

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD



Casa abierta al tiempo

*PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LIPASAS
TERMOESTABLES PRODUCIDAS POR FERMENTACIÓN EN
MEDIO SÓLIDO POR HONGOS TERMÓFILOS*

T E S I S

para obtener el grado de
Maestra en Biotecnología

P R E S E N T A

I.B.I. Ruth Angélica Peña Reyes

Director

Dr. Ernesto Favela Torres

Asesores

Dr. Octavio Loera Corral

Dra. Ma. Ascención Ramírez Coronel

México, D.F., a 4 de enero del 2012.

**La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está
incluida en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del
CONACYT, con la referencia 001465.**

México D.F. a 4 de Enero del 2011.

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

**PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LIPASAS TERMOESTABLES
PRODUCIDAS POR FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO POR HONGOS
TERMÓFILOS**

Que presentó

Ruth Angélica Peña Reyes

COMITÉ TUTORAL:

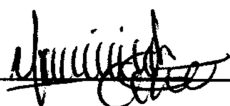
Director: Dr. Ernesto Favela Torres

Asesor: Dr. Octavio Loera Corral

Asesor: Dra. Ma. Ascención Ramírez Coronel

JURADO:

Presidente: Dr. Octavio Loera Corral



Secretario: Dra. Alma Elizabeth Cruz Guerrero



Vocal: Dra. Ma. Ascención Ramírez Coronel



Vocal: Dr. José Isaías Nava Villagómez

Isaias Nava

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Ernesto Favela Torres por todo el apoyo brindado, tanto en lo académico como en lo profesional.

A los doctores Octavio Loera Corral y Ascención Ramírez Coronel por el tiempo dedicado en el desarrollo y revisión de esta tesis.

A los doctores Alma Cruz Guerrero e Isaías Nava Villagómez por su valioso tiempo y comentarios, sin los cuales este documento no tendría la forma actual.

A los integrantes de la Planta Piloto 4 (plantos), los cuales hicieron más placentera y divertida la realización de este trabajo.

Muy en especial quiero agradecer a Luz, Toño, Miguel, Ricardo, Rodrigo, Gregorio, Gaby, Cuapio, Josefa y Dann por todos los buenos momentos vividos durante este tiempo.

A todos mis amigos que, a pesar de la distancia, siempre han estado conmigo y han alegrado mi vida.

A la inteligencia creadora que conduce este mundo mediante la casualidad y el destino.

A mi ángel de la guarda que, desde donde está, me ha cuidado y permitido llegar hasta donde estoy.

A mi mamá por darme las oportunidades para desarrollarme en esta vida.

A mis tíos y primos ya que sin su apoyo y cariño no habría podido concluir este proyecto.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	iv
RESUMEN	ix
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	6
2.1 Lipasas	6
2.1.1 Clasificación EC	7
2.1.2 Estructura	7
2.1.3 Mecanismo de reacción.....	9
2.1.4 Parámetros cinéticos.....	11
2.1.5 Aplicaciones.....	12
2.1.6 Perspectivas.....	16
2.1.7 Fuentes.....	17
2.2 Microorganismos termófilos.....	18
2.2.1 Hongos termófilos	19
2.2.1.1 <i>Thermomyces lanuginosus</i>	21
2.3 Lipasas fúngicas	22
2.4 Enzimas termoestables.....	24
2.5 Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática	27
2.6 Métodos de producción de enzimas.....	32
2.5.1 Fermentación en medio sólido.....	34
3. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS:.....	36
3.1 Justificación	36
3.2 Hipótesis.....	38
2.3 Objetivos.....	38
2.3.1 Objetivo general:.....	38
2.3.2 Objetivos específicos:.....	38
4. MATERIALES Y MÉTODOS	40
4.1 Microorganismos	40

