto su actividad; en la mayor parte de los casos, las lipasas también necesitan la adición de un inductor, el cual generalmente es un lípido (aceites o grasas) (Sánchez, 1998).

Las condiciones más utilizadas para lograr una mejor producción de lipasas son: Temperatura alrededor de 30°C, pH en zona neutra y condiciones aerobias. Como fuente de carbono se suele utilizar una fuente mixta formada por un glúcido y un lípido, actuando este último como inductor para la producción de lipasas; como fuente de nitrógeno, comúnmente se utiliza urea o sales inorgánicas de amonio.

En el siguiente apartado se explicaran las características y ventajas más importantes de la fermentación en medio sólido en la producción de enzimas.

## **2.2. Fermentación en medio sólido.**

La fermentación en medio sólido (FMS) es un proceso microbiológico que ocurre comúnmente en la superficie de materiales sólidos que tienen la propiedad de absorber y contener agua con o sin nutrientes solubles (Viniegra y col., 2003). Este tipo de fermentación, se distingue de los cultivos sumergidos porque el crecimiento ocurre en materiales sólidos con bajo contenido de humedad (entre 30 y 80 %) (Laukevics y col., 1984).

Doelle y col. (1992) mencionaron ventajas y desventajas de la fermentación en medio sólido:

- Los medios de cultivo son baratos, generalmente subproductos agrícolas que presentan un alto contenido de los nutrientes necesarios.
- La baja actividad del agua es de gran ayuda para evitar las contaminaciones, especialmente de bacterias y levaduras.
- La concentración natural del sustrato permite utilizar reactores más pequeños en comparación con los utilizados en otro tipo de fermentación. Tienen mayor productividad volumétrica.
- La aireación forzada es facilitada por la porosidad del soporte, lo que permite una alta transferencia de oxígeno al microorganismo.
- Pueden emplearse conidios como inóculo en los procesos de crecimiento de hongos, lo cual disminuye los costos y las manipulaciones en la preparación del inóculo.
- Los conidios de los hongos que se producen son mucho más resistentes.
- El proceso de recuperación de productos es más fácil. Algunos productos son utilizados integralmente, como alimento animal, productos para el control biológico, etc.
- Los procesos se consideran generalmente como tecnologías limpias.

Las principales desventajas son:

- Su aplicación se limita a microorganismos que crecen en medios con bajo contenido de humedad.
- La remoción del calor metabólico puede ser un problema, sobre todo cuando se trabaja a gran escala y no se controla el proceso.
- La naturaleza sólida del sustrato trae problemas al medir los parámetros de la fermentación tales como el pH, temperatura, contenido de humedad y concentración de sustratos y productos.
- Los procesos de transferencia de masa son limitados por difusión.
- Muchos aspectos ingenieriles como el diseño de reactores y el escalado están poco caracterizados.
- El tiempo de fermentación es mayor debido a que generalmente se utilizan microorganismos que presentan bajas velocidades específicas de crecimiento.

En FMS, los factores ambientales como la humedad, actividad del agua, pH, temperatura, concentración y disponibilidad del sustrato, la aireación, el tamaño de partículas y la forma de inocular afectan significativamente el crecimiento y la formación de productos.

**Humedad y actividad del agua ( $a_w$ ):** El porcentaje de humedad en la fermentación sólida puede variar entre 30 y 80% (Oriol y col., 1988). Esto depende del sólido utilizado, el microorganismo y el tipo de proceso. Hoy se reconoce que no solo es la cantidad de agua presente en el sistema la que ejerce su influencia sobre la eficiencia del proceso, sino el carácter de las interacciones entre el agua y el medio sólido. Por eso no es contradictorio observar que un microorganismo se desarrolle plenamente en 2 sustratos diferentes con % de humedad bastante disímiles.

La actividad del agua se utiliza para caracterizar cuantitativamente las interacciones físicas y/o químicas del agua en el sistema y se define como la

humedad relativa de la atmósfera gaseosa en equilibrio con la del sustrato (Oriol y col., 1988).

La actividad del agua no sólo ejerce influencia sobre el crecimiento, sino también sobre la formación de productos y, en muchos casos, el valor mínimo requerido de  $a_w$  para la formación del producto difiere del necesario para el crecimiento (Troller, 1980; Gervais y col., 1988).

**pH:** En la FMS, el control de éste es prácticamente imposible ya que faltan instrumentos capaces de medir el pH en la capa de líquido que rodea el sólido (Mitchell y col., 2002). El pH puede cambiar por la producción de ácidos orgánicos como el ácido acético o el ácido láctico; otro factor que puede influir en el cambio de pH, es la fuente de nitrógeno (Domenech, 2000).

**Temperatura:** La temperatura es la variable más importante que se debe considerar debido a la alta concentración de sustrato por unidad de volumen y a la baja conductividad térmica del sistema heterogéneo sólido – líquido – gas, lo que favorece la acumulación del calor metabólico en el sistema y un aumento de la temperatura del cultivo.

**Concentración y disponibilidad del sustrato:** El medio de cultivo debe tener todos los nutrientes necesarios de forma balanceada para favorecer el crecimiento del microorganismo. La relación entre algunos de sus elementos es de particular importancia, por ejemplo, carbono-nitrógeno y fósforo-oxígeno, esta última de manera relevante en lo referido a la eficiencia de conversión energética y a la respiración (Cannel y Moo Young, 1980).

**Aireación:** En la mayoría de los procesos de fermentación en estado sólido participan microorganismos aerobios, y resulta la aireación un factor fundamental para el desarrollo del proceso. La aireación se utiliza para suministrar el oxígeno necesario, para extraer el  $CO_2$  formado, así como para remover el calor metabólico generado (Viniestra y col., 2003).

**Tamaño de partícula:** El tamaño de partícula influye en la transferencia de masa en el sistema de fermentación en estado sólido.

**Inóculo:** Las principales ventajas del uso de micelio como inóculo es que se logra una mejor competitividad del hongo, una reducción de la posible colonización del sustrato por microorganismos contaminantes y la colonización más rápida debido a que se reducen los tiempos de incubación (la fase de latencia o de adaptación principalmente). El uso de micelio está reportado por Moore y Prior (1993) y Jenkins y col. (1998), entre otros. Sin embargo, en diferentes trabajos se reporta el uso de suspensiones de esporas (Bosch y col., 1995, Dorta y col., 1996 y Booth y Shanks, 1998), la cual su ventaja más importante es la reducción de los costos en la etapa de propagación del microorganismo.

### **2.3. Nutrición microbiana.**

Anteriormente se mencionó que es necesaria una buena nutrición microbiana para poder alcanzar una mayor productividad y rendimiento de lipasas, a continuación se menciona la importancia de cada uno de los factores en el medio de cultivo; así como de las condiciones requeridas durante la fermentación en medio sólido.

En el estudio de los medios de cultivo es conveniente considerar en primer lugar el diseño para tratar la formulación y optimización de los mismos.

Es importante mencionar que la nutrición es el proceso donde los microorganismos consumen, del medio donde habitan, las sustancias químicas que necesitan para crecer, producir enzimas y generar productos de alto valor agregado. Todas las células están formadas por macromoléculas (polisacáridos, lípidos, ácidos nucleicos y proteínas), agua; y algunos microelementos tales como Na, Fe, Ca, K, etc. en proporciones muy pequeñas.

El diseño de un medio de fermentación tiene como finalidad la elección de los componentes necesarios para lograr el crecimiento y la formación de productos correspondientes al proceso a desarrollar. Con tal objeto se debe tener en cuenta todos aquellos aspectos relacionados con el microorganismo, el proceso y los sustratos a ser empleados como son los requerimientos nutricionales del microorganismo y algunos específicos del proceso, la disponibilidad real de los componentes y consideraciones sobre las materias primas. Otros aspectos que



son también importantes se refieren a todos los procesos y operaciones previos y posteriores a la etapa de fermentación, y al conocimiento de los mecanismos bioquímicos que regulan la formación de algunos productos (Pirt, 1975).

### **2.3.1. Requerimientos nutricionales.**

Los requerimientos nutricionales están determinados por el tipo de metabolismo celular, los nutrientes se pueden clasificar según las cantidades en que son requeridos como: micronutrientes o elementos traza y macronutrientes. En la naturaleza, estos elementos se encuentran combinados, formando parte de sustancias orgánicas o inorgánicas. Algunos de los nutrientes serán incorporados para construir macromoléculas y estructuras celulares; otros solo sirven para la producción de energía, y no se incorporan directamente como material celular.

Entre los macronutrientes se encuentra el carbono, nitrógeno, fósforo, azufre, potasio, magnesio, sodio, calcio y hierro y los micronutrientes se refieren a sales que contienen cromo, cobalto, cobre, manganeso, molibdeno, níquel, selenio, vanadio y zinc.

Estos nutrientes tienen importancia específica en la célula por ejemplo:

El **carbono** es el elemento más abundante en las macromoléculas ya que constituye el 50% del peso seco de las células.

El **fósforo** se usa para la síntesis de los ácidos nucleicos y los fosfolípidos, pero aparece también en coenzimas y en proteínas. Suele requerirse en forma de fosfatos, sea orgánico o inorgánico.

Los elementos **N** y **S** son requeridos por todos los seres vivos. Estos se encuentran en la célula en estado reducido:

- El radical  $-NH_2$  forma parte de los aminoácidos y de las bases nitrogenadas
- El radical  $-SH$  interviene en determinados aminoácidos y en coenzimas como la CoA.

#### **2.3.1.1. Sales minerales.**

Las sales minerales son fuente de aniones y cationes para la célula. Los siguientes cationes se necesitan en cantidades relativamente grandes:  $K^+$ ,  $Mg^{++}$ ,  $Ca^{++}$ ,  $Fe^{++}$ .

El **potasio (K)** interviene en la activación de una variedad de enzimas, incluyendo las que participan en la síntesis de proteínas.

El **magnesio (Mg)** estabiliza ribosomas, membranas y ácidos nucleicos; como cofactor en muchas reacciones, especialmente las que implican transferencia de grupos fosfato.

El **calcio (Ca)** es un cofactor de ciertas enzimas, como proteasas.

El **hierro (Fe)** participa en muchas moléculas implicadas en procesos de respiración, como citocromos y ferroproteínas no hémicas (proteínas con Fe-S); interviene como cofactor en ciertas enzimas. El hierro (principalmente como ion ferroso,  $Fe^{++}$ ) suele estar acomplejado en la naturaleza, formando sales insolubles.

#### **2.3.1.2. Micronutrientes o elementos traza.**

Los microorganismos necesitan minúsculas cantidades de otros elementos:

El **manganeso (Mn)** es un cofactor de ciertas enzimas, y a veces puede sustituir al  $Mg^{++}$ .

El **cobalto (Co)** se requiere casi exclusivamente para la vitamina B12.

El **zinc (Zn)** interviene en la estabilización de complejos enzimáticos como las ADN- y ARN-polimerasas.

El **molibdeno (Mo)** participa en las llamadas molibdoflavoproteínas, implicadas en la asimilación de nitratos. También participa como cofactor en el complejo nitrogenasa.

El **níquel** participa en hidrogenasas, enzimas que captan o liberan  $H_2$  (Universidad Nacional Federico Villareal, s.a.).

#### **2.3.2. Disponibilidad de los componentes.**

Aparte de la presencia de los nutrientes en el medio de cultivo, éstos deben estar disponibles para ser usados por la célula; para esto es importante conocer la disponibilidad correspondiente a iones metálicos cuya concentración es modificada por quelación, ya que muchos constituyentes del medio y productos del metabolismo actúan como agentes complejantes o precipitantes, como por ejemplo los aminoácidos, hidroxiácidos, hidróxidos, y los aniones  $PO_4^{-3}$  y  $CO_3^{-2}$ .

Estos son utilizados por lo regular para formar complejos con trazas de metales pesados que pudieran ser tóxicos para el microorganismo, por lo tanto, para controlar la concentración es necesario quelar el ion mediante algún agente quelante agregado, como el EDTA (Acido Etilendiaminotetraacético).

En medios complejos de uso industrial la situación es aún más complicada ya que existe una gran variedad de sustancias orgánicas, las cuales pueden quelar, secuestrar o absorber iones metálicos reduciendo la concentración iónica disponible como son los aminoácidos, proteínas, ácidos orgánicos, polifenoles, polifosfatos y materiales coloidales.

En general, se puede decir que todo material insoluble presente en el medio de cultivo va a tener una determinada capacidad de unión a elementos metálicos disminuyendo su concentración efectiva, como ocurre también con los aminoácidos y proteínas que tienen los grupos reactivos  $R-COO^-$ ,  $RHN^-$ ,  $RS^-$ ,  $RO^-$ , que son los más importantes. La dinámica de formación del complejo está determinada por la constante de equilibrio de formación del complejo metal-ligando, y por la velocidad a la cual el equilibrio es obtenido. La constante de equilibrio para la formación del complejo del ión metálico (M) con el ligando (L) se expresa de la siguiente forma:

$$K = \frac{[M L]}{[M] [L]} \quad \text{donde las cargas del catión y ligando están omitidas.}$$

El valor de K es prácticamente independiente de la naturaleza del ligando, ya que depende particularmente del ion metálico. Se puede hacer una lista de términos de valores decrecientes de la constante de equilibrio como sigue:  $Fe^{+3} > Pb^{+2} > Cu^{+2} > Ni^{+2} > Co^{+3} > Zn^{+2} > Co^{+2} > Cd^{+2} > Fe^{+2} > Mn^{+2} > Mg^{+2} > Ca^{+2} > Sr^{+2} > Ba^{+2} > Na^+ > K^+$  y de la cual se puede deducir, por ejemplo, que el ion  $Cu^{+2}$  estará fundamentalmente como complejo mientras que  $Ca^{+2}$ ,  $Na^+$  y  $K^+$  estarán en forma de iones metálicos libres.

Por otro lado la velocidad a la cual se alcanza el equilibrio tiene también una serie de orden decreciente de velocidades de acuerdo al ion:  $Sr^{+2} > Ca^{+2} > Zn^{+2} > Mn^{+2} > Fe^{+2} > Co^{+2} > Mg^{+2} > Ni^{+2}$ . De ambas consideraciones surge por ejemplo que cuando

se alcanza el equilibrio, el ion  $\text{Ca}^{+2}$  estará casi siempre libre para ser utilizado y si está complejado se hará rápidamente disponible, en cambio el  $\text{Mg}^{+2}$  estará generalmente libre pero si está complejado se hará disponible muy lentamente.

En la misma forma se puede deducir que el  $\text{Co}^{+2}$  estará fundamentalmente en forma complejada siendo disponible además a muy baja velocidad. Por esa razón ese elemento es potencialmente limitante.

Por lo anterior, es importante tener en cuenta la naturaleza de los compuestos orgánicos que tienen capacidad para actuar como ligandos, y sobre todo el ion metálico considerado, ya que la concentración libre de éste es lo que interesa.

#### **2.4. Optimización del medio de cultivo.**

Pueden ocurrir situaciones en las cuales sea imperativa la optimización de los medios de cultivo; entre ellas podemos mencionar las siguientes:

- ④ No existencia de información respecto a coeficientes de rendimiento de macro y micro elementos para el cultivo del microorganismo determinado.
- ④ Existencia de limitaciones nutricionales ocultas, especialmente de microelementos y factores de crecimiento.
- ④ Uso de medios de cultivo conteniendo elementos en exceso respecto de los requerimientos nutricionales del microorganismo en cuestión, que pueden causar inhibición del crecimiento.
- ④ Ensayo de sustancias estimulantes, activadoras e inhibidoras del crecimiento y formación del producto.
- ④ Empleo de fuentes nutricionales no convencionales (Ertola y col., s.a.).

La metodología más elemental consiste en realizar experimentos, en los cuales se varía la concentración del componente a estudiar, manteniéndose constante las concentraciones de los demás ingredientes. Si bien el procedimiento anterior es simple, es evidente que hace falta una gran cantidad de trabajo preliminar ya que el operador no conoce de antemano qué nutriente es el limitante del crecimiento. Cuando son varios los posibles nutrientes limitantes el método resulta poco práctico. Por otra parte puede ocurrir que la respuesta obtenida al variar la concentración de un componente dependa de los niveles de los otros, o sea, se

produzca interacción entre componentes, para lo cual se puede mejorar mucho la optimización a través de los diseños de metodología de superficie de respuesta, los cuales se explicaran a continuación, mediante una descripción dada por Gutiérrez y col. (2008).

#### **2.4.1. Diseños de Metodología de Superficie de Respuesta (MSR).**

Estos diseños experimentales se realizan cuando experimentalmente no se obtienen las respuestas buscadas o el nivel de mejoras logrado no es suficiente; por lo que es necesario experimentar de manera secuencial hasta encontrar el nivel de mejoras deseado. En este caso, después de una primera etapa experimental quizá sea necesario desplazar la región experimental en una dirección adecuada, o bien, explorar en forma más detallada la región experimental inicial. La forma de realizar ambas cosas son parte de la llamada MSR. La MSR representa una estrategia experimental y de análisis que permite resolver el problema de encontrar las condiciones de operación óptimas de un proceso, es decir, aquellas que den resultado “valores óptimos” de una o varias características de calidad del producto.

##### **2.4.1.1. Elementos de la MSR.**

La metodología de superficie de respuesta implica tres aspectos: diseño, modelo y técnica de optimización. El diseño y el modelo se piensan al mismo tiempo, y depende del tipo de comportamiento que se espera en la respuesta. El diseño implica que para optimizar un proceso se debe aplicar el diseño de experimentos, que sirven para ajustar un modelo de regresión lineal múltiple.

El concepto de modelo considera el análisis de regresión múltiple, junto con sus elementos básicos que son: parámetros del modelo, modelo ajustado, significancia del modelo, prueba de falta de ajuste, residuos, predichos, intervalos de confianza para predichos y coeficiente de determinación.

Por último, la optimización está formada por algunas técnicas matemáticas que sirven para que, dado un modelo ajustado, explorarlo a fin de obtener información sobre el punto óptimo.

En los diseños de MSR se distinguen tres etapas en la búsqueda del punto óptimo, que son:

**Cribado:** La optimización de un proceso se inicia con esta etapa cuando tiene muchos factores (más de 6 u 8) que influyen en la variable de interés.

**Búsqueda 1 o de primer orden:** Esta etapa se aplica cuando se tienen pocos factores, y se sabe que estos influyen sobre la variable respuesta. En esta etapa se corre un diseño de primer orden que permita caracterizar el tipo de superficie de respuesta y detectar la presencia de curvatura. Por lo general, se utiliza un diseño factorial completo o fraccionado con repeticiones al centro.

**Diseños factoriales completos  $2^k$ :** En este tipo de diseño se consideran  $k$  factores con 2 niveles cada uno, y tiene  $2^k$  tratamientos o puntos de diseño.

Cuando se emplea un diseño factorial  $2^k$  se supone que la respuesta es aproximadamente lineal en el rango de variación de cada uno de los factores estudiados. No es necesario, suponer una linealidad perfecta, pero sí que no haya una curvatura muy grande. De esta manera, dado que cada factor se prueba en 2 niveles, no es posible estudiar efectos de curvatura, aunque exista en el proceso; para estudiar tales efectos se necesitan al menos tres niveles en cada factor. Esto no implica que de entrada sea recomendable un diseño factorial con al menos tres niveles en cada factor, sino que en primera instancia se pueden agregar repeticiones (mínimo tres) al centro del diseño factorial  $2^k$ , y con ellas se podrá detectar la presencia de curvatura.