4.2	Reactivación, conservación y propagación de cepas	41
4.3	Preselección de cepas termófilas productoras de lipasas	41
4.3.1	Selección de cepas por su temperatura	41
4.3.2	Velocidad radial.....	42
4.3.3.1	Selección de cepas por la intensidad de su halo de hidrólisis	42
4.3.3.2	Determinación de concentración de Rodamina B.....	43
4.4	Producción de lipasas en fermentación en medio sólido (FMS).....	43
4.4.1	Soporte.....	43
4.4.2	Medio de cultivo.....	43
4.4.3	Producción del inóculo.....	44
4.4.3.1	Inóculo en cajas de Petri	44
4.4.3.2.1	Preparación del pre-inóculo	45
4.4.3.2.2	Inóculo en medio líquido	45
4.4.4	Condiciones de FMS	46
4.4.5	Obtención del biocatalizador	47
4.5	Cuantificación de actividad lipasa	47
4.5.1	Obtención de los extractos enzimáticos	47
4.5.2	Medición de actividad.....	48
4.5.3	Medición de termoestabilidad	49
4.5.4	Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática	49
4.6	Cinética de producción de lipasas.....	51
5.	RESULTADOS Y DISCUSIONES	53
5.1	Selección de cepas por su temperatura.....	53
5.2	Velocidad radial	53
5.3	Bioensayo detección actividad lipasa	55
5.3.1	Selección de cepas por la intensidad de su halo de hidrólisis.....	55
5.4	Efecto de la temperatura sobre el crecimiento en FMS.....	58
5.4.1	Fase lag.....	59
5.4.2	Velocidad específica de producción de CO ₂ (μ)	61
5.4.3	Producción final de CO ₂	63

5.5 Producción de actividad lipasa	66
5.6 Efecto de la temperatura en la estabilidad enzimática	67
5.8 Cinéticas de producción de lipasas por las cepas T1.10aB y 3cV s-3 1.....	71
5.8.1 Cinéticas de producción de lipasas	72
5.8.2 Efecto de la temperatura en la estabilidad	73
5.8.3 Efecto de la temperatura en la actividad enzimática	76
CONCLUSIONES.....	80
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	82
ANEXOS.....	91
A1. Velocidad Radial	91
A2. Cálculo de parámetros cinéticos durante la FMS.....	92
A3. Curva estándar de p-Nitrofenol.....	94
A4. Balance Carbono en el medio Pontecorvo 3(X) para FMS	95
A5. Efecto de la temperatura en la estabilidad enzimática	96

RESUMEN

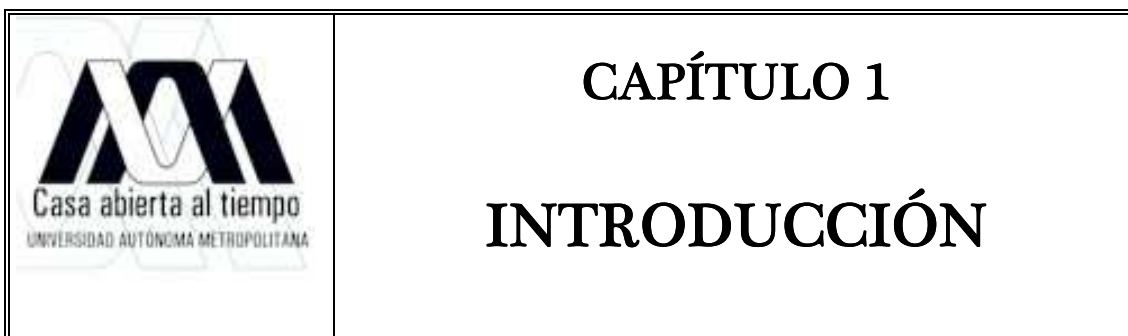
La producción de enzimas es de gran interés debido a la importancia industrial que tienen. En la actualidad se ha incrementado el interés en la producción de enzimas termoestables, que puedan ser empleadas en procesos con temperaturas superiores a 45°C. El objetivo del presente trabajo fue seleccionar una cepa termófila productora de lipasas termoestables y caracterizar el extracto enzimático obtenido por fermentación en medio sólido en términos de actividad y estabilidad en función de la temperatura.

A partir de 29 cepas fúngicas provenientes de la colección de la U de G se inició una preselección basada en el crecimiento a 50°C, tras la cual fueron seleccionadas 27 cepas. Considerando la producción de lipasas en placas de agar (PDA) con Rodamina B se inició una segunda etapa de preselección, en la que el criterio de selección fue la intensidad del color del halo de hidrólisis. En esta etapa se seleccionaron 10 cepas fúngicas que mostraron una mayor intensidad de la coloración de halo bajo la luz UV (fluorescencia) para analizar su capacidad de producción de lipasas termoestables.

A partir de las cepas fúngicas preseleccionadas se evaluó la producción de lipasas en fermentación en medio sólido a tres diferentes temperaturas (40, 45 y 50°C), Se midió la producción de actividad enzimática y se evaluó la estabilidad a 30, 40, 50 y 60°C durante 4 horas, observándose efecto de activación térmica en la mayoría de los extractos.

Después de esta etapa se seleccionaron dos cepas (T1.10aB y 3cV s-3 1) para llevar a cabo cinéticas de producción de lipasas por 120 horas, eligiéndose los extractos producidos a las 72 horas a 40°C para evaluar el efecto de la temperatura en la

estabilidad y en la actividad enzimática (30-60°C); encontrándose que el extracto producido por la cepa 3cV s-3 1 sufre una mayor activación térmica (350%, a una hora de incubación a 60°C) que el extracto producido por T1.10aB (233% a las 3 horas de incubación a 60°C). Utilizando la ecuación de Arrhenius se calcularon los valores de energía de activación (E_a) y Q_{10} para ambos extractos, encontrándose que ambos tienen valores de E_a (22.9 y 17.5 KJ/mol) y Q_{10} (1.23 y 1.20) muy parecidos.



1. INTRODUCCIÓN

Las enzimas son catalizadores complejos, constituidas por proteínas globulares que aceleran la velocidad de las reacciones químicas en un factor de 10^{12} a 10^{20} respecto a las reacciones no catalizadas enzimáticamente. En comparación, los catalizadores no enzimáticos usados en la industria son órdenes de magnitud menos eficaces, trabajando en condiciones favorables para las enzimas. La actividad molar de las enzimas es muy alta: una molécula de enzima puede transformar hasta 600,000 moléculas de sustrato por segundo (**Fennema y Danson, 1993**).

Desde 1867, cuando Wilhelm Kühne acuñó el término enzima derivado del vocablo griego *zyme* (levadura), hasta la fecha, el uso de estos biocatalizadores en la industria ha aumentado en forma considerable; siendo cada vez más numerosos los procesos catalizados por las enzimas, ya que presentan ventajas frente a los catalizadores no biológicos (**Montes y col., 2002**). Un ejemplo de lo anterior lo podemos observar al comparar el comportamiento del mercado de enzimas en Estados Unidos y Europa a través del tiempo. En 1987 dicho mercado alcanzó los 700 millones de dólares, representando las de origen microbiano el 60% de esta cifra. El crecimiento del mercado de enzimas para uso industrial continuó hasta alcanzar en 1998 los 1.6 billones de dólares repartidos en las siguientes áreas: alimentación (45%), detergentes (34%), textil (11%), cuero (3%), papel (1.2%). En el año 2000, el mercado alcanzó los dos billones de dólares, sin incluir enzimas terapéuticas y de diagnóstico. (**Adrio y Demain, 2003**).

Recientemente, el interés en la producción de enzimas se ha centrado en los hongos, debido a que los procesos de producción de enzimas son más sencillos que en aquellos en los que se utilizan bacterias para dicho propósito.

Las enzimas producidas por microorganismos termófilos son capaces de soportar temperaturas altas (20°C por encima de la temperatura de producción). Dicha característica de termoestabilidad es adquirida por factores tales como la secuencia de aminoácidos en la cadena polipeptídica, la cantidad de puentes de hidrógeno que se forman en la cadena y la cantidad de puentes disulfuro formados, entre otros (**Vieille y Zeikus, 2001; Haki y Rakshit, 2003**).

Entre la gran diversidad de enzimas que existen, en los últimos años las lipasas han adquirido gran importancia por su aplicación en diversos procesos industriales (detergentes, farmacia, cosmético, alimentos).

Las lipasas son enzimas quimioselectivas, regioselectivas y estereoselectivas; su disponibilidad es elevada porque pueden ser producidas con altos rendimientos por organismos microbianos (hongos y bacterias); su estructura tridimensional facilita considerablemente el diseño de estrategias en ingeniería de proteínas y no requieren de cofactores. Por tanto, estas propiedades hacen de las lipasas el grupo de biocatalizadores más utilizado en química orgánica para la síntesis de fármacos y químicos finos (**Jaeger y col., 2002**).

El número de lipasas comerciales se ha incrementado considerablemente desde 1980 debido a la demanda de estos biocatalizadores. Anteriormente, las lipasas se utilizaban principalmente en la industria de detergentes y en la modificación de triacilglicéridos


para su empleo en la industria alimentaria. Sin embargo, diversas investigaciones han demostrado que son biocatalizadores muy efectivos para la síntesis de diversos tipos de compuestos (**Bornscheuer y col., 2002**).