**Diseño factorial  $2^k$  con punto al centro:** Cuando se emplea un diseño factorial  $2^k$  donde los  $k$  factores admitan un nivel de prueba intermedio, es recomendable implementar un tratamiento adicional formado por la combinación del nivel intermedio o medio de todos los factores. Esta combinación se le conoce como punto central. Hay dos razones por las que es deseable correr el punto central con cierto número de replicas. La primera es obtener grados de libertad adicionales para el error en la tabla de ANOVA, sin perjudicar el balance en la estimación ni los efectos de interés. La segunda razón, dirigida a factores cuantitativos, es que las repeticiones al centro permiten detectar la posible presencia de curvatura en al menos uno de los factores objeto de estudio.

**Diseño factorial fraccionado  $2^{k-p}$**  : Estos diseños permiten sacrificar información poco importante en aras de un diseño manejable en cuanto al número de corridas experimentales para evitar el exceso de información que acumulan los diseños factoriales completos al estudiar muchos factores. Las corridas en los factoriales fraccionados son una parte o una fracción de los tratamientos de los factoriales completos. Mientras más grande es el valor de  $k$ , el diseño admite un grado de fraccionamiento mayor. La teoría de diseños fraccionados se basa en una jerarquización de los efectos, es decir, su importancia parte de los efectos principales, seguidos por interacciones dobles, triples, etc. Cuando se corre solo una fracción del diseño factorial completo ocurren dos hechos inevitables:

- ④ Se pierde información, ya que habrá efectos que no podrán estimarse y se tienen menos grados de libertad disponibles para el error.
- ④ Los efectos que sí se pueden estimar tienen al menos un alias. El que un efecto sea alias de otro significa que en realidad son el mismo efecto con nombres distintos, y al estimar a uno de ellos al mismo tiempo se estima el otro, de manera que no se pueden separar.

Como se mencionó anteriormente, al correr un diseño factorial fraccionado los efectos no pueden estimarse de manera aislada, sino que se estiman las sumas (o restas) de efectos alias. La interpretación de aliados que se suman se hace fácilmente si puede suponerse que todos los sumandos, excepto uno, no son importantes. Así, el efecto total se puede atribuir a este único efecto que se considera relevante. Entonces, la estrategia es elegir, siempre que sea posible, diseños fraccionados en los cuales los efectos potencialmente importantes sean alias de efectos que sea razonable suponer que son poco importantes. Esto se logra con diseños factoriales fraccionados que tengan alta resolución. La resolución es una característica de un factorial fraccionado, que indica qué tan bien pueden estudiarse los efectos potencialmente mediante tal diseño.

Las resoluciones de mayor interés son las que se describen a continuación:

- 1. Diseños de resolución III.** En estos diseños los efectos principales no son alias entre ellos, pero existen efectos principales que son alias de alguna interacción doble.
- 2. Diseños de resolución IV.** En este diseño los efectos principales no están alias entre ellos ni con las interacciones dobles, pero algunas interacciones dobles están alias con otra interacción doble.
- 3. Diseños de resolución V.** En estos diseños los efectos principales y las interacciones dobles están alias con interacciones triples o de mayor orden, es decir, los efectos principales e interacciones dobles están limpiamente estimados.

**Búsqueda II o de segundo orden:** En el momento en que se detecta la presencia de curvatura, o bien, que la superficie es más complicada que un hiperplano, se corre, o se completa un diseño de segundo orden que permita caracterizar mejor la superficie y modelar la curvatura. Con el modelo ajustado se determinan las condiciones óptimas de operación del proceso.

Los diseños de segundo orden más recomendados son el diseño de Box-Behnken y el diseño central compuesto o de composición central:

**Diseño Box-Behnken:** Este diseño se aplica cuando se tienen tres o más factores, y suelen ser eficientes en cuanto al número de corridas. Es un diseño rotatable o casi rotatable que se distingue porque no incluye como tratamientos a los vértices de la región experimental. En cualquier tratamiento del diseño, al menos uno de los factores se fija en la mitad del rango de prueba.

**Diseño de composición central:** Este es el más utilizado debido a su flexibilidad ya que se puede construir a partir de un diseño factorial completo  $2^k$  o factorial fraccionado  $2^{k-p}$  agregando puntos sobre los ejes y al centro además de otras propiedades deseables.



### 3. ANTECEDENTES.

En la literatura se reportan diversas estrategias para lograr la optimización de las condiciones ambientales y del medio de fermentación (fuentes de carbono, nitrógeno, sales inorgánicas, aireación, etc.) para la producción de lipasas utilizando diferentes estrategias. Las condiciones habitualmente utilizadas para la producción de lipasas fúngicas son temperatura alrededor de 35°C, pH en zonas neutras y condiciones aerobias. Se han estudiado los diferentes factores que afectan directamente sobre la producción de lipasas. Inicialmente, se ha determinado que las lipasas son generalmente inducidas por sustratos lipídicos y son producidas con una alta actividad específica en presencia de aceite como fuente de carbono (Ghosh y col., 1996; Shirazi y col., 1998; Rodríguez y col., 2006; Rajendran y Thangavelu, 2007; Dalmau y col., 2000; Gombert y col., 1999). Se han estudiado fuentes de carbono mixtas (Valero y col., 1991) notando un crecimiento óptimo en aceite de oliva y constatando el efecto inhibitorio de la glucosa sobre la producción de lipasas por *Candida rugosa* (Dalmau y col., 2000). Camargo de Morais y col. (2003) utilizaron como fuente de carbono trioleína, aceite de oliva, sésamo, coco y de maní; obteniendo la mayor actividad lipasa con trioleína por *Fusarium oxysporium*, en cambio Rajendran y Thangavelu (2007) obtuvieron mayor actividad lipasa con aceite de maní por *Candida rugosa*. Existen reportes en los cuales se combina un glúcido y un lípido como fuente de carbono Dalmau y col. (2000) demostraron que la combinación de diferentes tipos de fuente de carbono no mejora la producción de lipasas ni influye sobre la producción.

También la fuente de nitrógeno ha sido estudiada; existen reportes que indican que la fuente de nitrógeno (peptona, urea y sulfato de amonio) mejora los niveles de producción de lipasa (Rajendran y Thangavelu 2007; Rao y col., 1993; Lima y col., 2003). Corzo y Revah (1999) reportaron que con urea como fuente de nitrógeno en el medio, se alcanzó una mayor producción de lipasas por *Yarrowia lipolytica* a diferencia de cuando se utilizó una combinación de peptona y urea en el medio; además, la adición de sulfato de amonio no incrementó la actividad. Esto

coincidió con los resultados obtenidos por Rodríguez y col. (2006), quienes al utilizar urea como fuente de nitrógeno, reportaron una actividad de 594.8 U/g MSF con aceite de oliva como sustrato en la determinación de actividad enzimática y falta de actividad con sulfato de amonio; por el contrario, Lima y col. (2003) reportaron que el uso de sulfato de amonio logró el aumento de producción de lipasa por *Penicillium aurantiogriseum*. Por otro lado, Rajendran y Thangavelu (2007) alcanzaron la mayor actividad lipasa con *Candida rugosa* al utilizar peptona. Lo anterior indica que la mejor fuente de nitrógeno dependerá del microorganismo a emplear y que no se puede generalizar el uso de una sola fuente para todos los géneros de hongos.

Otro factor nutricional estudiado en el medio para la producción de lipasas, es la adición de oligoelementos; Rodríguez y col. (2006) estudiaron la adición de minerales en el medio y determinaron que la presencia de estos influían positivamente sobre la producción de lipasas, reportando una actividad de 760 U/g msf a diferencia de 598.6 U/g msf sin oligoelementos, es decir un aumento de 1.27 veces, utilizando aceite de oliva como sustrato en la determinación de actividad lipolítica.

Respecto a los factores ambientales, Vargas y col. (2008) y Adinarayana y col. (2003) evaluaron el efecto de la humedad y temperatura sobre la producción de lipasas por *Penicillium simplicissimum* y *Aspergillus* sp. respectivamente; y demostraron que estos 2 factores son significativos sobre la producción de lipasas debido a que una baja humedad dificulta la solubilidad de los nutrientes del sustrato en FMS y por lo tanto disminuye la disponibilidad para el microorganismo (Vargas y col., 2008). Por otro lado, respecto a la temperatura, se ha reportado una mayor actividad lipasa en cepas como *Candida rugosa*, *Penicillium aurantiogriseum* y *Rhizopus homothallicus* en un rango de temperatura de entre 27 y 40°C (Rao y col., 1993, Lima y col., 2003, Rodríguez y col., 2006).

Los procesos de optimización han sido muy utilizados para mejorar y aumentar la producción de lipasas, con base en todas las conclusiones reportadas acerca de los factores que afectan la producción de estas enzimas, Adinarayana y col., (2004) optimizaron el proceso de fermentación de *Aspergillus* sp. utilizando aceite

de oliva como inductor alcanzando una producción enzimática de 1798 U/g msf con aceite de oliva como sustrato en la determinación de actividad enzimática. Actualmente, para lograr la optimización de producción de lipasas, se utilizan diseños experimentales, principalmente los de metodología de superficie de respuesta (MSR) los cuales permiten encontrar las condiciones óptimas del proceso; Rajendran y Thangavelu (2007) utilizaron este tipo de diseños para optimizar la producción de lipasas por fermentación en medio líquido por *Candida rugosa*; Rao y col. (1992) también optimizaron la producción de lipasas por *Candida rugosa* pero por fermentación en medio sólido, y Abdel-Fattah (2002) optimizaron la producción de lipasas termoestables por *Geobacillus* sp. en fermentación en medio sólido utilizando un diseño de MSR tipo Box-Benhken. Debido al gran número de aplicaciones, las lipasas presentan gran interés dentro de la industria biotecnológica, es por esta razón, que en este trabajo se desea optimizar la producción de lipasa por *Rhizopus homothallicus* mediante un MSR empleando sistemas de FMS.

#### **4. HIPÓTESIS.**

La optimización de la producción de lipasas por la cepa 13a del genero *Rhizopus homothallicus* por fermentación en medio sólido a través del uso de la estrategia de metodología de superficie de respuesta (MSR) permitirá obtener una mayor productividad y actividad lipasa que la reportada en la bibliografía para la misma cepa.

## **5. OBJETIVO GENERAL.**

Optimizar la producción de lipasa por *Rhizopus homothallicus* por fermentación en medio sólido mediante el uso de una metodología de superficie de respuesta.

## **6. OBJETIVOS PARTICULARES.**

Los objetivos particulares fueron:

- 6.1.** Seleccionar la edad del inóculo.
- 6.2.** Seleccionar el tiempo de cultivo mediante una cinética de producción enzimática con el medio de Rodríguez y col., (2006).
- 6.3.** Obtener las condiciones de extracción y la concentración del medio inicial para la estrategia de MSR.
- 6.4.** Plantear los diseños experimentales necesarios, que permitan evaluar los factores significativos; así como las interacciones entre ellos, para optimizar el proceso de producción de lipasa por *Rhizopus homothallicus* en fermentación en medio sólido.
- 6.5.** Evaluar el efecto de los factores ambientales (pH, humedad y temperatura), así como de los factores nutricionales (fuente de carbono, nitrógeno y adición de micronutrientes en el medio de cultivo) sobre la producción de lipasas y establecer sus valores óptimos para aumentar la actividad lipolítica producida por *Rhizopus homothallicus* en fermentación en medio sólido.

## **7. MATERIALES Y MÉTODOS.**

### **7.1. Microorganismo.**

El hongo que se utilizó en este proyecto es *Rhizopus homothallicus* 13a, el cual pertenece a la Colección de hongos filamentosos de la Universidad de Guadalajara del Dr. Jesús Córdova López. La cepa se conservó en tubos inclinados con 10 mL de PDA, los cuales fueron inoculados e incubados 7 días a 30°C, posteriormente se sellaron y se mantuvieron en refrigeración a 4°C hasta su utilización.

### **7.2. Medio de propagación para *Rhizopus homothallicus*.**

A partir de un tubo inclinado con medio PDA previamente inoculado, se preparó una suspensión de esporas adicionando 10 mL de Tween 80 0.05%. Esta suspensión se usó para inocular (1 mL de suspensión por matraz) de 3 a 10 matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50mL de medio PDA. Los matraces inoculados fueron incubados durante 7 días a 30°C. El contenido de estos matraces fue utilizado como inóculo para los estudios de FMS.

### **7.3. Soporte inerte.**

Como soporte inerte se utilizó agrolita, el cual es un mineral volcánico que al ser calentado a temperaturas superiores a los 900°C se expande de cuatro a veinte veces su volumen original. Al expandirse cada partícula es estéril, posee un pH neutro y contiene infinidad de microburbujas selladas en su interior, retiene humedad y nutrientes que están a disposición del microorganismo, además de formar pasajes de aire que proveen excelente aireación y drenaje. Este tipo de soporte exhibe ventajas que no son obtenidas con sustratos naturales, además de que facilita las mediciones de sustancias de interés, se tiene un mejor control fisiológico y cinético en los cultivos sólidos (Zhu y col., 1994) y ofrece una flexibilidad adicional cuando se diseña el medio óptimo para la producción de metabolitos, enzimas y esporas, entre otros (Larroche, 1996).

**Preparación del soporte:** La agrolita se tamizó en mallas 6, 10, 16 y 20. Se colectó la fracción 16/20. La agrolita tamizada fue lavada 2 veces con agua destilada a temperatura ambiente y una con agua destilada caliente. La agrolita fue secada a 60°C (humedad menor a 1%) y almacenada en bolsas de plástico.

#### **7.4. Preparación del medio de cultivo.**

Para este trabajo se tomó como medio base el reportado por Rodríguez y col. (2006): El medio contiene (en g/Kg): urea 4g, lactosa 5, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1, alcohol polivinílico (PVA) 1.6, aceite de oliva 40 y oligoelementos 4mL/Kg.

En un matraz Erlenmeyer de 250 mL se colocan 100 g de agua Ciel ® y se añadieron y disolvieron uno a uno los componentes del medio, menos el aceite de oliva. Una vez mezclado el medio, se midió el pH (que sin ajustar debe estar entre 8 y 9) y se ajustó a 6.5 con unas gotas de HCl 6 M. Antes de inocular el medio de cultivo, se añadió el aceite de oliva y se mezcló en un homogenizador (Batidora Oster, Fuente de sodas de 2 velocidades, modelo 2523-13, 440-20) durante 3 min. Debido a la baja concentración de esporas en la suspensión utilizada para inocular, el medio de cultivo sólido se preparó 20% más concentrado y se utilizó agua Ciel ® para ajustar a la humedad inicial deseada.

#### **7.5. Preparación de inóculo.**

Las esporas producidas en los matraces de 250 mL (Sección 8.2) fueron el inóculo para los estudios en FMS. Para ello, a un matraz se adicionaron 25 mL de una solución de tween 80 al 0.05%. Se cosecharon las esporas vertiendo esta suspensión en 2 o 3 matraces con esporas. Para estimar la concentración de esporas en la suspensión se hizo una dilución 1:20 (50 µL en 950 µL) y se contaron las esporas en una cámara de Neubauer. El conteo se hizo de la manera siguiente:

1		2		3
8		9		4
7		6		5

Se contaron las esporas en 9 de 25 cuadros de la cámara de Neubauer. El conteo se hizo por triplicado.

Para calcular la concentración de esporas se realizó el siguiente cálculo:

Esporas/mL = promedio x 25 x 10<sup>4</sup> x Dilución

Una vez contadas las esporas, se calculó el volumen de inóculo necesario para el soporte inerte a una concentración de 3x10<sup>7</sup> o 1x10<sup>7</sup> esporas por cada gramo de soporte inerte.

### 7.6. Fermentación.

Para la producción de lipasas se utilizaron matraces de 125 mL se colocó en cada matraz 2.7 g de agrolita y 5 mL del medio de cultivo homogeneizado e inoculado, para obtener una humedad inicial del 65%. Se cubrieron los matraces con tela de polipropileno y se homogeneizaron golpeándolos lateralmente 5 veces en sentido a las manecillas del reloj. Posteriormente, se incubaron a 40°C por periodos de 16 a 24 h. Se preparó un matraz más, el cual sirvió para medir las condiciones iniciales de la fermentación (pH y humedad).

### 7.7. Determinaciones analíticas.

**Obtención del extracto enzimático:** Para cada tiempo de muestreo se sacrificó el contenido de un matraz. Se metió el matraz a 4°C durante al menos 20min. El agente de extracción utilizado fue buffer Tris-HCl 100 mM y 0.25% de PVA (pH 8). El extracto utilizado en la cinética para determinar la actividad enzimática en el diseño experimental 2<sup>15-10</sup> se obtuvo manteniendo una relación 1:100 biocatalizador/agente de extracción agitando con un vórtex durante 45 seg. En los experimentos posteriores se mantuvo una relación 1:10 biocatalizador/agente de extracción, se



Figura 7. Método de extracción.



homogeneizó con un agitador magnético durante 2 min, se centrifugó durante 10 min a 10,000 rpm, se realizó una dilución del extracto 9:100 para medir actividad lipasa (Figura 7). El sobrenadante (EE) fue separado en tubos Eppendorf e inmediatamente congelado hasta su uso.

La determinación de las variables de pH, humedad y actividad lipasa fue realizada de la siguiente manera:

**Determinación de pH:** El pH se midió pesando 0.5 g del biocatalizador (húmedo) y agregando 5 mL de agua Ciel® (se verificó que el agua no actúa como amortiguador Anexo 1). Se agitó con un vórtex durante 25 seg y se midió directamente con un potenciómetro (Conductronic pH 120) previamente calibrado.

**Determinación de humedad:** El contenido de humedad en la materia inoculada y en la materia fermentada a diferentes tiempos de incubación se determinó gravimétricamente con una termobalanza Ohaus (MB 45).

**Actividad lipasa:** La actividad fue ensayada por la técnica colorimétrica de *p*-nitrofenol con el lector de microplacas Elisa (ELx 808 BioTek®). El medio de reacción contuvo 50 µL del extracto enzimático y 100 µL de sustrato (9 mL buffer Tris-HCl 100 mM y 0.25% de PVA (pH 8) + 1 mL de sol. 10 mM de *p*-nitrofenil octanoato en 2-propanol). Se registró la liberación de *p*-nitrofenol por la enzima lipasa a 405 nm durante 10 min a 30 °C. Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima necesaria para liberar un 1 µmol de *p*-nitrofenol por minuto bajo las condiciones de ensayo. Para ello se calculó el coeficiente de extinción molar de la solución de *p*-nitrofenol ( $\epsilon = 10,708.64 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) Anexo 2 (Kordel y col., 1991).

### **7.8. Cinética de esporulación.**

Se prepararon 300 mL de agar papa dextrosa (39 g/L), se colocaron 50 mL en matraces Erlenmeyer de 250 mL y se esterilizaron a 121 °C durante 15 min. Los matraces se inocularon con 1 mL de suspensión de esporas y se incubaron a 30 °C durante 5, 7 y 9 días. Para el conteo de esporas se adicionaron 25mL de Tween 80 al 0.05%, se suspendieron las esporas con agitación mecánica. La

suspensión fue diluida (1:20) y las esporas contadas en cámara de Neubauer. La cinética de esporulación se realizó por duplicado.