Las enzimas se producen principalmente por dos procesos: por fermentación en medio sólido (FMS) y por fermentación en medio líquido (FML). La FMS se utiliza preferencialmente para la producción de enzimas fúngicas ya que, a diferencia de la FML, es un método sencillo y de bajo costo, se obtienen mayores volúmenes de producción y se generan bajas cantidades de agua de desecho, entre otras ventajas (**Mitchell y col., 2000; Pandey, 2003, Sandhya y col., 2005**).

Actualmente el uso de las enzimas está limitado por su estabilidad, por ello la producción de enzimas termoestables puede, en parte, ayudar a resolver este problema, además de que los procesos en donde se utilizarían pueden ser menos costosos (**Banerjee y col., 1999; Haki y Rakshit, 2003**). Actualmente la mayoría de las enzimas se han obtenido de microorganismos mesófilos, con lo cual su aplicación se restringe a sus límites de estabilidad a la temperatura, pH, fuerza iónica, presión y salinidad. Sin embargo, la capacidad que tienen algunos microorganismos de desarrollarse a altas temperaturas puede representar una alternativa en la producción de enzimas con mayor estabilidad a la temperatura (**Lasa y Berenguer, 1993; Van den Burg, 2003**). En este sentido, el estudio de cepas fúngicas termófilas representa una fuente potencial de enzimas con propiedades novedosas para la aplicación en la industria (**Córdova y col., 2003**).

En este trabajo se seleccionaron cepas de hongos termófilos productores de lipasas para caracterizar el extracto enzimático producido por fermentación en medio sólido

a diferentes temperaturas (40, 45 y 50°C). La caracterización consistió en medir tanto la actividad enzimática (lipolítica) como la termoestabilidad de cada uno de los extractos. Por último, también se probó el efecto que tenía la temperatura sobre la actividad.

 <p>Casa abierta al tiempo UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA</p>	<p>CAPÍTULO 2</p> <p>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</p>
---	---

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Lipasas

Las lipasas (triacilglicerol acilhidrolasas) catalizan la hidrólisis y síntesis de lípidos conformados por glicerol y cadenas largas de ácidos grasos; además de catalizar reacciones de remoción de ácidos carboxílicos de una gran cantidad de compuestos. Estas enzimas en solventes orgánicos pueden catalizar varias reacciones que incluyen: esterificación, transesterificación, acilación, aminólisis, alcoholólisis, entre otras (Rohit y col., 2001).

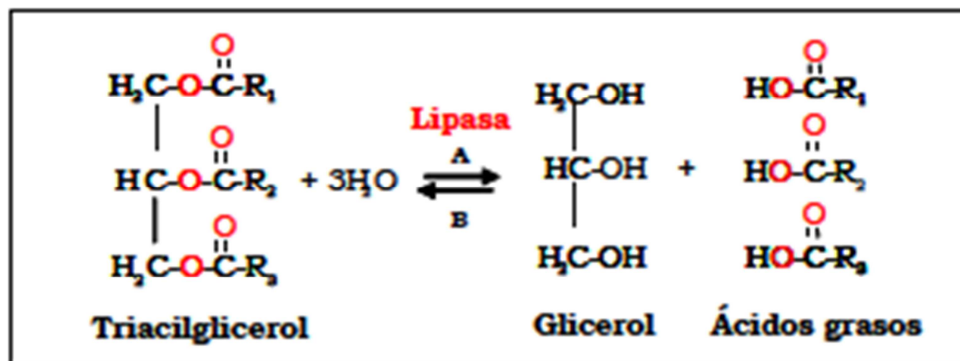


FIG. 1. Mecanismo de reacción de las lipasas.

Actualmente, las lipasas son el grupo de enzimas más estudiadas como catalizadores en reacciones de síntesis, y no menos de un tercio de los trabajos publicados sobre el tema se refieren a ellas; son enzimas que pueden actuar en ambientes no convencionales (no acuosos) como los usualmente requeridos para llevar a cabo reacciones de síntesis.