### **7.9. Selección del agente de extracción.**

Los agentes de extracción utilizados en esta etapa fueron buffer Tris-HCl 100 mM y 0.25% de PVA (pH 8), agua, Tritón X-100, N- lauril sarcosina (NLS). Se produjo biocatalizador con 16 h de fermentación y se obtuvo el extracto utilizando agua, buffer, NLS y Tritón. La extracción con NLS y Tritón se realizó mediante una solución con una concentración del detergente de 0.5%, la cual se modificó a 0.16% en el ensayo de medición de actividad enzimática, ya que solo se requiere la tercera parte de extracto enzimático del volumen total de reacción. Posteriormente, para la extracción de la enzima se analizaron diferentes concentraciones de NLS en el volumen de reacción y se midió actividad lipasa para detectar la concentración que inducía un aumento de actividad lipasa.

### **7.10. Diseños experimentales.**

Se realizaron varios diseños experimentales para el proceso de optimización. A continuación se describe la preparación de los medios para los diseños experimentales:

Los medios de cultivo se prepararon tomando en cuenta la matriz sugerida por el programa Statgraphics Plus Versión 4.0 año 1999 para cada diseño. Se prepararon soluciones concentradas de cada uno de los nutrientes evaluados y se agregó el volumen requerido de las soluciones concentradas para obtener la concentración requerida de cada una de las sales ( $C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$ ) en el medio. Posteriormente, se agregaron 2 mL de agua y se ajustó el pH de cada medio con HCl al 10% y se vertieron a matraces aforados. En los diseños  $2^{15-10}$ ,  $2^4$  y Box Behnken se evaluó el efecto de la humedad, por lo cual se calculó un excedente de inóculo y se agregó el volumen adecuado de la suspensión de esporas al medio, posteriormente se aforó con agua Ciel® (inicio de la fermentación). Por otro lado, en tubos Corning® de 50 mL etiquetados, se pesó el aceite de oliva requerido y en estos tubos se agregaron los medios. Se emulsificó con ayuda de un vórtex durante 45 seg.

### **Fermentación en medio sólido.**

Se pesaron 2.7g de agrolita en matraces de 125 mL, se etiquetaron y se agregó la cantidad de medio necesario para ajustar la humedad del cultivo. Se homogenizó perfectamente el agrolita con el medio y se cubrieron los matraces con polipropileno, posteriormente se incubaron durante 20 h a la temperatura a 40°C; en el caso del diseño  $2^{15-10}$ ; los matraces se incubaron a 37.5, 40 y 42.5°C.

La obtención del extracto se realizó como se indica en la sección de Materiales y Métodos.

### **Proceso de cribado.**

En la parte de cribado se realizaron tres diseños experimentales con el objetivo de disminuir el número de factores significativos para iniciar el proceso de optimización de la producción de lipasas por fermentación en medio sólido.

#### **7.10.1. Diseño experimental $2^{15-11}$ y $2^{15-10}$ con punto central.**

El objetivo de este diseño fue evaluar todos los posibles factores que pudieran intervenir en la producción de lipasas por fermentación en medio sólido; tomando en cuenta tanto factores ambientales como nutricionales, de manera que se pudiera reducir el mayor número de factores significativos para los posteriores diseños de optimización. Las variables de estudio fueron pH, humedad, temperatura, tamaño de inóculo y de la concentración de urea, lactosa, aceite de oliva,  $K_2HPO_4$ ,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $MnCl_2$ ,  $CoCl_2 \cdot 7H_2O$ ,  $CuSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ , EDTA y PVA en el medio de cultivo inicial. La variable de respuesta fue la producción de actividad lipasa. Los factores fueron analizados en 2 niveles y un punto central: bajo (-1), alto (+1) y el punto central (0) y la variable respuesta fue la actividad enzimática. Los valores establecidos para los factores fueron los siguientes:

Tabla 2. Factores y niveles analizados en el diseño factorial  $2^{15-11}$  y  $2^{15-10}$ .

Factor	-1	0	1	Unidades
pH	5.5	6	6.5	
Humedad	55	60	65	%
Tamaño de inóculo	$1 \cdot 10^7$	$3 \cdot 10^7$	$5 \cdot 10^7$	Esporas/g si
Temperatura	37.5	40	42.5	°C
Aceite de oliva	20	40	60	g/Kg
Lactosa	1	3	5	g/L
Urea	1	2.5	4	g/L
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1	3	5	g/L
MgSO <sub>4</sub>	0.5	1	1.5	g/L
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0	0.00792	0.01584	g/L
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0	0.01124	0.02248	g/L
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0	0.001	0.002	g/L
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0	0.00116	0.00232	g/L
EDTA	0	0.02	0.04	g/L
PVA	0.4	1	1.6	g/L

Para esto, se requirieron 66 unidades experimentales (matraces Erlenmeyer de 125 mL) ya que los experimentos se realizaron por duplicado (se requirieron preparar 33 medios de cultivo diferentes).

Los 33 medios de cultivo se prepararon como se explicó anteriormente, la preparación de los medios se llevó a cabo en 2 etapas; primero se prepararon los medios de cultivo del diseño factorial saturado y posteriormente, los faltantes del diseño factorial doblado saturado (Anexo 3). Para agregar las sales de cada medio, se prepararon las siguientes soluciones concentradas:

**Solución 10X (g/L):** Lactosa 50, urea 40, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50, MgSO<sub>4</sub> 15 y PVA 16.

**Solución 100X (g/L):** MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 1.584, CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 1.902, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.2, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.232 g/L, EDTA 4.

### 7.10.2. Diseño experimental ( $2^{5-1}$ ) resolución V.

El objetivo de este diseño fue evaluar únicamente los factores significativos nutricionales como resultado de los diseños  $2^{15-11}$  y  $2^{15-10}$ . La concentración de urea, lactosa, aceite de oliva/PVA, oligoelementos y EDTA se evaluaron en un diseño experimental factorial  $2^{5-1}$  con 2 puntos centrales. Los factores fueron analizados en 2 niveles y dos puntos centrales, teniendo como variable respuesta a la actividad enzimática. Los valores establecidos para los factores fueron:

**Tabla 3. Factores y niveles analizados en el diseño  $2^{5-1}$ .**

Factor	-1	0	1
Aceite/PVA (g/L)	40/1.6	50/2	60/2.4
Lactosa (g/L)	7	11	15
Urea (g/L)	4	8	12
Oligoelementos (mL)	4	8	12
EDTA (g/L)	0.02	0.05	0.08

Se utilizaron 37 unidades experimentales (matraces Erlenmeyer de 125 mL) ya que se prepararon 18 medios de cultivo por duplicado tomando en cuenta la matriz para un diseño factorial ( $2^{5-1}$ ) con resolución V (Anexo 4). Para agregar las sales de cada medio, se prepararon las siguientes soluciones concentradas:

**Solución 10X (g/L):** Lactosa 150, urea 120,  $K_2HPO_4$  50,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  15.

**Solución 50X:** Solución de oligoelementos.

**Solución 100X:** EDTA 8 g/L.

Los medios y la fermentación se llevó a cabo como se mencionó en el apartado 7.11, agregando la solución de oligoelementos previamente diluida a una concentración 1x, además de fijar la concentración de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  y  $K_2HPO_4$  a 1.5 y 5 g/L respectivamente. La humedad del cultivo en este diseño fue de 65% y se incubaron 20 h a 40°C.

### 7.10.3. Diseño experimental (2<sup>4</sup>).

Este diseño se utilizó para evaluar los factores ambientales significativos, pH y humedad, que resultaron de los diseños 2<sup>15-11</sup> y 2<sup>15-10</sup>, así como los factores nutricionales, oligoelementos y EDTA que fueron significativos en el diseño 2<sup>5-1</sup>. El efecto sobre la actividad enzimática se evaluó analizando los siguientes factores y niveles:

Tabla 4. Factores y niveles analizados en el diseño factorial 2<sup>4</sup>.

Factor	-1	0	1
Humedad	60	65	70
pH	6	6.5	7
Oligoelementos (mL)	12	16	20
EDTA (g/L)	0.02	0.03	0.04

En este diseño, se utilizaron 38 unidades experimentales debido a que se prepararon 16 unidades experimentales y 3 puntos centrales por duplicado.

Los 16 medios de cultivo se prepararon como indica la matriz para un diseño factorial 2<sup>4</sup> con resolución V (Anexo 5). Para agregar las sales de cada medio, se prepararon las siguientes soluciones concentradas:

**Solución 10X (g/L):** Lactosa 70, urea 60, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 15.

**Solución 50X:** Solución de oligoelementos.

**Solución 100X:** EDTA 4g/L.

Para los cultivos que requerían 70% de humedad se prepararon 25 mL de medio y para los cultivos con 60 y 65% de humedad solo se prepararon 10 mL, siguiendo el procedimiento antes descrito, debido a los resultados del diseño anterior; se fijaron las concentraciones de los factores aceite/PVA a 40/1.6 g/L, urea a 6 g/L y de lactosa a 7 g/L y se agregaron en el medio; además de la concentración de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O y K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> que anteriormente ya se había fijado. Para la fermentación, se ajustó la humedad inicial del cultivo a 60, 65 y 70%, se agregaron 4.05, 5.01 y 6.3 mL de medio líquido respectivamente.

#### 7.10.4. Diseño de segundo orden: Box Behnken.

Posteriormente, se realizó un diseño Box Behnken para observar si existe curvatura en alguno de los factores dentro de los niveles analizados, es decir, si el efecto de los factores se explica mediante un modelo de 2º orden. Para esto, se analizaron como factores, concentración de oligoelementos, EDTA y la humedad en los siguientes niveles:

**Tabla 5. Factores analizados en el diseño de segundo orden tipo Box Behnken.**

Factor	-1	0	1
Humedad	58	63	68
Oligoelementos (mL)	6	9.7	13.3
EDTA (g/L)	0.037	0.056	0.075

En este diseño, se utilizaron 45 unidades experimentales debido a que se prepararon 15 unidades experimentales dentro de ellos 3 puntos centrales, por triplicado.

Los 15 medios de cultivo se prepararon como sugiere la matriz dada para un diseño de segundo orden Box Behnken (Anexo 6). Para agregar las sales de cada medio, se prepararon las siguientes soluciones concentradas:

**Solución 10X (g/l):** Lactosa 70, urea 60,  $K_2HPO_4$  50,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  15.

**Solución 50X:** Solución de oligoelementos.

**Solución 100X:** EDTA 7.5 g/L.

Debido a que el análisis se realizó por triplicado se prepararon 25 mL de cada medio, con el procedimiento descrito en el apartado 7.11. Para la fermentación, se ajustó la humedad a 58, 63 y 68% del cultivo, agregando un volumen de 3.72, 4.59, y 5.73 mL, respectivamente, se homogenizó y se incubaron durante 20 h a 40 °C.

### 7.10.5. Diseño de composición central rotatable más estrella.

Para acercarnos a la zona de mayor actividad enzimática se realizó un diseño de composición central rotatable más estrella, en el cual se evaluó el efecto de la concentración de oligoelementos y EDTA de la siguiente manera:

**Tabla 6. Factores y niveles analizados del diseño de segundo orden de composición más estrella.**

Factor	Niveles				
	-1.41	-1	0	1	1.41
Oligoelementos (mL)	3.916	4.9	7.3	9.7	10.68
EDTA (g/L)	0.015	0.022	0.039	0.056	0.063

En este diseño, se utilizaron 12 unidades experimentales dentro de ellos 4 puntos centrales, realizándose por triplicado. Los 12 medios de cultivo se prepararon como sugiere la matriz para un diseño de rotatable de composición central + estrella (Anexo 7). Las sales se agregaron mediante soluciones concentradas:

**Solución 10X (g/L):** Lactosa 70, urea 60,  $K_2HPO_4$  50,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  15.

**Solución 50X:** Solución de oligoelementos.

**Solución 100X:** EDTA 6.3 g/L.

Los medios fueron preparados como ya se mencionó y para la fermentación se fijó la humedad del cultivo a 65.5% sugerido por el diseño Box Behnken, por lo cual se agregaron 5.05 mL.

#### **Análisis de los diseños factoriales y de segundo orden.**

Los diseños estadísticos fueron analizados utilizando el programa Statgraphics® Plus versión 4.0, año 1999.



**7.11. Cinética de producción de lipasas con el medio mejorado por MSR.**

La cinética se realizó para comparar la actividad lipolítica obtenida con el medio inicial y el medio mejorado por MSR en este trabajo. La formulación de los dos medios evaluados, se muestran en la siguiente tabla:

**Tabla 7. Concentración de los nutrientes del Medio Rodríguez y medio mejorado por MSR.**

Componentes	Medio Rodríguez (g/L)	Medio propuesto (g/L)
Urea	4	6
Lactosa	5	7
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5	5
MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	1	1.5
PVA	1.6	1.6
Oligoelementos	4 mL	9.7 mL
Aceite de oliva	40	40
EDTA	0.04	0.022

Se prepararon 200 mL de los medios como se mencionó en el apartado 7.11. mediante las soluciones concentradas:

**Solución 10X (g/L):** Lactosa 70, urea 60, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 15.

**Solución 50X:** Solución de oligoelementos.

**Solución 100X:** EDTA 4 g/L.

Los medios se prepararon en un matraz aforado de 200 mL; en un vaso de precipitados se pesó el aceite requerido para los medios y se incorporó el medio previamente preparado. Se emulsificaron los medios durante 3 min con un homogenizador (Batidora Oster, Fuente de sodas de 2 velocidades, modelo 2523-13, 440-20), se inocularon con  $1 \times 10^7$  esporas/g si y se homogeneizó.

Para llevar a cabo la fermentación en esta cinética, se prepararon 30 matraces con 2.7 g de agrolita para evaluar la actividad lipolítica con cada medio; de manera que se muestreó cada uno por triplicado cada 3 h durante 30 h. Se ajustó la humedad a 65.5% en el medio optimizado y 65% en el medio inicial, de manera que se agregaron en los matraces 5.1 y 5.01 mL de medio emulsificado, respectivamente. Los matraces fueron cubiertos con polipropileno, y se incubaron durante 30 h a 40 °C. La extracción de la enzima y la determinación de actividad enzimática se realizaron como se describió anteriormente (Materiales y métodos).

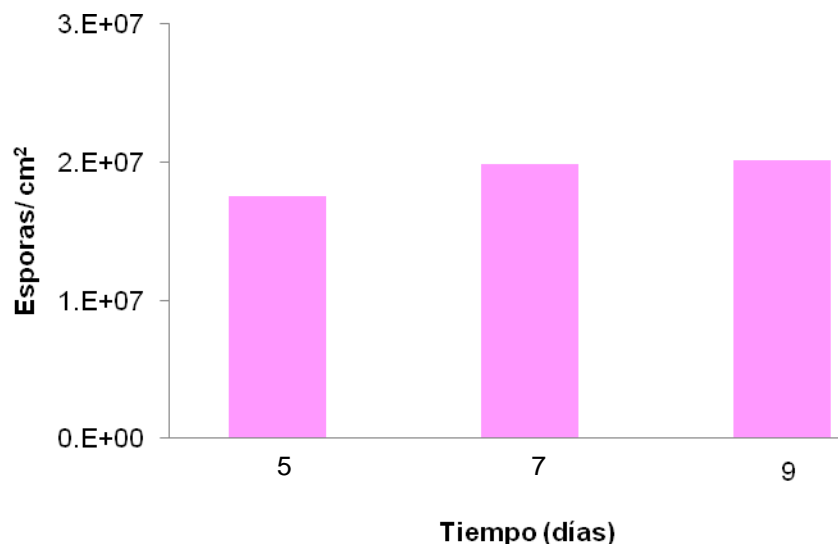
## **8. RESULTADOS.**

Para llevar a cabo los estudios de optimización del medio de cultivo fue necesario llevar a cabo estudios preliminares de producción de esporas, extracción de enzimas y selección del medio de cultivo que será optimizado. Una vez establecidas las condiciones de cultivo se procedió a optimizar el medio y las condiciones de cultivo. Para ello, se evaluaron diferentes estrategias. En una primera etapa se evaluó la interacción de todas las variables de estudio. Posteriormente, se determinó el efecto de la concentración del medio de cultivo sobre la producción de lipasa, y finalmente se optimizó el medio de cultivo.

En esta parte, se muestran los resultados y discusiones de los estudios preliminares para iniciar la optimización, es decir experimentos para seleccionar la edad del inóculo, determinar el tiempo de cultivo y concentración inicial del medio para comenzar la optimización. Posteriormente, se presentan los resultados obtenidos en el proceso de optimización y por último las discusiones generales de esta etapa.

### 8.1. Cinética de esporulación.

Con la finalidad de determinar la edad del inóculo para realizar las fermentaciones se realizó una cinética de esporulación de la cepa *Rhizopus homothallicus* 13<sup>a</sup>. (Gráfica 1). La máxima concentración de esporas se obtuvo al día 7 de cultivo permaneciendo constante hasta el día 9. Por ello se seleccionó una edad de inóculo de 7 días para la producción del inóculo para los estudios de FMS.

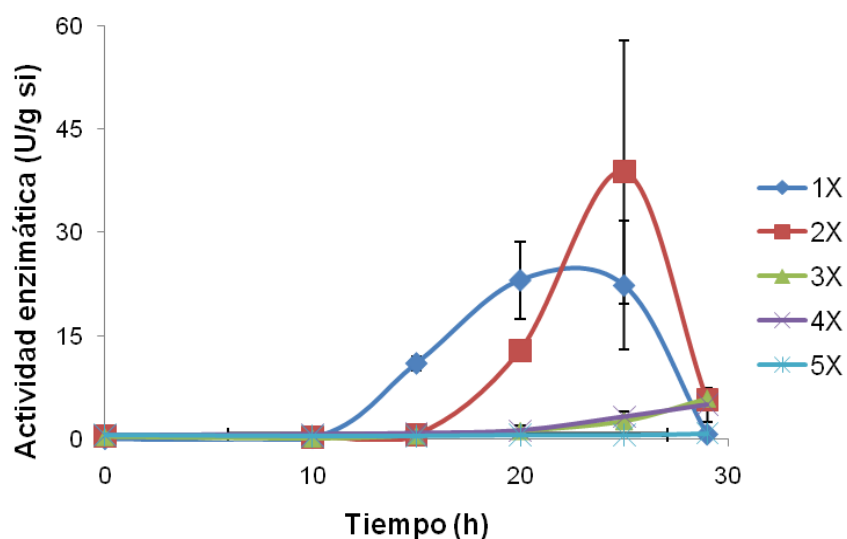


Gráfica 1. Cinética de esporulación de *Rhizopus homothallicus* 13a.

### 8.2. Efecto de la concentración del medio de cultivo.

Antes de comenzar la optimización fue necesario conocer la concentración de nutrientes del medio inicial para tomarlos como puntos centrales y así iniciar los diseños experimentales. Para ello, se realizaron cinéticas con el medio inicial concentrado desde 1 hasta 5 veces partiendo de un medio concentrado 5.5 veces. Esto nos permitió identificar el medio adecuado para obtener una mayor actividad lipasa. En la gráfica 2 se muestran las cinéticas de producción de lipasa con los medios concentrados, donde se determina que la mayor actividad lipasa obtenida fue de  $39 \pm 19$  U/gsi en 25 h con el medio concentrado 2X, pero a las 29 h se nota una caída brusca de la actividad, en cambio por debajo se encuentra graficada la cinética correspondiente al medio sin concentrar (1X), alcanzando la mayor

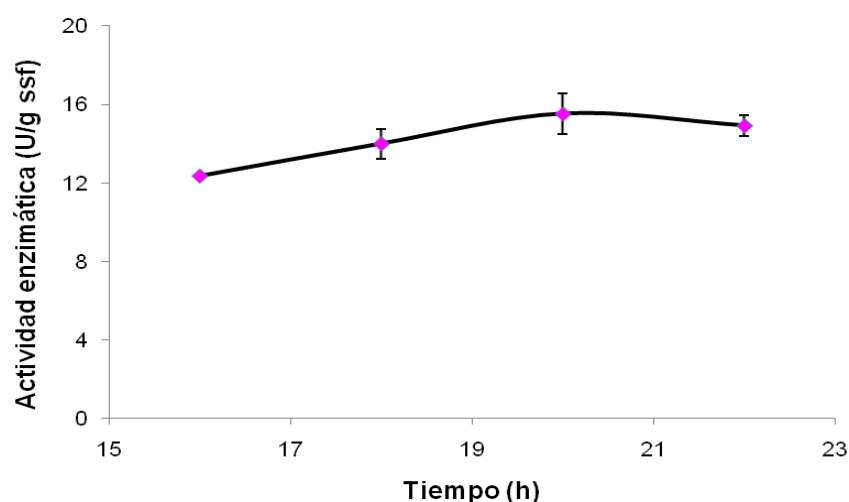
actividad aproximadamente a las 22 h con  $23.07 \pm 5.6$  U/ g si; con una abrupta caída en la actividad; estadísticamente, aunque la máxima actividad del medio 2X es mayor, no se muestran diferencias significativas con el medio 1X. Para los medios 3X y 4X se requirieron de 29 h para comenzar la producción enzimática, por el contrario en el medio 5X no se observó actividad durante la fermentación. Con lo cual, se puede concluir que el medio 1X contiene las concentraciones adecuadas de cada compuesto para la síntesis de lipasas y nos proporciona una mayor confiabilidad para establecer los nuevos valores de los niveles de los factores a analizar ya que el tiempo de síntesis de lipasas es menor y la actividad se mantiene estable durante 5 h.



Gráfica 2. Cinética de producción de lipasa por *R. homothallicus* con medios concentrados.

### 8.3. Determinación del tiempo de cultivo para la fermentación.

Para comenzar con la etapa de optimización se requirió establecer el tiempo de cultivo necesario para la producción de enzima; para lo cual se realizó una cinética de producción de lipasa con el medio inicial tomando muestras a las 16, 18, 20, y 22 h (Gráfica 3), donde se alcanza la mayor actividad lipasa (15.52 U/g ssf) a las 20 h de cultivo, el cual definió el tiempo de fermentación para los estudios posteriores de optimización del medio de cultivo.

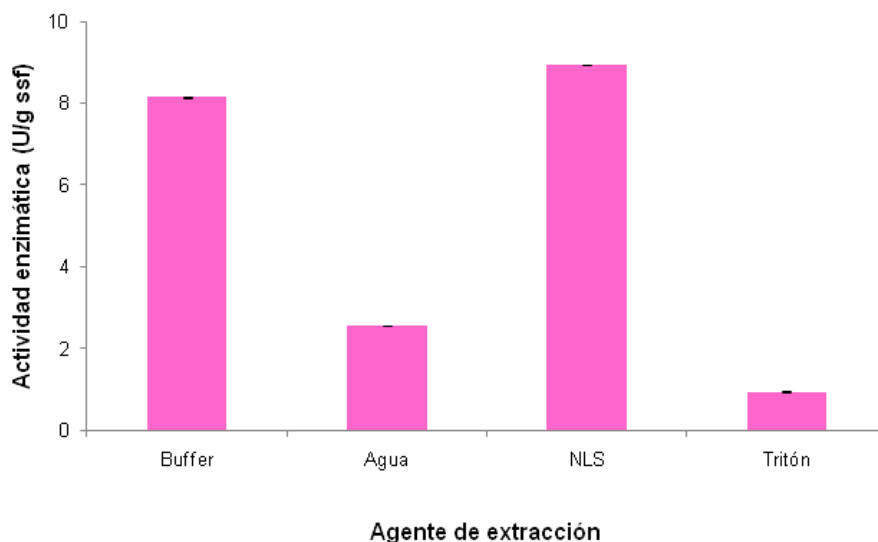


Gráfica 3. Cinética de producción de lipasa con el medio Rodríguez por FMS.

### 8.4. Selección del agente de extracción.

Antes de iniciar los estudios de optimización es necesario seleccionar un método para la obtención del extracto enzimático, ya que la muestra se requiere en estado líquido. Para ello, se evaluó el efecto de diferentes métodos de extracción. Se extrajo la enzima a partir de un biocatalizador de 16 h de fermentación utilizando agua, buffer Tris-HCl 100 mM, 0.25% PVA (pH 8), NLS y Tritón X-100 al 0.166% en el volumen de reacción. En la gráfica 4, al utilizar NLS como agente de extracción, aumenta la actividad enzimática en un porcentaje de 9.77% comparado con la actividad obtenida con buffer, en cambio, el uso de Tritón X-100 origina una disminución del 90% de la actividad utilizando NLS y 2.73 veces menos que la obtenida utilizando únicamente agua como agente de extracción. A

pesar de que la eficiencia de extracción con NLS fue ligeramente mayor (<10%) que la obtenida con amortiguador, se seleccionó este último para la obtención de los extractos enzimáticos a lo largo del trabajo experimental.



**Gráfica 4. Extracción de la actividad enzimática con diferentes agentes.**

## 8.5. Resultados de los diseños experimentales.

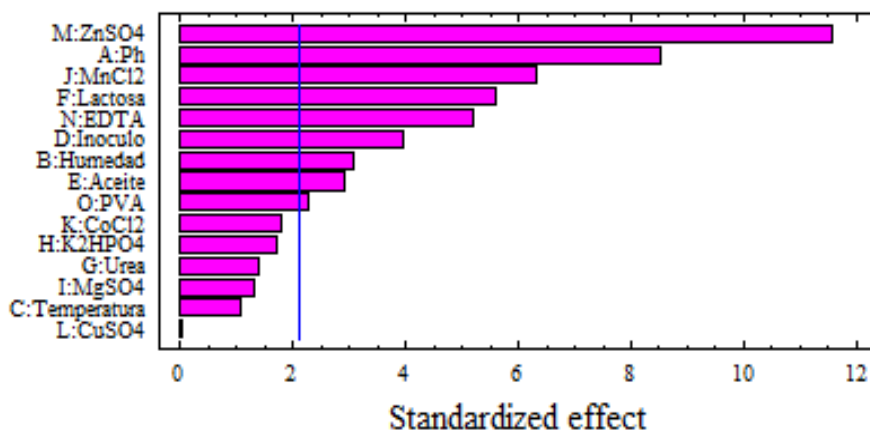
### 8.5.1. Diseño factorial $2^{15-11}$ (Resolución III) y $2^{15-10}$ (Resolución IV).

Para iniciar la optimización se llevó a cabo el proceso de cribado, para disminuir el número de factores significativos que intervienen en la fermentación para la producción de lipasas.

#### Diseño factorial $2^{15-11}$ (Resolución III).

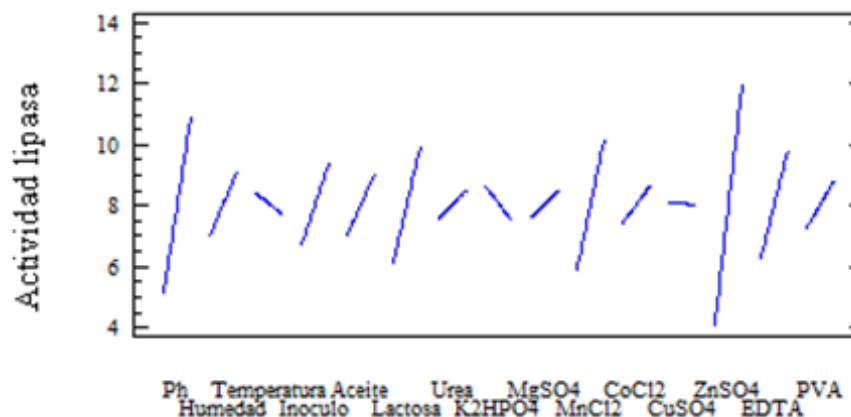
Este diseño se realizó para evaluar el efecto de todos los factores que intervienen durante la fermentación para la producción de lipasas y así poder determinar aquellos que inciden directamente sobre la actividad enzimática. Se evaluaron 15 variables de estudio; pH, humedad, temperatura, tamaño de inóculo y de la concentración de urea, lactosa, aceite de oliva,  $K_2HPO_4$ ,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $MnCl_2$ ,  $CoCl_2 \cdot 7H_2O$ ,  $CuSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ , EDTA y PVA en el medio de cultivo inicial y se usó la producción de lipasa como variable de respuesta. Los resultados

obtenidos se presentan en la Gráfica 5. Las variables concentración de ZnSO<sub>4</sub>, MnCl<sub>2</sub>, lactosa, EDTA, aceite de oliva, PVA; así como pH, humedad y tamaño de inóculo tienen un efecto significativo sobre la síntesis de lipasas.



Gráfica 5. Diagrama de Pareto del diseño factorial 2<sup>15-10</sup> (Resolución III).

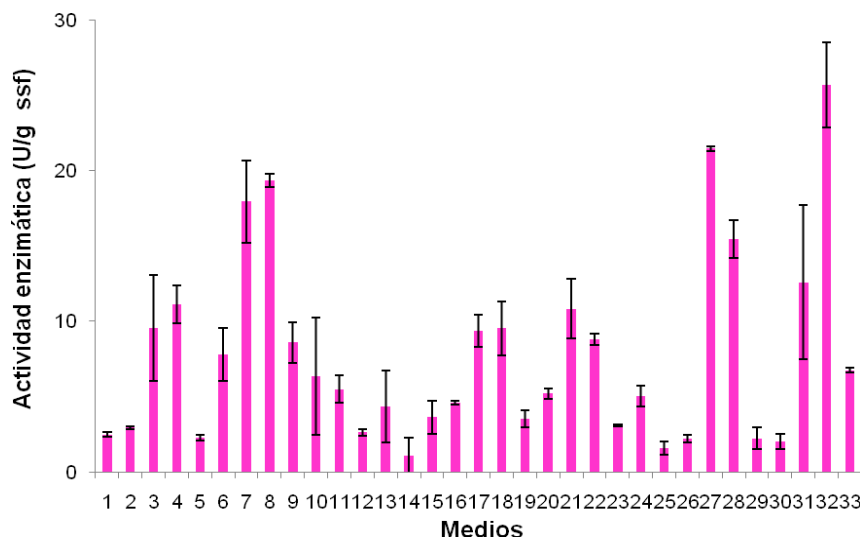
En la Gráfica 6, se muestra como es el efecto de los factores significativos sobre la producción de lipasa. De los 15 factores evaluados, 12 presentan pendiente positiva lo que indica que su concentración o valor debe de ser aumentada, 2 (temperatura y K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) pendiente negativa y 1 (CuSO<sub>4</sub>) pendiente cero. Con este estudio se concluye que se debe aumentar la concentración de los factores con pendiente positiva, para aumentar la actividad. Debido a que se simplificó el número de experimentos se puede confundir el efecto de los factores principales con interacciones dobles; por lo cual se decidió tomar los factores significativos de este análisis, así como los del análisis completo.



Gráfica 6. Efecto de los factores principales sobre la actividad enzimática del diseño factorial 2<sup>15-11</sup> (Resolución III).

**Resultados del diseño factorial 2<sup>15-10</sup> (Resolución IV).**

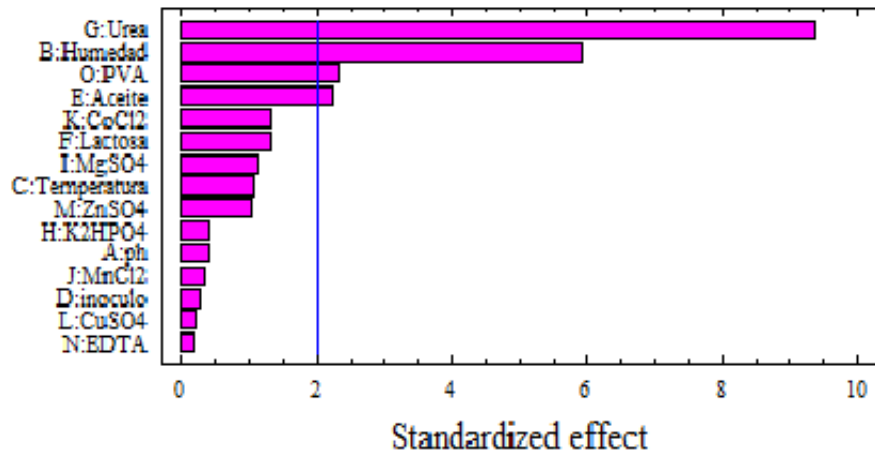
Posteriormente, se analizó el diseño factorial 2<sup>15-10</sup> con resolución IV, mostrando el efecto de los factores principales, sin que estos se confundan con las interacciones dobles. En la Gráfica 7, se observa que los factores analizados en este diseño tienen efecto directo sobre la producción de lipasas. En particular, el medio 32; que corresponde al tratamiento donde todos los factores analizados en este diseño se encuentran en el nivel +1, es el medio donde se obtuvo la mayor actividad; en cambio el medio 1, mostró la menor actividad enzimática ya que tiene todos los factores en el nivel -1.



**Gráfica 7. Actividad enzimática obtenida en los tratamientos del diseño factorial 2<sup>15-10</sup>.**

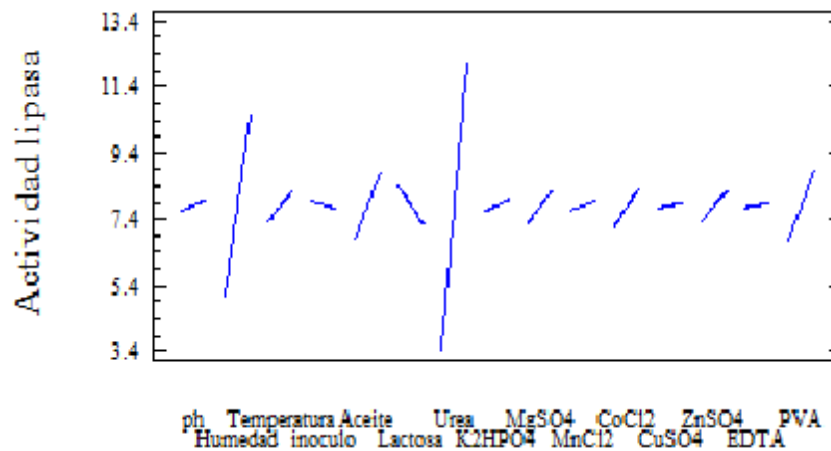
El diagrama de Pareto (Gráfica 8) deduce que la humedad, la concentración de urea, aceite de oliva y PVA tienen un efecto significativo sobre la producción de lipasas.





Gráfica 8. Diagrama de Pareto del diseño factorial 215-10 (Resolución IV).

En la siguiente Gráfica, se puede concluir que todos los factores significativos requieren el nivel alto para aumentar la actividad enzimática.



Gráfica 9. Efecto de los factores principales sobre la actividad enzimática del diseño factorial 215-10 (Resolución IV).

Con estos resultados se decidió tomar los factores significativos, tanto del diseño 215-11 como del diseño 215-10, teniendo como factores significativos el PVA, aceite, urea, lactosa, ZnSO4·7H2O, MnCl2·4H2O, EDTA, concentración de inóculo, humedad y pH. Para analizar el efecto de estos factores, se separaron en factores nutricionales y ambientales.

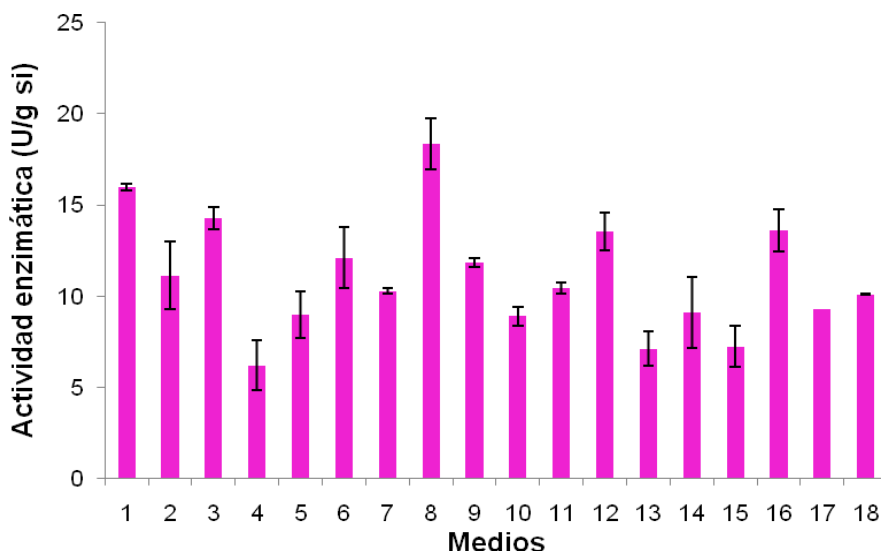
### 8.5.2. Diseño factorial $2^{5-1}$ .

Como se tenían muchos factores significativos del diseño anterior, se decidió separar los factores significativos en factores nutricionales y ambientales por lo cual este diseño  $2^{5-1}$ , se ocupó para analizar los factores nutricionales que fueron reducidos de la siguiente manera:

**Aceite/PVA:** Tomando en cuenta que el PVA ayuda a emulsificar el medio, este depende directamente de la concentración de aceite de oliva que se agregue, ya que las pendientes de los 2 factores mostradas en el diseño anterior tienen una pendiente muy parecida en magnitud, por lo cual esta relación se tomó como un solo factor.

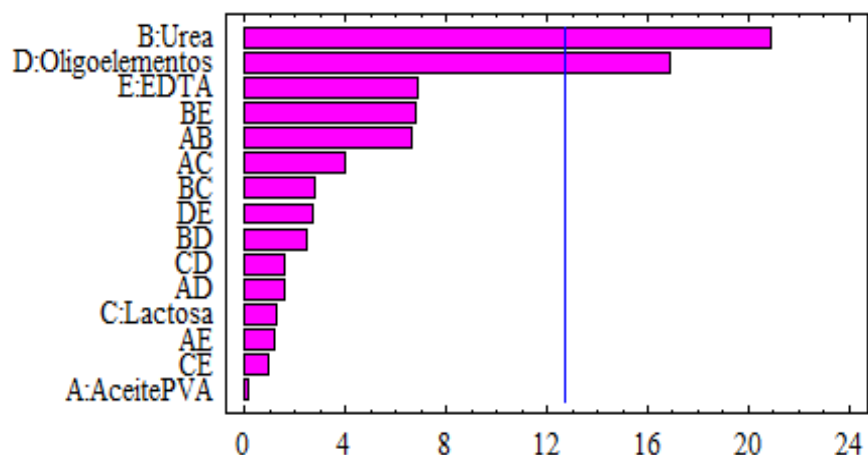
**Solución de oligoelementos:** Las sales significativas  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  y  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ , se evaluarán dentro de esta solución tomando en cuenta que al analizar las sales por separado, las pendientes del efecto sobre la actividad enzimática fue positiva. Además se evaluarán como factores la concentración de urea, lactosa y EDTA en el medio.