2.1.1 Clasificación EC

Las lipasas se clasifican de la siguiente manera: EC 3. 1. 1. 3, donde la clase 3 denota que pertenece al grupo de las hidrolasas, y la formación de productos de un sustrato por hidrólisis, la subclase 1 que actúa sobre enlaces éster, la sub-sub-clase 1 que es una hidrolasa de éster-carboxílico. El último dígito denota que se trata de una triacil glicerol lipasa.

2.1.2 Estructura

Son enzimas que catalizan la hidrólisis de acilgliceroles conformados por ácidos grasos de cadenas larga; actúan preferentemente en interfases agua-aceite y, por lo general, disponen de una estructura peculiar en torno al sitio activo conocida como “tapadera”.

Las lipasas presentan el plegamiento típico de las α/β hidrolasas, que consiste en una estructura central formada por 8 láminas β interconectadas por 6 hélices α . El centro activo de estas enzimas, que puede estar cubierto por una tapa en las lipasas auténticas, tiene tres aminoácidos catalíticos cuya posición dentro del plegamiento suele estar conservada: una serina nucleofílica, un ácido aspártico o un ácido glutámico y una histidina. La serina catalítica está generalmente incluida en el pentapéptido conservado Gly(Ala)-Xaa-Ser-Xaa-Gly, el cual forma un giro entre la lámina β_5 y la siguiente hélice α cuya función es estabilizar y orientar la serina nucleofílica, y que es conocido como “*nucleophilic elbow*”. Además, el centro activo contiene otras estructuras que ya sea que intervengan en la estabilización de los intermediarios producidos durante la catálisis o que se encarguen de acomodar el

ácido graso a escindir, y cuyas características condicionan la especificidad del sustrato y la selectividad de estas enzimas (Jaeger y Reetz, 1998).

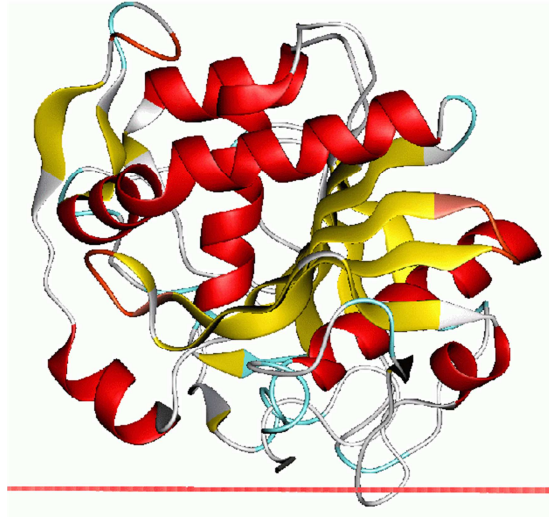


FIG. 2. Lipasa de *Candida antártica*.

Esquema tomado del sitio web de la Pontificia Universidad Javeriana, de Bogotá, Colombia.

Mediante técnicas cristalográficas se han obtenido dos conformaciones diferentes de lipasas. En medios acuosos homogéneos, la lipasa cristaliza con el centro activo totalmente aislado del medio de reacción por una cadena polipeptídica, llamada tapadera (flat o lid) (**Figura 3a**), haciendo inaccesible la entrada de los sustratos (conformación cerrada). Esta cadena polipeptídica presenta en su cara interna una serie de residuos hidrofóbicos que interaccionan con las zonas hidrofóbicas que rodean al sitio activo de las lipasas.

Sin embargo, cuando la enzima se cristaliza en presencia de sustratos de gran tamaño, se obtiene una conformación totalmente distinta, lo que se denomina lipasa abierta, en la cual la tapadera se ha desplazado, interaccionando por medio de puentes salinos,

puentes de hidrogeno etc. con otra zona de la superficie de la lipasa, dejando libre el centro activo de la enzima (**Figura 3b**).

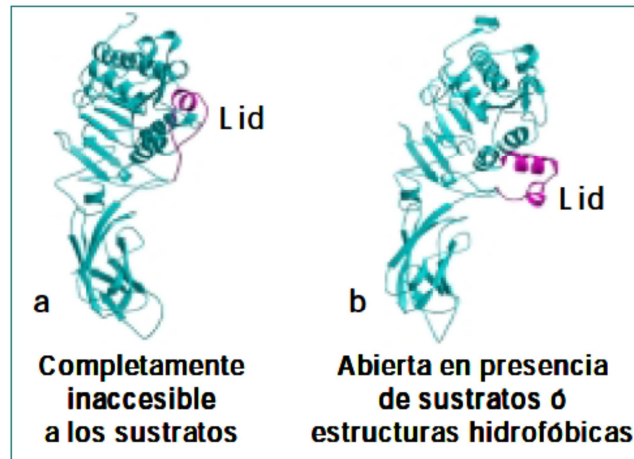


FIG. 3. Esquema de las diferentes conformaciones que presenta las lipasas (**Palomo J, 2003**).