En la Gráfica 10 se muestra la actividad enzimática obtenida en cada uno de los tratamientos de este diseño. Con el medio 8 se obtuvo la mayor actividad. Este medio contiene los factores aceite/PVA, urea, lactosa y EDTA en el nivel -1 y oligoelementos en el nivel +1.



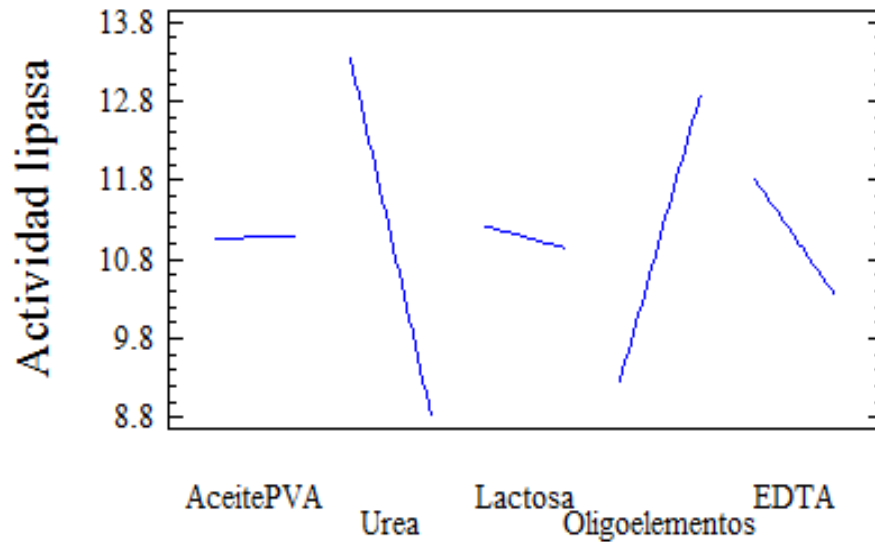
Gráfica 10. Actividad enzimática del diseño  $2^{5-1}$ .

Estadísticamente, los factores significativos son urea y oligoelementos con un valor de probabilidad menor al 0.05% (Gráfica 11).



Gráfica 11. Diagrama de Pareto del diseño  $2^{5-1}$  (Resolución V).

La Gráfica 11, deduce que la relación aceite/PVA y lactosa no tiene efecto sobre la actividad dentro de las concentraciones 20/1.6 a 60/2.4 g/L y 7 a 15 g/L respectivamente. En cambio en el caso de la urea y EDTA el análisis muestra pendientes negativas sobre la actividad lipasa, es decir que se requiere la concentración más baja analizada de estos factores, a diferencia de la solución de oligoelementos que muestra una pendiente positiva requiriendo la mayor concentración analizada (12 mL/L).



**Gráfica 12. Efecto de los factores principales sobre la actividad enzimática del diseño factorial  $2^{5-1}$  (Resolución V).**

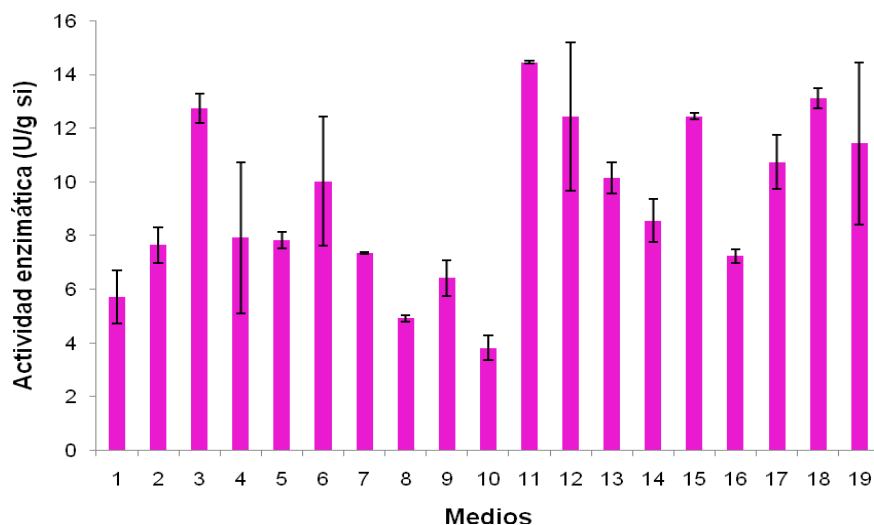
Tomando en cuenta los resultados del diseño  $2^{15-10}$ , donde se evaluó la urea en concentraciones de 1 a 4 g/L, mostrándose una pendiente positiva (Gráfica 9), se procedió a evaluar la fuente de nitrógeno a concentraciones mayores (4 a 16 g/L) en un diseño preliminar (datos no mostrados), mostrando significancia de este factor con una pendiente negativa sobre la actividad, por lo cual en este diseño  $2^{5-1}$  para verificar el efecto de este factor en la actividad enzimática, se estudió una concentración de 4 a 12 g/L observándose que el efecto era negativo (Gráfica 12), es decir disminuir la concentración de esta para aumentar la actividad, por lo cual se decidió fijarla a una concentración intermedia a las estudiadas, la cual fue de 6 g/L para los estudios posteriores.

Es importante mencionar que a pesar que el análisis estadístico indica que no es significativa la concentración de EDTA ni la interacción de oligoelementos y EDTA, debido a la acción quelante reportada en la bibliografía de este último, se tomó la decisión de analizarlo junto con la concentración de la solución de oligoelementos.

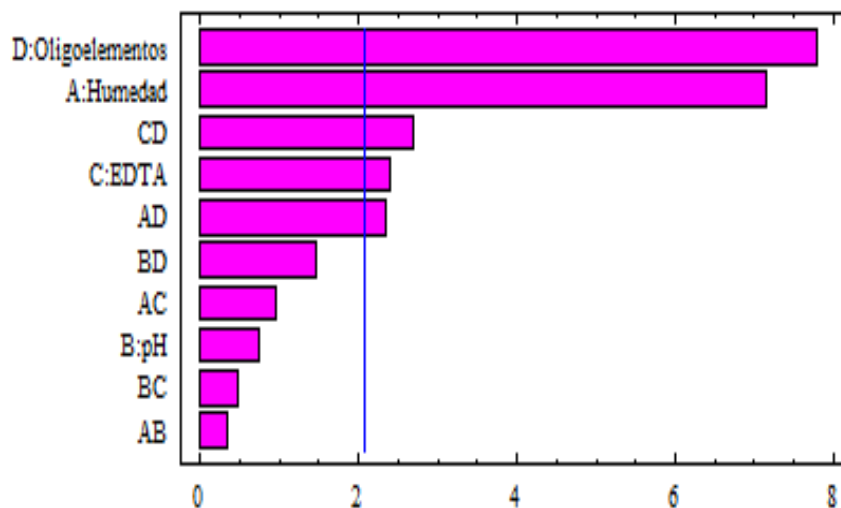
### 8.5.3. Diseño factorial 2<sup>4</sup>.

El objetivo de este diseño fue evaluar los factores ambientales significativos inferidos por los diseños 2<sup>15-10</sup> y 2<sup>15-11</sup>, fueron concentración de inóculo, humedad y pH más los diseños significativos del diseño 2<sup>5-1</sup> (oligoelementos y EDTA). La concentración del inóculo no fue posible estudiarla ya que se observó poca esporulación por la cepa *Rhizopus homothallicus* 13<sup>a</sup>, por lo cual por razones de operatividad se fijó a  $1 \times 10^7$  esporas/g si. Los factores analizados en este diseño fueron la humedad, pH, concentración de EDTA y volumen de solución de oligoelementos.

La actividad obtenida en cada tratamiento, se muestra en la Gráfica 13. A pesar que las desviaciones estándar son grandes se distinguen diferencias significativas comparadas con los medios con menor actividad; lo que sirvió para realizar los análisis estadísticos.



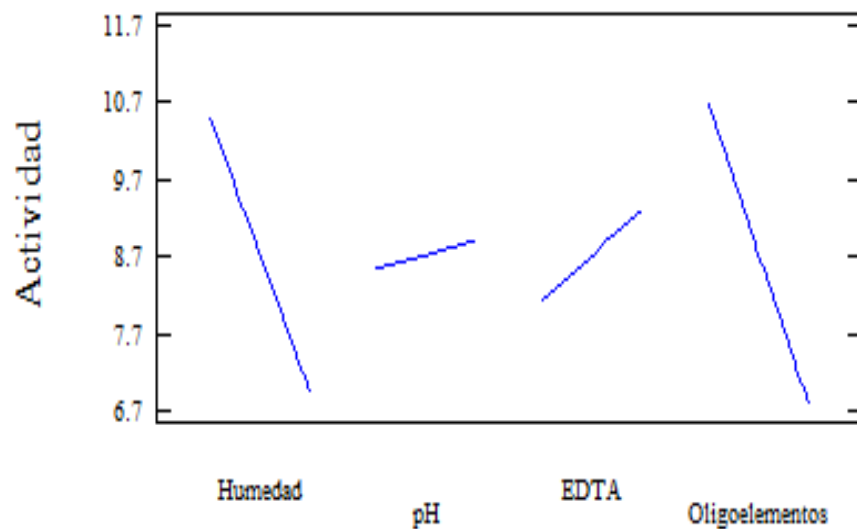
Gráfica 13. Actividad enzimática del diseño 2<sup>4</sup>.



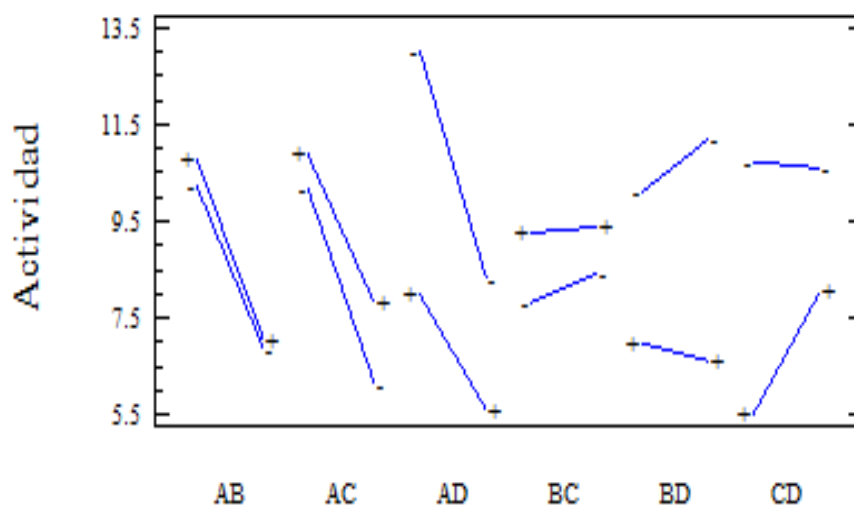
**Gráfica 14. Diagrama de Pareto del diseño factorial  $2^4$  (Resolución V).**

El análisis de significancia de los factores se encuentra en el diagrama de Pareto (Gráfica 14). Los oligoelementos, la humedad y el EDTA son significativos, así como las interacciones oligoelementos - EDTA y humedad - oligoelementos con un valor de probabilidad menor a 0.05%.

En la Gráfica 15, la humedad y los oligoelementos, mostraron un efecto negativo dentro de los niveles analizados; es decir se obtiene mayor actividad en el nivel bajo de cada factor, en cambio en la concentración analizada de EDTA, esta tuvo que ser aumentada para maximizar la actividad; por otro lado el pH no fue significativo aunque su efecto mostró una ligera pendiente positiva, por lo cual sugiere ajustar este a su nivel alto (pH 7.0) pero esto implicaba mayor probabilidad de contaminación por bacterias por lo que se decidió fijar el medio a 6.5. La interacción oligoelementos-EDTA aumenta la actividad cuando se tiene mayor concentración de EDTA ya que en ese nivel, no importa si hay alta o baja concentración de oligoelementos, en el caso de la interacción humedad-oligoelementos, se recomienda utilizar los niveles bajos de los factores para aumentar considerablemente la humedad (Gráfica 16). Por lo cual, en el siguiente diseño se evaluarán únicamente los factores oligoelementos, EDTA y humedad.



Gráfica 15. Efecto de los factores principales sobre la actividad enzimática del diseño factorial  $2^4$  (Resolución V).



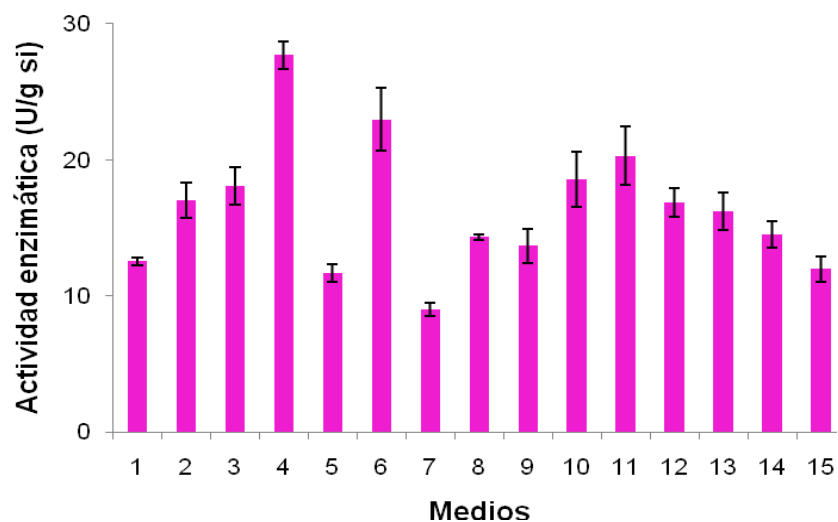
Gráfica 16. Efecto de las interacciones de los factores principales sobre la actividad enzimática del diseño factorial  $2^4$  (Resolución V).

#### 8.5.4. Diseño de segundo orden: Box Behnken.

Con el objetivo de optimizar y determinar si alguno de los factores evaluados es cuadrático se realizó un diseño de segundo orden tipo Box Behnken para tratar de

encontrar la curvatura en alguno de los factores. En este diseño se avaluó la humedad, la concentración de EDTA y oligoelementos.

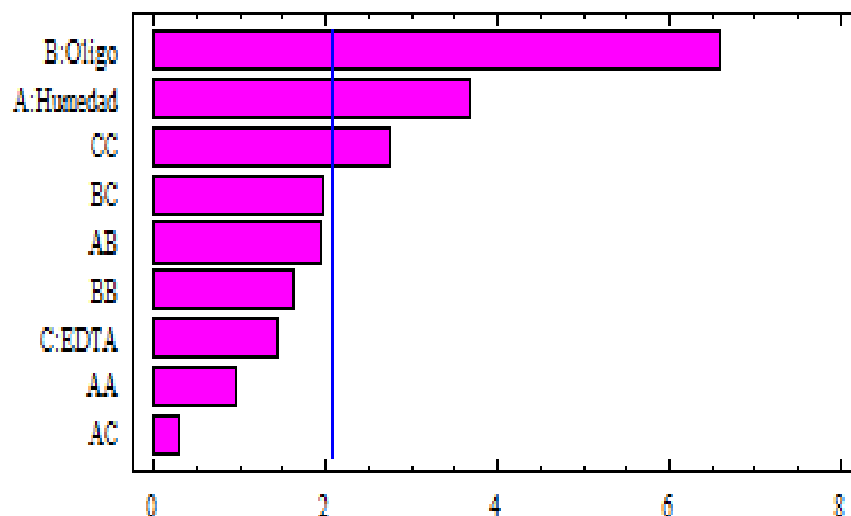
En la Gráfica 17, se encuentran las actividades enzimáticas de los 15 tratamientos, donde el medio 4 es el medio con mayor actividad, teniendo los factores oligoelementos y EDTA en el nivel +1 y la humedad en el nivel 0.



**Gráfica 17. Actividad enzimática del diseño de segundo orden Box Behnken.**

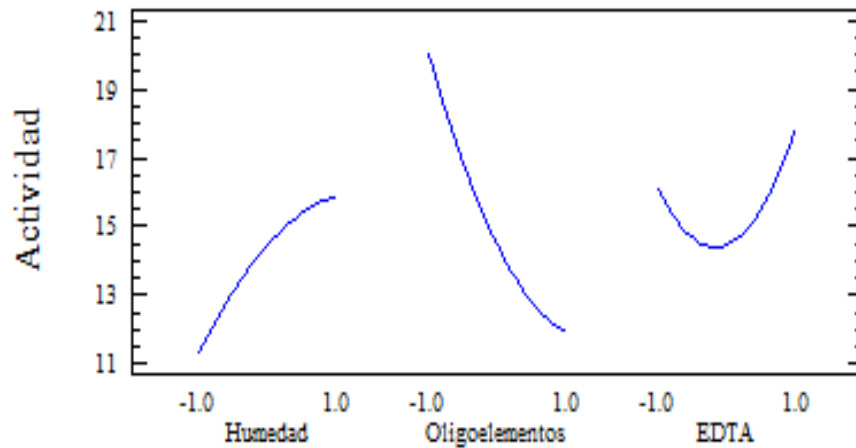
Según el diagrama de Pareto (Fig. 17), los factores significativos en este diseño son la humedad y los oligoelementos, así como el término cuadrático del EDTA; lo que nos indica que en esta zona los factores humedad y oligoelementos son lineales.





Gráfica 18. Diagrama de Pareto del diseño de segundo orden tipo Box Behnken.

El efecto de los factores principales se observa en la Gráfica 19. El EDTA presenta curvatura con un punto mínimo, indicando que se requiere aumentar o disminuir la concentración de EDTA para llegar a la zona de maximización. En el caso de la humedad, se muestra que el nivel alto promueve una mayor actividad y debido a que es un factor muy poco controlable, se decidió fijar tomando en cuenta la respuesta de optimización que indica que en el nivel 0.48 se aumenta la actividad, lo cual corresponde a 65.5% de humedad, además de mostrarse que ya se estaba muy cerca del óptimo. Mientras que los oligoelementos, se requieren en el nivel bajo (6 mL/L). Debido a esto, se continuó con un diseño de composición central + estrella, que permitiera abrir un poco más la zona de estudio.

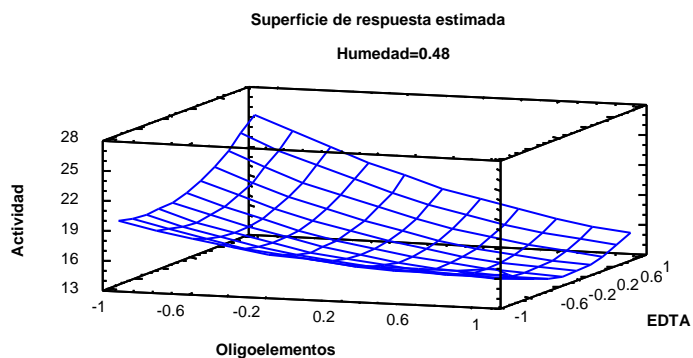


**Gráfica 19. Efecto de los factores principales del diseño de segundo orden tipo Box Behnken.**

El análisis estadístico de este diseño, permitió ajustar un modelo de segundo orden, relacionando la actividad lipasa con el efecto de los factores humedad, EDTA y oligoelementos (Ec. 1) mostrando un coeficiente de correlación del 80%. El modelo generó una gráfica de superficie de respuesta (Gráfica 20) para la actividad lipasa donde se fijó el valor óptimo de humedad a 0.48. Esta superficie indica que las condiciones que maximizan la producción de actividad lipasa son 0.075 g/L de EDTA y 6 mL/L de solución de oligoelementos.

**Ecuación 1. Modelo de ajuste.**

$$\begin{aligned} \text{Actividad} = & 14.4618 + 2.28368 \cdot \text{Humedad} - 4.09112 \cdot \text{Oligoelementos} + \\ & 0.892128 \cdot \text{EDTA} - 0.878387 \cdot \text{Humedad}^2 + 1.70836 \cdot \text{Humedad} \cdot \text{Oligoelementos} \\ & + 0.261601 \cdot \text{Humedad} \cdot \text{EDTA} + 1.49124 \cdot \text{Oligo}^2 - 1.74539 \cdot \text{Oligo} \cdot \text{EDTA} + \\ & 2.5223 \cdot \text{EDTA}^2 \end{aligned}$$

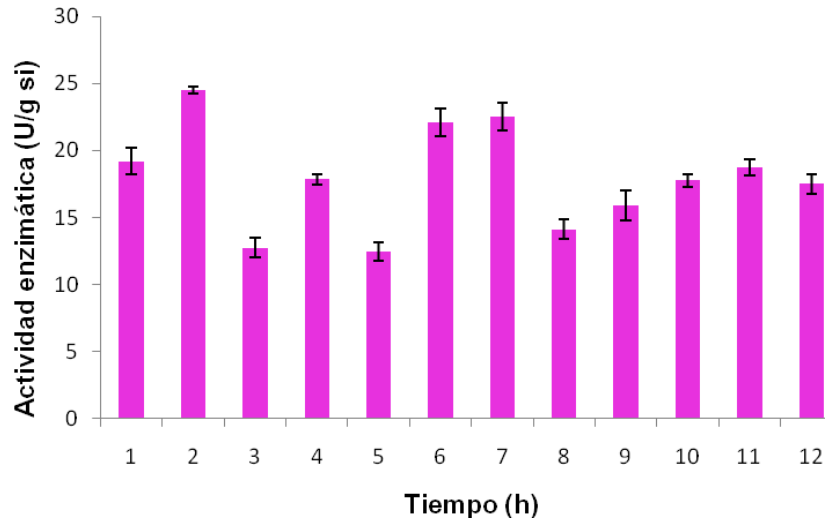


**Gráfica 20. Superficie de respuesta de los factores humedad, EDTA y oligoelementos.**

### 8.5.5. Diseño de composición central rotable + estrella.

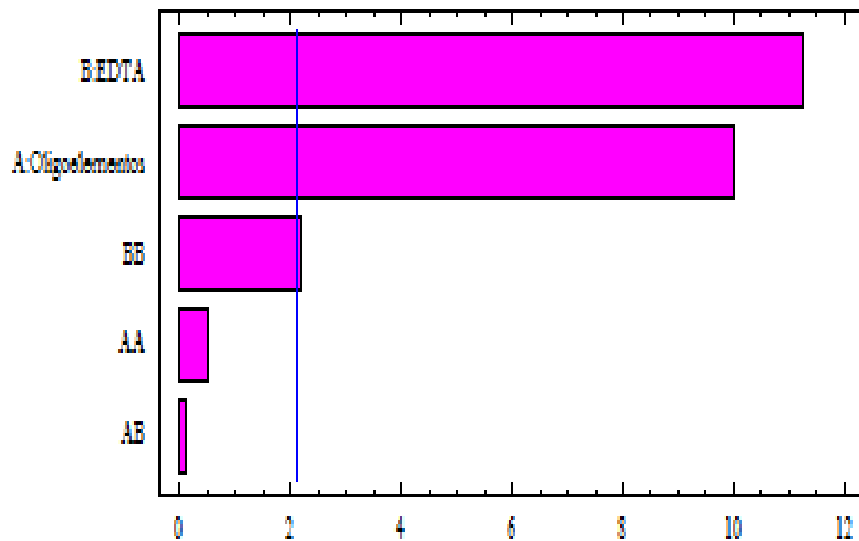
La finalidad de este diseño fue abrir un poco la zona de estudio para encontrar los óptimos de los factores analizados. Los factores a analizar únicamente fue la concentración de EDTA y los oligoelementos, los niveles se determinaron mediante un análisis de las pendientes de cada diseño observándose que a concentraciones de 0.08 g/L de EDTA se disminuía la actividad, por lo cual debido a esto se decidió bajar la concentración para optimizar a través del nivel bajo. En el caso de los oligoelementos, se decidió bajar la concentración de manera que abarcara parte del análisis anterior y concentraciones más bajas.

Las actividades enzimáticas de los tratamientos obtenidas en este diseño, se encuentran en la Gráfica 21, donde el tratamiento número 2, es el tratamiento con mayor actividad (24.5 U/g si), así que de acuerdo a la matriz propuesta por el programa Statgraphics ® (Anexo 6), este tratamiento consiste en el nivel +1 en oligoelementos y -1 en concentración de EDTA; es decir 9.7 mL/L y 0.022 g/L, respectivamente.



**Gráfica 21. Actividad enzimática de los tratamientos del diseño de composición central + estrella.**

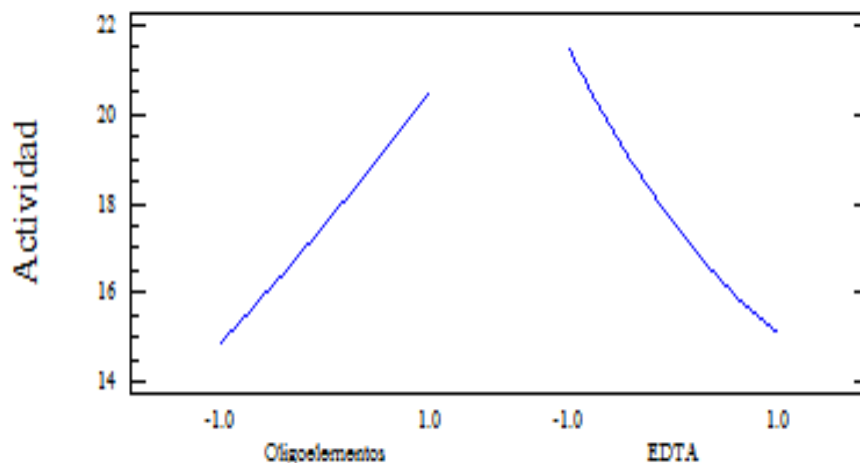
De acuerdo al análisis, los términos lineales de la concentración de EDTA y oligoelementos son significativos, al igual que el término cuadrático de la concentración de oligoelementos en el medio (Gráfica 22).



**Gráfica 22. Diagrama de Pareto del diseño de segundo orden de composición central + estrella.**

El efecto de los factores principales, se muestra en la Gráfica 23. En el caso del EDTA, la zona de estudio se recorrió a la izquierda de manera lineal observándose

un incremento de actividad al disminuir la concentración, por otro lado, cambió el efecto de los oligoelementos, ya que al disminuir la concentración de estos como se indicó en el diseño anterior, este factor se volvió cuadrático además de sugerir aumentar la concentración de estos, esto se puede deber a que si se tiene alta concentración de EDTA y baja de oligoelementos, las sales forman complejos debido a la presencia del EDTA e impide la disponibilidad de estas sales en el medio.



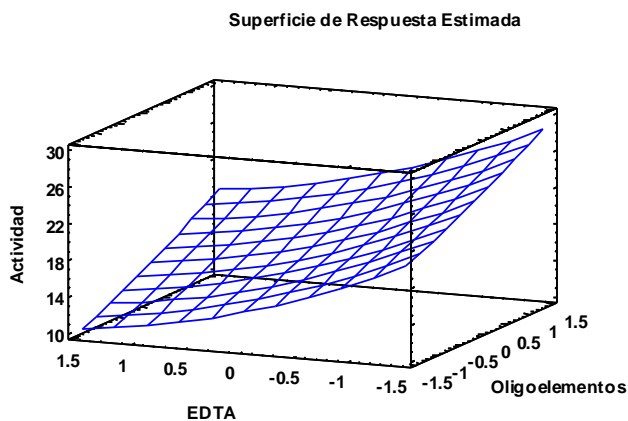
**Gráfica 23. Efecto de los factores principales sobre la actividad enzimática del diseño de segundo orden de composición central + estrella.**

El análisis estadístico de los resultados, permitió ajustar un modelo de segundo orden, relacionando la actividad lipasa con el efecto de los factores EDTA y oligoelementos (Ec. 2) mostrando un coeficiente de correlación del 93%. El modelo generó una gráfica de superficie de respuesta (Gráfica 24) para la actividad lipasa. Esta superficie indica que las condiciones que maximizan la producción de actividad lipasa son 0.022 g/L de EDTA y 9.7 mL/L de solución de oligoelementos.

**Ecuación 2. Modelo de ajuste.**

$$\text{Actividad} = 17.559 + 2.81162 \cdot \text{Oligoelementos} - 3.16061 \cdot \text{EDTA} +$$

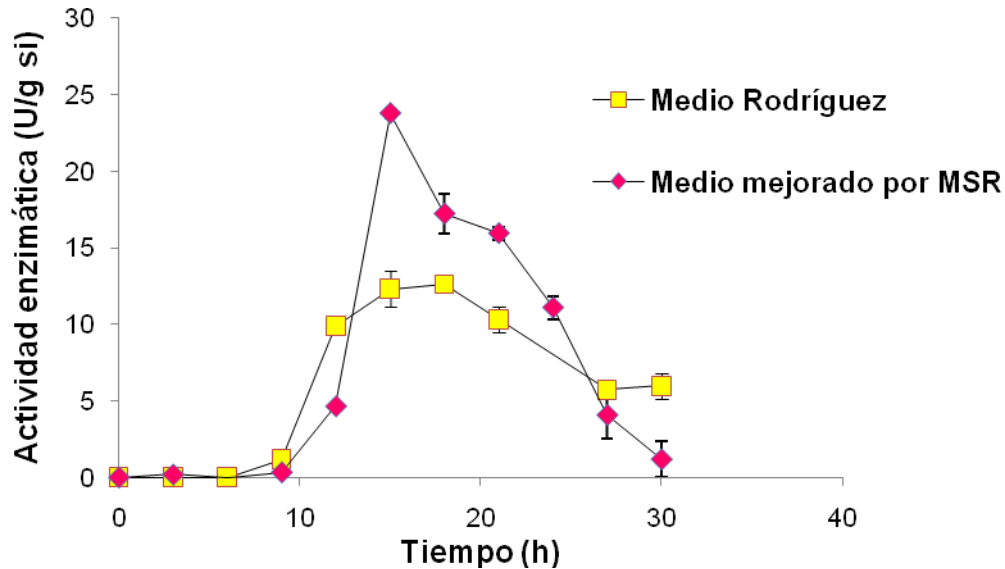
$$0.157427 \cdot \text{Oligoelementos}^2 + 0.041836 \cdot \text{Oligoelementos} \cdot \text{EDTA} + 0.696468 \cdot \text{EDTA}^2$$



Gráfica 24. Superficie de respuesta de los factores EDTA y oligoelementos.

### 8.6. Comparación de la actividad enzimática obtenida en el medio Rodríguez y col., 2006 y medio mejorado por MSR en este trabajo.

Por último, se realizó la comparación de las cinéticas de actividad lipolítica de los 2 medios utilizados en este trabajo, con la finalidad de verificar si con el medio optimizado se fue posible aumentar la actividad lipolítica. En la siguiente Gráfica, se muestran las cinéticas de actividad lipolítica en U/g si de los medios evaluados.



Gráfica 25. Cinética de comparación del medio de Rodríguez y col., (2006) y el medio mejorado por MSR.

Se determina que con el medio reportado por Rodríguez y col. (2006) se alcanzó a las 18 h el valor máximo de actividad enzimática; el cual corresponde a  $12.6 \pm 0.05$  U/g si, en cambio en el medio mejorado por MSR a las 15 h se obtiene un máximo de actividad correspondiente a  $23.98 \pm 0.3$  U/g si; lo que indica un incremento de alrededor del 90% de actividad comparada con el medio inicial. A pesar de que el medio mejorado por MSR tiene mayor actividad, después de las 15 h sufre una caída brusca en la actividad probablemente a la producción de proteasas; en cambio a diferencia del medio de Rodríguez, este a las 30 h aun conserva el 50 % de su actividad; pero la caída brusca no necesariamente es una desventaja ya que se puede tomar el biocatalizador a las 15 h que es el punto de mayor actividad enzimática.

## 9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

Para comenzar la etapa de optimización, se requirió establecer las condiciones iniciales de fermentación; es decir edad del inóculo, método de extracción, concentración del medio inicial, así como el tiempo de cultivo para la fermentación para posteriormente comenzar con los diseños experimentales. Inicialmente, se determinó que la edad del inóculo fue de 7 días manteniendo los niveles de esporulación constantes de 7 a 9 días. Li y Xingzhong (2009) reportaron que *Metarhizium anisopliae* alcanza niveles de esporulación de  $3.32 \times 10^7$  esporas/cm<sup>2</sup> en un medio con sacarosa y urea; y *Paecilomyces lilacinus* M-14 puede producir  $1.59 \times 10^8$  esporas/cm<sup>2</sup> en un medio enriquecido con manosa y triptona a los 14 días de cultivo, mostrando menores niveles de esporulación que *R. homothallicus* 13a sobre PDA, ya que requieren el doble de tiempo para crecer a pesar de ser cultivados en un medio enriquecido. Por otro lado, Guerra y col., (2010) reportan con el género *Rhizopus stolonifer* una producción de esporas de  $3.93 \times 10^6$  esporas/cm<sup>2</sup> a las 48 h de cultivo sobre agar papa dextrosa, la cual posee un nivel de esporulación cercano a la cepa 13a pero en menor tiempo, lo cual es una ventaja ya que se tiene un cultivo joven con esporas más eficientes.

Posteriormente, se seleccionó la concentración del medio inicial que serviría como valores centrales en el proceso de optimización, en la cinética de actividad enzimática concentrando el medio inicial, se pudo concluir que entre más concentrado se encuentren los medios, aumenta el tiempo de producción enzimática. En el caso del medio 1X y 2X donde la concentración de la fuente de carbono (lactosa) es baja; la productividad no se ve afectada, en cambio conforme se va incrementando la concentración de fuente de carbono como en los medios 3X, 4X y 5X, la productividad disminuye considerablemente, lo cual coincide con reportes que indican que el consumo de carbohidratos es para el crecimiento microbiano y el consumo del inductor para la producción de lipasas, por lo cual cuando hay altas concentraciones de carbohidratos; el microorganismo evita el consumo del inductor (Córdova, 2003; Pokorny y col., 1994; Fadiloglu y Erkmén, 1999; Nahas, 1988). Después de analizar la concentración del medio inicial, se determinó el tiempo de fermentación que consistió en 20 h con 15.52 U/g si,



mostrando un tiempo corto comparado con cepas como *A.niger* con actividad de 364 U/gms en 72 h (Kamini y col.,1998); *R. oligosporus* con 48 U/gms en 72 h (Ul-Haq y col., 2002) y *C. rugosa* con 27 U/g si en 48 h (Rao y col., 1993), lo que disminuye el riesgo de contaminación del cultivo provocado por bacterias, cuando hay tiempos de fermentación muy largos.

Dentro de las etapas preliminares a la optimización, se seleccionó la solución buffer Tris-HCl como agente de extracción; debido a que en las condiciones de estudio de actividad lipasa con NLS y Tritón X-100 a una concentración de 0.166% en el volumen de reacción; únicamente se mostró un incremento de aproximadamente el 10% en la actividad con NLS comparado con la actividad obtenida con buffer y con Tritón X-100, se mostró una disminución de la extracción enzimática. Estos resultados, son comparados con los obtenidos por Velasco (comunicación personal), donde también se observa un incremento en la actividad menor al 10%, al utilizar NLS al 0.5% en la extracción, debido a que este tipo de detergentes modifican la tensión superficial; en cambio los resultados obtenidos con Tritón X-100 difieren con los obtenidos por Rodríguez y col., 2006 al mostrar un incremento de recuperación de lipasa cercano al 55% comparado con la extracción con Buffer Tris-HCl, tomando también en cuenta que el utilizó un método diferente para medir actividad y aceite de oliva como sustrato. Por último, se llevó a cabo la optimización mediante metodología de superficie de respuesta, iniciando con un diseño  $2^{15-11}$  que permitió evaluar tanto factores nutricionales como ambientales, determinando que los factores PVA, aceite, urea, lactosa,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ , EDTA, concentración de inóculo, humedad y pH inciden directamente sobre la producción de lipasas logrando disminuir a la mitad el número de factores analizados inicialmente. De acuerdo a la bibliografía, se reporta que la humedad y el pH son los factores ambientales más importantes sobre la producción de lipasas. Para una FMS, es necesario que las condiciones de humedad no sean tan bajas que puedan dificultar la transferencia de masa, lo cual podría originar la pérdida de propiedades funcionales de la enzima necesarias para el metabolismo celular (Gutarra y col., 2005) pero un exceso de esta, puede reducir la porosidad del sustrato dificultando la transferencia de calor y masa

(Pandey, 2003). Los resultados para el factor humedad obtenidos en el diseño factorial  $2^4$  y Box Behnken donde se determina que el óptimo es de 65.5%, coincide con los reportes de Kempka y col. (2007) y Godoy y col., (2009) que optimizaron la producción de lipasa por *Penicillium verrucosum* y *Penicillium simplicissimum* en FMS, deduciendo que se requieren humedades entre 50 y 70%, para aumentar la actividad enzimática. Por otro lado, el pH resultó significativo en el primer diseño de cribado teniendo que aumentar su valor; lo cual aumentaría el riesgo de contaminación del cultivo por lo cual se fijó a un pH de 6.5 que se encuentra dentro de los rangos de pH óptimos reportados para diferentes lipasas como la cepa *Torulopsis* sp. donde su pH óptimo es de 6.5 (Motai y col., 1966), para *Penicillium simplicissimum* es 5.0 (Sztajer y col., 1992), para *Pseudomonas putida* 8.0–9.0 (Lee y Rhee, 1993), para *Pichia burtonii* es 6.5 (Sugihara y col., 1995).