2.1.3 Mecanismo de reacción

Conociendo la conformación que tienen las lipasas, se puede establecer que en el mecanismo catalítico de las lipasas ocurre lo que se denomina *activación interfacial* de lipasas (**Ampon y col., 1994**). Según esta propuesta, en sistemas homogéneos las lipasas se encuentran en una conformación cerrada, con el centro activo bloqueado, las cuales en presencia de interfases hidrofóbicas se adsorben a la misma desplazando la “tapadera” y originando la conformación abierta. Este mecanismo de acción permite a las lipasas actuar en las interfases (**Figura 4**). Evidentemente, dado que el sustrato natural de las lipasas son las grasas y aceites, esta actividad en la interfase es un requerimiento indispensable para la función biológica de las lipasas.

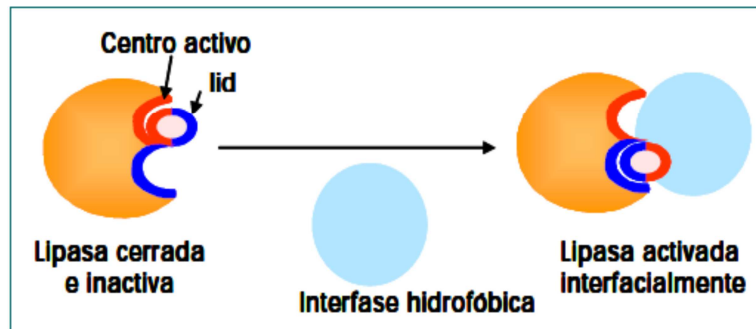


FIG. 4. Activación interfacial de lipasas con interfases hidrofóbicas (Palomo J, 2003).

El mecanismo catalítico de las lipasas se basa en un sistema de intercambio de cargas que consta de 4 etapas (Figura 5). 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 rotura 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 y col., 2002).

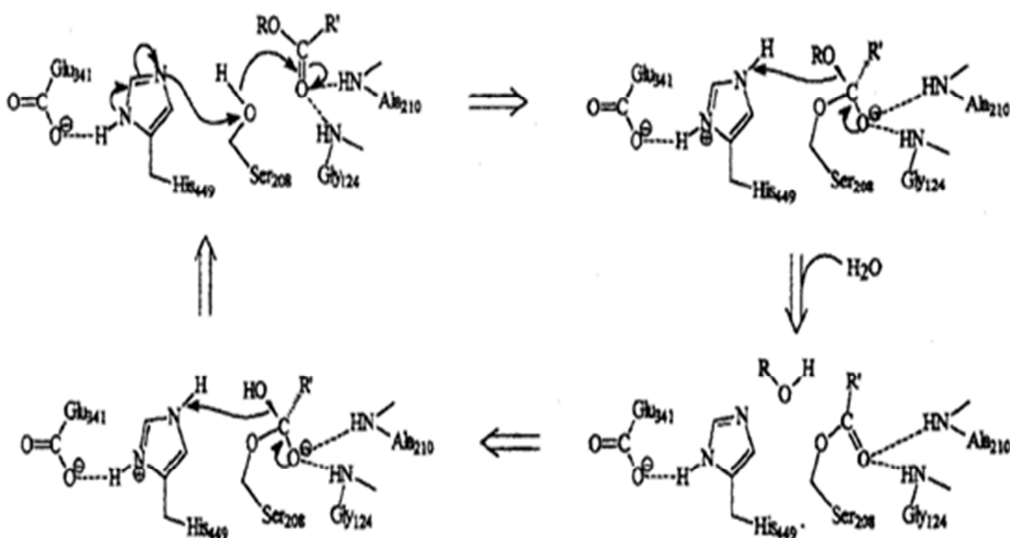


FIG. 5. Mecanismo de acción de lipasas. La numeración de los aminoácidos corresponde a la lipasa de *Candida rugosa*. (Arroyo M, 2000).