Por otro lado, entre los factores nutricionales más reportados, se encuentra la concentración de aceite de oliva, el tipo de la fuente de nitrógeno, carbono y la adición de oligoelementos en el medio. El aceite de oliva es utilizado comúnmente como inductor y fuente de carbono en la producción de lipasas, en el primer diseño, se mostró significancia de este factor al incrementar su concentración, pero en el diseño  $2^{5-1}$ , al evaluarlo junto con la urea y los oligoelementos; se volvió no significativo pudiendo fijar su concentración a 40 g/L logrando aumentar la actividad enzimática sin aumentar grandes cantidades de aceite, lo cual puede ser una ventaja ya que evita la limitada disponibilidad de los carbohidratos para los organismos fúngicos en un medio suplementado con grandes concentraciones de aceite de oliva, lo que promoverá que a través del consumo del carbohidrato (lactosa), se estimule el crecimiento microbiano y posteriormente se comience el consumo del inductor para la producción de la enzima (Fadiloglu y Erkmen, 1999 y Nahas, 1988).

Al término de la etapa de optimización, se concluyó que los factores que tuvieron más influencia sobre la producción de lipasa fueron los oligoelementos y EDTA, comprobando lo obtenido por Rodríguez y col., (2006) demostrando la importancia de la adición de oligoelementos en el medio, recalando que se encuentran

reportes que muestran que el ión  $Mn^{+2}$  puede incrementar la actividad (Mateos y col., 2006; Gopinath y col., 2002) corroborando su significancia en el diseño  $2^{15-10}$ . La importancia de estos micronutrientes en el medio se debe a que son utilizados como cofactores en las enzimas y tienen funciones importantes a nivel celular, en cuanto a la importancia de evaluar la interacción de EDTA - oligoelementos, se atribuye a los reportes de la bibliografía donde se menciona que el EDTA puede llegar a causar una disminución de la actividad enzimática debido a que influyen en la formación de complejos de metales con ácidos grasos ionizados cambiando su solubilidad y comportamiento en la interfase (Lee y Rhee, 1993), por lo cual es necesario revisar la concentración de EDTA en el medio, de manera que no interfiera en la solubilidad y disponibilidad de los oligoelementos.

Al término de la etapa de optimización y después de analizar los resultados obtenidos en los diseños donde se evaluaron oligoelementos y EDTA (factorial  $2^4$ , Box Behnken y composición central), podemos darnos cuenta que no se logró una optimización, probablemente al evaluar los factores EDTA y oligoelementos se estuvo oscilando en el punto máximo ya que los diseños nos indicaban estar subiendo y bajando las concentraciones de los factores (Tabla 8), pero debido a la interacción fuerte del EDTA y oligoelementos, fue imposible detectarlo, para lo cual se cree necesario fijar la concentración de EDTA y optimizar con el factor oligoelementos buscando que el efecto de la interacción, no intervenga en la producción de la enzima.

**Tabla 8. Resultado de las concentraciones y factores analizados en los diseños experimentales.**

<b>Factor</b>	<b>Concentración</b>	<b>Resultado diseño experimental</b>
<b>Oligoelementos</b>	<b>(mL/L)</b> 4 - 12	Aumentar
	12 - 20	Disminuir
	6 - 13.3	Disminuir
	3.916 - 10.68	Aumentar
<b>EDTA</b>	<b>(g/L)</b> 0 - 0.04	Aumentar
	0.02 - 0.08	Disminuir
	0.037 - 0.075	Disminuir
	0.015 - 0.063	Disminuir

Por estos resultados, fue difícil seleccionar la concentración de EDTA y oligoelementos que se fijarían en el medio de cultivo de este trabajo que permitió aumentar la actividad, por lo cual para definirlo se observó la actividad enzimática obtenida en cada uno de los tratamientos del diseño de segundo orden de composición central + estrella y se tomó como concentraciones finales del medio optimizado, la composición del medio 2 ya que alcanzó el más alto nivel de actividad enzimática; lo que permitió un aumento de la producción del 100% y 1.27 veces la productividad comparado con el medio inicial. Comparando el incremento de actividad enzimática alcanzado en este trabajo, el porcentaje de producción enzimática se encuentra por debajo de los incrementos alcanzados en la bibliografía donde utilizan MSR como estrategia de optimización; como es el caso de Acikel y col., (2010) que aumentaron la actividad lipolítica 3.14 veces en FML, evaluando el efecto de la concentración de sacarosa, melaza, extracto de levadura, aceite de girasol y tween 80, concluyendo que los factores significativos sobre la producción de lipasas fueron la concentración de sacarosa, aceite de girasol y tween 80, de la misma manera Jin-yong Yan y Yun-jun Yan, (2008) optimizaron la producción de lipasa ligada a célula, a partir de 13 variables incluyendo composición del medio y condiciones de cultivo, mostrando que la temperatura y la concentración de aceite de oliva y  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  intervienen directamente sobre la producción enzimática, logrando un incremento de 4.5 veces, cabe destacar el reporte de Wang y col., (2008) que aumentaron la producción lipolítica 61.5 veces con aceite de oliva como sustrato, seleccionando inicialmente el aceite de oliva como inductor y posteriormente evaluando la concentración de maltosa, peptona, aceite de oliva y pH excluyendo al aceite de oliva como factor significativo. Por otro lado, por FMS, Adinarayana y col., (2004) optimizaron la producción de lipasas pero evaluando factor por factor, seleccionando trigo como sustrato sólido, 96 h de tiempo de incubación, humedad del 80%, pH 7 y aceite de oliva como inductor aumentando 1.8 veces la actividad obtenida por FML también utilizando aceite de oliva en la determinación lipolítica, por otro lado Rao y col., (1992) maximizó la producción de lipasas mediante sales de cobre por FMS comparada con FML al evaluar la concentración de maltosa,

urea y aceite de oliva. Con lo cual podemos concluir que los métodos de MSR son importantes para la maximización de la actividad lipolítica pero también es factible evaluar factor por factor dentro de un proceso; aunque se pierde la posibilidad de analizar el efecto de las interacciones entre los factores, lo cual podría originar eliminar factores que son significativos junto con otros pero no significativos por sí solos, pero a pesar de esto también se puede lograr el incremento de actividad como mostró Rodríguez y col., (2006), en cuanto al aumento de la producción del 100% en la actividad enzimática, fue un buen resultado; ya que se partió de un medio de cultivo previamente mejorado.

## 10. CONCLUSIONES.

La estrategia utilizada en este trabajo permitió incrementar la producción y la productividad de actividad lipasa en un 100% con relación a la actividad enzimática obtenida con el medio original. Los factores que presentaron mayor efecto sobre la producción de lipasa fueron EDTA y oligoelementos. Mostrándose, que la interacción entre EDTA y oligoelementos impidieron alcanzar un óptimo en la producción de lipasa para estas variables.

### 10.1. Conclusiones particulares.

- Ⓢ Se determinó que la edad del inóculo para las fermentaciones es de 7 días, aunque la concentración de esporas permanece constante de los días 7 a 9.
- Ⓢ La cinética de producción de lipasas con el medio original presenta un máximo a las 20h de cultivo.
- Ⓢ Se seleccionó Buffer Tris-HCl 100 mM con 0.25% PVA (pH 8) como agente de extracción para la enzima.
- Ⓢ El uso de un diseño factorial  $2^{15-10}$  permitió reducir a la mitad el número factores a evaluar para el proceso de optimización. Los valores que tuvieron más influencia fueron: PVA, aceite de oliva, urea,  $ZnSO_4$ ,  $MnCl_2$ , lactosa, EDTA, pH, humedad y tamaño de inóculo.
- Ⓢ El diseño  $2^{5-1}$  mostró que los valores de concentración de urea y oligoelementos tuvieron un efecto significativo sobre la producción de lipasa.
- Ⓢ El diseño  $2^4$ , indicó que los factores significativos sobre la actividad enzimática son EDTA, oligoelementos, humedad y la interacción EDTA – oligoelementos y humedad - oligoelementos.

- ④ El diseño de segundo orden tipo Box Behnken, determinó que los términos lineales de la humedad y oligoelementos son significativos, así como el término cuadrático de EDTA.
- ④ El diseño de composición central + estrella, concluyó que se requiere disminuir la concentración de EDTA y aumentar la concentración de oligoelementos para aumentar la actividad lipolítica.

## **10.2. Recomendaciones y/o perspectivas.**

Con base en los resultados encontrados y a las conclusiones de este proyecto de tesis se pueden señalar las siguientes perspectivas:

- ④ Profundizar en el método de extracción, probando diferentes concentraciones de NLS y Tritón X-100 para aumentar la actividad y realizar análisis para verificar si la enzima se extrae, activa o inhibe.
- ④ En la etapa de optimización, es recomendable fijar la concentración de EDTA y ampliar los niveles de la concentración de oligoelementos para encontrar el valor óptimo, de esta manera no intervendrá el efecto de la interacción EDTA – oligoelementos sobre la actividad lipasa.

## 11. BIBLIOGRAFÍA.

Abdel-Fattah, Y.R., Optimization of thermostable lipase production from a thermophilic *Geobacillus* sp. Using Box-Behnken experimental design. *Biotechnol. Lett.* 2002. 24: 1217-1222.

Acikel, U., Ersan, M., Acikel, S. Optimization of critical medium components using response surface methodology for lipase production by *Rhizopus delemar*. *Food and Bioprod Process.* 2010. 88(1): 31-39.

Adams M., Perler, F., Kelly R. Extremoenzymes: expanding the limits of biocatalyst. *Bio/Technology.* 1995.13:662-668.

Adinarayana, K., Raju, K. V. V. S. N. B., Zargar, M. I., Devi, R. B., Lakshmi, P.J., Ellaiah, P. Optimization of process parameters for production of lipase in solid-state fermentation by newly isolated *Aspergillus* species. *Indian J Biotech.* 2004. 3 (1): 65-69.

Beisson F, Arondel V, Verger R. Assaying *Arabidopsis* lipase activity". *Biochem. Soc. Trans.* 2000. 28: 773-775.

Booth, S. R., Shanks, J. R. Potential of a drier rice / Mycelium formulation of entomopathogenic fungi to suppress subterranean pest in small fruits. *Biocontrol Science and Technology.* 1998. 8: 197-206.

Bornscheuer UT. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbial. Rev.* 2002. 26: 73-81.

Bosch, A., Marona, R. A., Yantono, O. M. A single descriptive model of filamentous fungi spore germination. *Process Biochem.* 1995. 30(7): 599-606.

Brockerhoff, H., Jensen, R.G. Lipases. Lipolytic enzymes. 1974. 25–175. New York Academic press.

Camargo de Morais, M.M., Morais, Jr.M.A., Melo, E.H. and Lima Filho, J.L. Production of extracellular lipase by a *Candida rugosa* strain isolated in Pernambuco, Brazil. *Rev. Microbiol.* 2003. 29: 134-137.

Cannel, E. y Moo Young, M. Solid state fermentation. *Process Biochem.* 1980. 15: 2-7.

Christen P., Angeles, N., Corzo, G., Farres, A., Revah, S. Microbial lipase production on a polymeric resin. *Biotechn. Techn.* 1995. 9 (8) 597-600.



Córdova, J. Isolement identification et physiologie des champignons thermophiles en vue de la production de lipases par fermentation en milieu solide. Montpellier, France: Université de Montpellier II. 1998.

Córdova J, Nemmaoui M, Ismaili-Alaoui M, Morin A, Roussos S, Raimbault M, Benjilali B. Lipase production by solid state fermentation of olive cake and sugar cane bagasse. *J Mol Catal B Enz.*1997. 5(1/4):75–8.

Corzo G., Revah, S. Production and characteristics of the lipase from *Yarrowia lipolytica* 68. *Bioresource Technol.* 1999. 70:173- 180.

Dalmau, E., Montesinosa, J.L., Lotti, M., Casas, C. Effect of different carbon sources on lipase production by *Candida rugosa*. *Enzyme Microb Technol.* 2000. 26:657–663.

Doelle, H. W., Mitchell, D. A., Rolz, C. E. Solid Substrate Cultivation. *Elsevier Applied Science*, London, N. York. 1992.Chapter 3: 35.

Domenech, F. Obtención de un biopreparado a partir de *Metarhizium anisopliae* por fermentación en estado sólido para su empleo como control biológico de insectos en la agricultura.Tesis para el grado científico de Doctor en Ciencias Técnicas. Subdirección de Biotecnología, ICIDCA, Ciudad Habana. 2000.

Dorta, B., Arcas J. A., Estola, R. J. Characterization of growth and sporulation of *Metarhizium anisopliae* in solid substrate fermentation. *Enzyme and Microbial Technology.* 1996. 19: 434-439.

Ertola, R., Yantorno, O., Mignone, C. Medios de fermentación. Recuperado del sitio Web del Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico de la OEA: <http://www.biologia.edu.ar/microind/medios.htm#temario>.

Fadiloglu S., Erkmen O. Lipase production by *Rhizopus oryzae* growing on different carbon and nitrogen sources. 1999. *J Sci Food Agric* 79:1936-1938.

Gervais, P., Molin P., Grajek W., Bensoussan M. Influence of the Water Activity of a Solid Substrate on the Growth rate and sporogenesis of filamentous fungi. *Biotechn. Bioeng.* 1988.70:351-354.

Ghosh, P.K., Saxena, R.K., Gupta, R., Yadav, R.P., Davidson, W.S. Microbial lipases: production and application. *Science Progress.*1996. 79: 119–157.

Godoy, M.G., Gutarra, M.L.E., Maciel, F.M., Felix, S.P., Bevilagua, J.V., Machado, O.L.T., Freire, D.M.G. Use of a low-cost methodology for biodetoxification of castor bean waste and lipase production. 2009. *Enz.Microb. Techn.* 44:317–322.

Gombert, A.K., Lopes, A.P., Castilho, L.R., Freire, D.M.G. Lipase production by *Penicillium restrictum* in a solid-state fermentation using babassu oil cake. *Process Biochem* 1999. 35:85–90.

Guerra, S.M.G., Sandoval E.L.A., Amora, L.E., Velázquez, V.M.G., Vásquez M.L., Niurka, H.A. Effect of chitosan on the in vitro development of *rhizopus stolonifer* (ehrenb: fr) vuill on two culture medium. *Rev. colomb. biotecnol.* 2010. 12 (2) 214-222.

Gunstone, F.D. Enzymes as biocatalysts in the modification of natural lipids. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 1999. 79 (12) 1535–1549.

Gutarra M.L.E., Castilho, L.R., Freire, D.M.G., Santanna, J.G.L. Lipase production by solid-state fermentation—cultivation conditions and operation of tray and packed-bed bioreactors. *Appl Biochem Biotechnol.* 2005. 121:105–116.

Gutarra M.L.E., Mateus. G.G., Maugeri, F., Rodrigues, M.I., Freire, D.M.G., Castilho, L.R. Production of an acidic and thermostable lipase of the mesophilic fungus *Penicillium simplicissimum* by solid-state fermentation. *Bio Tech.* 2009. 100: 5249–5254.

Gutiérrez, P.H., de la Vara S.R. Análisis y diseño de experimentos. Segunda edición. Editorial Mc Graw-Hill. México. 2008. Pág. 386-391.

Heerden, E.V., Litthauer, D., Verger, R. Biochemical Characterization and kinetic properties of a purified lipase from *Aspergillus niger* in bulk phase and monomolecular films. *Enzyme and Microbial Technology* . 2002. 30, 902–909.

Imamura, S., Kitaura S. Purification and characterization of a monoacylglycerol lipase from the moderately termophilic *Bacillus* sp. *J. Biochem.* 2000. 127:419-25.  
Jaeger, K.E., Ransac, S., Dijkstra B.W., Colson C., Van Heuvwl, M., Misset, O. Bacterial lipases. *FEMS Microbiol Rev* . 1994.15: 29-63.

Jenkins, N. E., Heviefó, G., Langewald, J., Cherry, A. J., Lomer, C. C. Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides . *Biocontrol News and Information.* 1998. 19 (1): 21-31.

Kempka A.P., Lipke N. L., Pinheiro T.F., Menoncin S., Treichel H., Freire D.M.G., Di Luccio M.D., Oliveira D. Response surface method to optimize the production and characterization of lipase from *Penicillium verrucosum* in solid-state fermentation. *Bioprocess Biosyst Eng.* 2008.31:119–125.

Kordel, M., Hofmann, B., Schomburg, D., Schmid, R. Extracellular Lipase of *Pseudomonas* sp. Strain ATCC 21808: Purification, Characterization, Crystallization, and Preliminary X-Ray Diffraction Data. *J. Bacteriol.* 1991. 173(15): 4836-4841.

- Larroche C. Microbial growth and sporulation behaviour in solid-state fermentation. *J. Sci. Ind. Res.* 1996. 5: 408-423.
- Laukevics, J.J., Apsite, A.F., Viesturs, V.E., Tengerdy, R.P. Solid substrate fermentation on wheat straw to fungal protein. *Biotechnol Bioeng* 1984. 26:1465–1474.
- Lee, S.Y. y Rhee, J.S. Production and partial purification of a lipase from *Pseudomonas putida* 3SK. *Enzyme and Microbial Technology.* 1993. 15, 617–623.
- Li, G. y Xingzhong, L. Nutritional Requirements of Mycelial Growth and Sporulation of Several Biocontrol Fungi in Submerged and on Solid Culture. *Microbiol.* 2010. 79 (5) 612–619.
- Lima, V.M.G., Krieger, N., Sarquis, M.I.M., Mitchell, D.A., Ramos, L.P., Fontana, J.D. Effect of nitrogen and carbon sources on lipase production by *Penicillium aurantiogriseum*. *Food Technol Biotechnol.* 2003. 41:105–10.
- López, E. Tratamientos enzimáticos de la Industria. UNED. 1999.pp 23-40.
- Macre, A.R., Hammond, R.C. Present and future applications of lipases. *Biotech Genetic Eng* 3. 1985.193–217.
- Mateos, J.C., Rodríguez, J.A., Roussos, S., Cordova, J., Abousalham, A., Carriere, F., Baratti, J. Lipase from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid state fermentation than liquid fermentation procedures. 2006. *Enz. Microb. Techn.* 39: 1042–1050
- Mitchell, D. A., Berovic, M. y Krieger N. Overview of solid state bioprocessing *Biot. Ann. Review.* 183 Elsevier Science B.V. All rights reserved. 2002. Vol. 8.
- Moore, D., Prior, C. The potencial of mycoinsecticides. *Biocontrol News and Information.* 1993.14 (2): 31-40.
- Motai, H., Ichishima, E. Yoshida, F. Purification and properties of lipases from *Torulopsis.* *Nature.* 1966. 210, 308–309.
- Nahas E. Control of lipase production by *Rhizopus oligosporus* under various growth conditions. *J Gen Microbiol.* 1988.134:227-233.
- Neerupmaa, N., Jagdeep K. Studies on lipolytic isoenzymes from a thermophilic *Bacillus* sp. Production, purification and biochemical characterization. *Enzyme and microbial technology.* 2006. 40:881-887.
- Novotny, C., Dolezalova, L., Musil, P., Novak, M. The production of lipases by some *Candida* and *Yarrowia* yeasts. *J. Basic Microbiol.* 1988. 28, 221±227.

Oriol, E., Raimbault, M., Roussos, S., Viniegra, G. Water and water activity in the solid state fermentation of cassava starch by *Aspergillus niger*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1988. 27: 498-503.

Pandey, A., Benjamin, S., Soccol, C. R., Nigam, P., Krieger, N., Soccol, V. T. The realm of microbial lipases in biotechnology . *Biotechnol. Appl. Biochem.* 1999. 29: 119–131.

Pandey A. Solid-state fermentation. *Biochem Eng J.* 2003. 13:81– 84.

Pfeffer, J., Richter, S., Nieveler, J., Hansen, C.E. Rhlid, R.B., Schmid, R.D., Rusnak, M. High yield expression of Lipase A from *Candida Antarctica* in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* and its purification and characterization. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2006. 72: 931–938.

Pirt S.J. Principles of microbe and cell cultivation. Blackwell. Scientific Publications, Oxford. 1975.

Pokorny, D., Friendrich, J., Cimerman, A. Effect of nutritional factors on lipase biosynthesis by *Aspergillus niger*. *Biotechnol. Lett.* 1994. 16:363-366.

Rajendran, A., Thangavelu, V. Optimization of medium composition for lipase production by *Candida rugosa* NCIM 3462 using response surface methodology. *Canadian Journal of Microbiol.* 2007. 53( 5 ): 643-655.

Rathi, P., Goswami, V.K., Sahai, V., Gupta, R. Statistical medium optimization and production of a hyperthermostable lipase from *Burkholderia cepacia* in a bioreactor. *Journal of Applied Microbiol.* 2002. 93:930–936.

Rao, P.V., Jayaraman, K., Lakshmanan, C.M. Production of lipase by *Candida rugosa* in solid-state fermentation .1. Determination of significant process variables. *Process Biochem.* 1993. 28 (6): 385-389.

Rao, P.V., Jayaraman, K., Lakshmanan, C.M. Production of lipase by *Candida rugosa* in solid-state fermentation .2. Medium optimization and effect of aeration. *Process Biochem.* 1993. 28 (6): 391-95.

Rapp, P., Backhaus, S. Formation of extracellular lipases by filamentous fungi, yeasts, and bacteria. *Enzyme Microb Technol.* 1992. 14:938–943.

Rivera, C., García F. Enzimas lipolíticas y su aplicación en la industria del Aceite. Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste. 2007. Vol 11 (2): 37-43.

Rivera, M.G., Tinoco, V.J.R., Sánchez, S., Farres, A. Production of microbial lipases in a solid-state fermentation system, *Biotechnol Lett.* 1991.13: 277-280.

Rodríguez, J. A., Mateos, J. C., Nungaray, J., Bhagnagar, T., Roussos, S., Córdova, J., Baratti, J. Improving lipase production by nutrient source modification using *Rhizopus homothallicus* cultured in solid state fermentation. *Process Biochem.* 2006. 41 (11): 2264-2269.

Sánchez, A. Recuperación, purificación, y caracterización de lipasas producidas por *Candida rugosa*. Aplicación a la resolución de compuestos quirales y diseño del reactor enzimático. Tesis para el grado de Doctor en Ingeniería Química. Técnicas. Subdirección de Ingeniería Química. Barcelona, España. 1998.

Saxena, R. K., Ghosh, P. K., Gupta, R., Davidson, W. S., Bradoo, S., Gulati. R. The fungistatic action of oleic acid. *Curr. Sci.* 1999. 77: 101–115.

Sharma, R., Chisti, Y., Banerjee, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnol. Adv.* 2001. 19: 627–662.

Shirazi, S.H., Rehman, S.R., Rehman, M.M. Production of extracellular lipases by *Saccharomyces cerevisiae*. *World J Microb Biotech.* 1998.14: 595–597.

Sugihara, A., Senoo, T., Enoki, A., Shimada, Y., Nagao, T. y Tominaga, Y. Purification and characterization of a lipase from *Pichia burtonii*. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 1995. 43, 277–281.

Sztajer, H., Lunsdorf, H., Erdmann, H., Menge, U. & Schmid, R. Purification and properties of lipase from *Penicillium simplicissimum*. *Biochimica et Biophysica.* 1992. Acta 1124, 253–261.

Troller, J. A. Influence of water activity on microorganisms in foods. *Food Techn.* 1980.34: 76-82.

Universidad Nacional Federico Villarreal, Facultad de Ingeniería Industrial y de Sistemas. Nutrición bacteriana final. Recuperado el 7 de Mayo del 2009 del sitio Web de Scribd: <http://es.scribd.com/doc/17103594/Nutricion-Bacteriana-Final>.

Ul-Haq, I., Idrees, S., Rajoka, M.I. Production of lipases by *Rhizopus oligosporus* by solid state fermentation. *Process Biochem.* 2002. 37(6): 637–41.

Vargas, G., Treichel, H., de Oliveira, D., Beneti, S.C., Freire, D.M.G., Di Luccio, M. Optimization of lipase production by *Penicillium simplicissimum* in soybean meal. *J Chem Technol Biotechnol.* 2008. 83:47–54.

Verger R. Interfacial activation of lipases: facts and artifacts. *Tibtech.* 1997. 15: 32-38.

Viniegra, G., Favela, E., Aguilar, C., Romero Gómez, S., Díaz, G., Augur, C. Advantages of fungal enzyme production in solid-state over liquid fermentation systems. *Biochemical Engineering Journal* 2003. 13: 157-167.

Wahler D, Reymond JL. Novel methods for biocatalyst screening. *Curr Opin Chem Biol* . 2001. 5:152–158.

Wang, D., Xu, Y., Shian, T. Effects and oils and oil-related substrates on the synthetic activity of membrane-bound lipase from *Rhizopus chinensis* and optimization of the lipase fermentation media. *Biochemical Engineering Journal*. 2008. 41:30-37.

Yan, J. y Yan, Y. Optimization for producing cell-bound lipase from *Geotrichum sp.* and synthesis of methyl oleate in microaqueous solvent. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2008. 78:431–439.

Zhu Y., Smits J. P., Knol W. y Bol J. A novel solid-state fermentation system using polyurethane foam as carrier. *Biotechnol. Lett.* 1994. 16: 643-648.

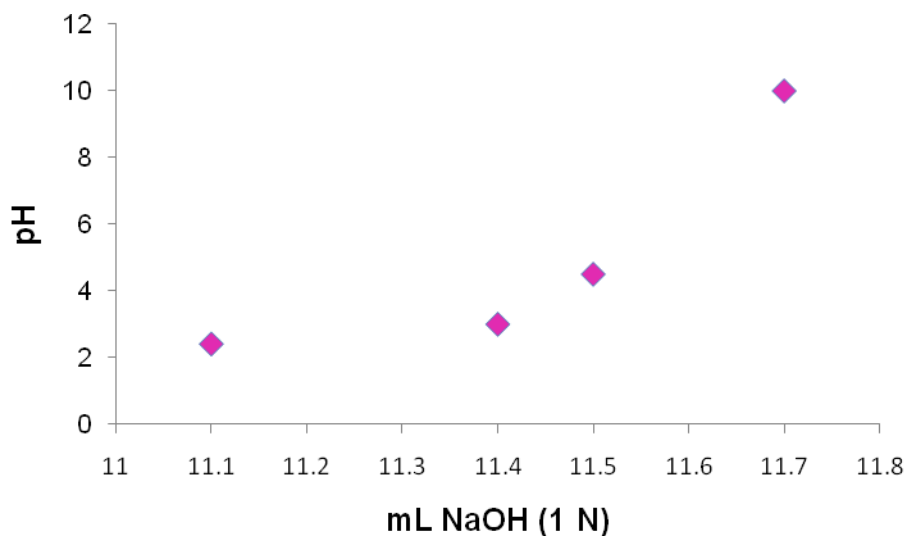
## 12. ANEXOS.

### Anexo 1

#### Poder amortiguador del agua Ciel ®

El pH de los cultivos se tomó con agua Ciel ®, para comprobar que esta no actúa como amortiguador; se realizó una curva de titulación tomando en cuenta que el pH inicial del agua es de 7.2.

El agua Ciel ® se acidificó con HCl hasta un pH de 1 y se tituló con NaOH 1N, tomando en cuenta la cantidad de NaOH requerido para aumentar cada unidad de pH. En la siguiente gráfica se muestran los resultados:

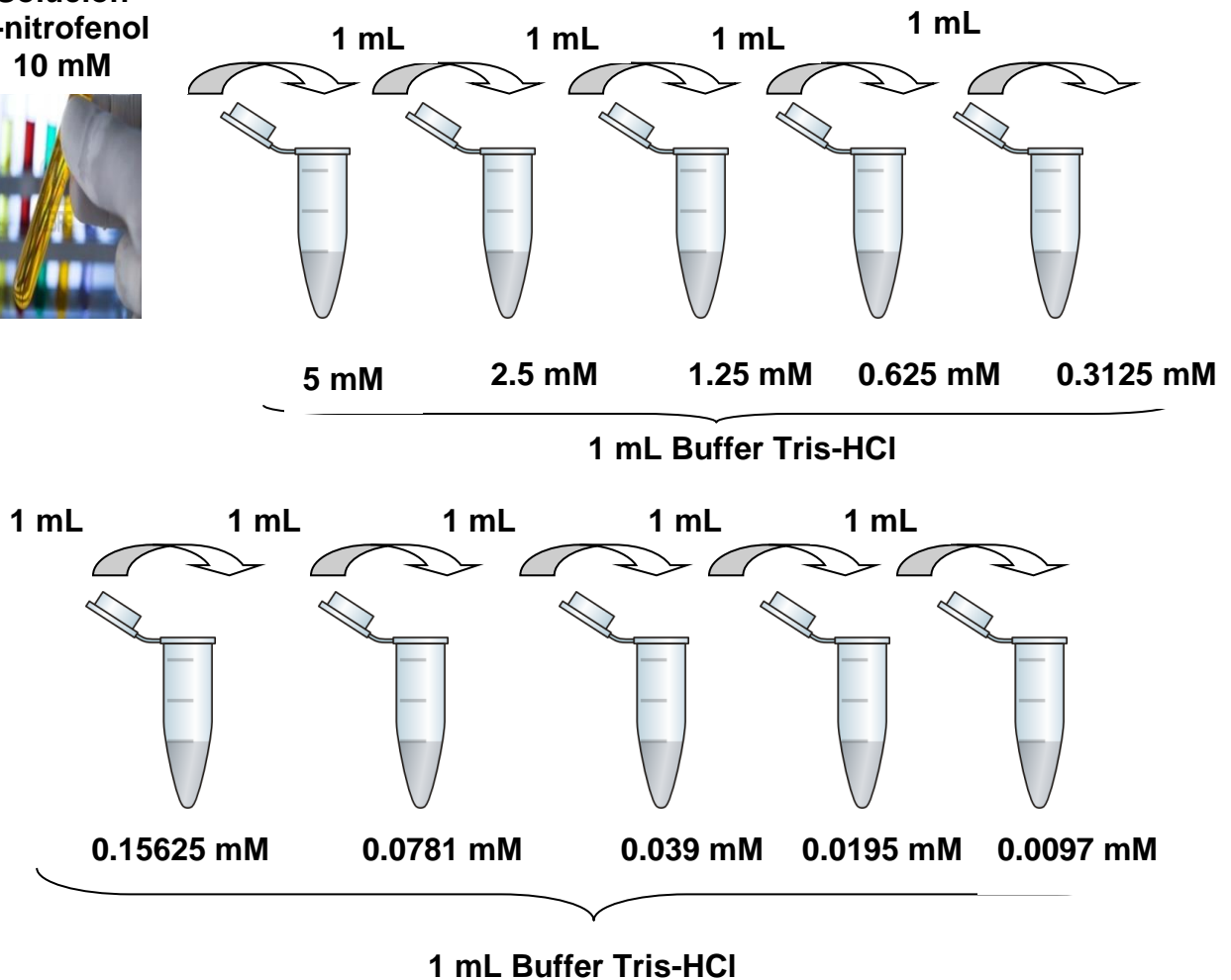
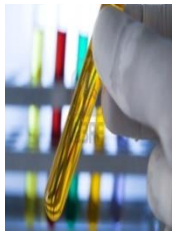


Se observa que se requirieron de 11.1 mL D NaOH 1N para aumentar el pH hasta 2 y posteriormente disminuyó la cantidad de NaOH 1N para llegar hasta pH 10. Con lo cual se puede concluir que el agua Ciel ® no funciona como amortiguador; por lo cual no interfiere con el pH del cultivo.

**Anexo 2****CURVA ESTANDAR p-nitrofenol: Coeficiente de extinción molar**

Se preparó una solución de p-nitrofenol 10 mM en 2-propanol, en tubos eppendorf se agregó 1 mL de buffer Tris-HCl 100 mM 0.25% PVA (pH 8) + 1 mL de la solución de p-nitrofenol 10 mM para diluir la solución a una concentración de 5 mM, posteriormente se prepararon diluciones por duplicado tomando en cuenta el mismo procedimiento hasta alcanzar una concentración de p-nitrofenol de 0.009765 mM (Ver figura), posteriormente se midió la absorbancia a 405 nm con un lector de de microplacas Elisa (ELx 808 BioTek®).

**Solución  
p-nitrofenol  
10 mM**

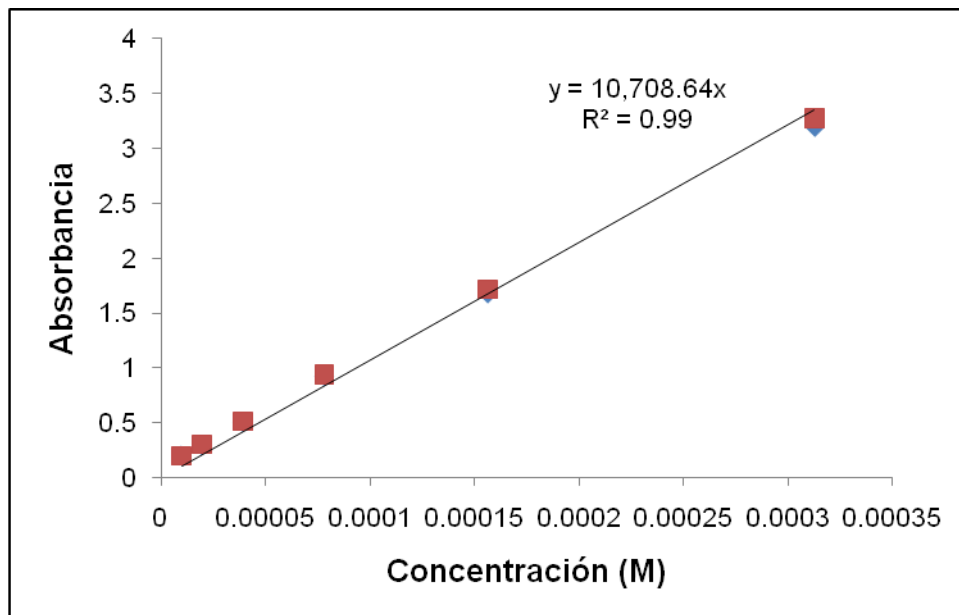




## Resultados

En la siguiente tabla se muestran las concentraciones de p-nitrofenol de las diluciones, así como las lecturas de absorbancia.

Concentración (mM)	Concentración (M)	Absorbancia 1	Absorbancia 2
0.009765625	9.76563E-06	0.203	0.201
0.01953125	1.95313E-05	0.295	0.305
0.0390625	3.90625E-05	0.509	0.512
0.078125	0.000078125	0.925	0.938
0.15625	0.00015625	1.678	1.718
0.3125	0.0003125	3	3.278
0.625	0.000625	4.531	4.494
1.25	0.00125	4.571	4.61
2.5	0.0025	4.723	4.747
5	0.005	4.64	4.681
10	0.01	4.707	4.713



$$\text{Abs} = [\ ] \epsilon L \quad \epsilon = (\text{Abs}) / [\ ] L$$

$$\epsilon = 10,708.64 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

### Anexo 3

Matriz del diseño  $2^{15-10}$  sugerida por el programa Statgraphics® Plus Versión 4.0

Año 1999.

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O
-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	1	-1	-1
-1	1	-1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1	1	-1	1	-1
1	1	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	1	-1
-1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1
1	-1	1	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	1
-1	1	1	-1	-1	-1	1	1	-1	-1	-1	1	1	-1	1
1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1
-1	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	1
1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	-1	1	1
-1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	1
1	1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	1
-1	-1	1	1	-1	1	1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1
1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	-1
-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1
1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1
-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	1
1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1
-1	1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	1	1
1	1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	1
-1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	1	1	-1
1	-1	1	-1	1	-1	1	1	-1	1	-1	1	-1	1	-1
-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1
1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1
-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1
1	-1	-1	1	1	1	-1	-1	1	1	1	-1	-1	1	-1
-1	1	-1	1	1	-1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1
1	1	-1	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	-1	-1	-1
-1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	-1	1
1	-1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1
-1	1	1	1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

**Nomenclatura de factores**

<b>A</b>	pH
<b>B</b>	Humedad
<b>C</b>	Temperatura
<b>D</b>	Inóculo
<b>E</b>	Aceite
<b>F</b>	Lactosa
<b>G</b>	Urea
<b>H</b>	$K_2HPO_4$
<b>I</b>	$MgSO_4$
<b>J</b>	$MnCl_2$
<b>K</b>	$CoCl_2$
<b>L</b>	$CuSO_4$
<b>M</b>	$ZnSO_4$
<b>N</b>	EDTA
<b>O</b>	PVA

**Anexo 4**

Matriz del diseño  $2^{5-1}$  sugerida por el programa Statgraphics® Plus Versión 4.0

Año 1999.

Aceite/PVA	Urea	Lactosa	Oligoelementos	EDTA
1	-1	1	1	-1
-1	-1	-1	-1	1
1	-1	-1	1	1
-1	1	1	-1	1
1	1	1	-1	-1
1	1	1	1	1
-1	1	-1	1	1
-1	-1	-1	1	-1
1	-1	-1	-1	-1
1	-1	1	-1	1
1	1	-1	1	-1
-1	-1	1	-1	-1
1	1	-1	-1	1
-1	1	1	1	-1
-1	1	-1	-1	-1
-1	-1	1	1	1
0	0	0	0	0
0	0	0	0	0

**Anexo 5**

Matriz del diseño 2<sup>4</sup> sugerida por el programa Statgraphics® Plus Versión 4.0 Año 1999.

Humedad	pH	EDTA	Oligoelementos
-1	-1	-1	1
-1	1	-1	1
-1	-1	-1	-1
1	-1	-1	-1
1	1	-1	-1
-1	-1	1	1
1	-1	1	-1
1	-1	-1	1
1	1	1	1
1	1	-1	1
-1	1	-1	-1
-1	-1	1	-1
1	1	1	-1
-1	1	1	1
-1	1	1	-1
1	-1	1	1
0	0	0	0
0	0	0	0
0	0	0	0

**Anexo 6**

Matriz del diseño de segundo orden tipo Box Behnken sugerida por el programa Statgraphics ® Plus Versión 4.0 Año 1999.

Humedad	Oligoelementos	EDTA
0	1	-1
1	-1	0
1	1	0
0	-1	1
0	1	1
0	-1	-1
-1	1	0
-1	0	1
-1	0	-1
1	0	-1
1	0	1
-1	-1	0
0	0	0
0	0	0
0	0	0

**Anexo 7**

Matriz del diseño de segundo orden de Composición central + estrella sugerida por el programa Statgraphics ® Plus Versión 4.0 Año 1999.

Oligoelementos	EDTA
-1	-1
1	-1
-1	1
1	1
-1.41	0
1.41	0
0	-1.41
0	1.41
0	0
0	0
0	0
0	0