2.1.4 Parámetros cinéticos

En la tabla 1 se muestran los valores de K_M y $V_{máx}$ de algunas lipasas, obtenidas de diferentes fuentes. Cabe aclarar que se utilizan diferentes sustratos para medir dichos parámetros, por lo que no se pueden comparar por completo los valores, ya que las lipasas muestran mayor afinidad a ciertos sustratos.

Tabla 1. Parámetros cinéticos de diferentes lipasas en sus formas solubles

Fuente	Sustrato	K_M	$V_{máx}$	Referencia
Páncreas porcino	<i>p</i> -nitrofenil acetato	0.20 mmol/L	ND	De Caro y col. 1986
<i>Thermus</i> sp.	Trioleína	7.1% ($V_{Trioleína} / V_{isooctano}$)	925 mmol / (mg * min)	Silva y col., 1991
<i>Candida rugosa</i> A	<i>p</i> -nitrofenil butirato	0.0392 mmol/L	ND	Rúa y col., 1993
<i>C. rugosa</i> B	<i>p</i> -nitrofenil butirato	> 0.4 mmol/L	ND	Rúa y col., 1993
<i>C. rugosa</i>	Aceite de oliva	703 mmol/L	6032 mmol / (mg * min)	Prazeres y col., 1996
Salvado de arroz	Trioleína	6.71 mmol/L	ND	Bhardwaj y col., 2001
<i>Bacillus</i> sp.	<i>p</i> -nitrofenil laurato	3.63 mmol/L	0.26 μ mol / (mL * min)	Dosanjh y Kaur, 2002
<i>Burkholderia multivorans</i> V2	<i>p</i> -nitrofenil palmitato	1.56 mmol/L	5.62 μ mol / (mg * min)	Dandavate y col., 2009

ND: No determinado. K_M : Constante de Michaelis-Menten para el par enzima-sustrato.

$V_{máx}$: Velocidad máxima de la reacción catalizada por la lipasa.

Las lipasas producidas tanto por *Candida rugosa* A y B son la que presenta un menor valor de K_M (0.039 y >0.04 mmol/L), lo cual nos indica que presentan una mayor afinidad al sustrato utilizado, el cual fue p-nitrofenil butirato. Esta misma cepa, produce una lipasa que muestra poca afinidad al aceite de oliva, al tener un valor elevado de K_M (703 mmol/L).

En cuanto a V_{max} se refiere, es también la lipasa producida por *C. rugosa* empleando aceite de oliva como sustrato, en donde se observa que se alcanza una mayor velocidad de reacción, con un valor de 6032 mmol/ (mg⁻¹min).

2.1.5 Aplicaciones

Las lipasas son parte de la familia de hidrolasas que actúan sobre los enlaces éster-carboxílico. Sus aplicaciones se encuentran en muchas áreas de la biotecnología debido a su capacidad para catalizar diversas reacciones de hidrólisis y síntesis, propiedades enantioselectivas, baja especificidad de sustratos, y estabilidad en diversas condiciones de temperatura y pH (Beys y col., 2005).

El papel fisiológico de las lipasas es hidrolizar triglicéridos en diglicéridos, monoglicéridos, ácidos grasos y glicerol. Además de su función natural de hidrolizar enlaces éster carboxílico, estas enzimas pueden catalizar la esterificación, interesterificación, y las reacciones de transesterificación en medio acuoso. Esta versatilidad hace de las lipasas una fuente de elección para aplicaciones potenciales en los alimentos, detergentes, productos farmacéuticos, industria del cuero, textiles, cosméticos y papel (Houde y col., 2004).

Aprovechando sus excelentes cualidades de selectividad y especificidad en la producción de compuestos quirales enantioméricamente puros (tales como productos farmacéuticos y agroquímicos) y en la resolución cinética de mezclas racémicas, estas enzimas hidrolíticas pueden ser utilizadas en diversas aplicaciones (Hasan y col., 2006). Uno de los principales usos es la producción de intermedios quirales que conducen a la síntesis de compuestos de interés farmacéutico: antiinflamatorios no esteroídicos (ibuprofeno, naproxeno, ketoprofeno y flurbiprofeno) y antihipertensivos (captopril, zefenopril, (S)-propranolol y (S)-atenolol) (Figura 6) (Arroyo, 2000).

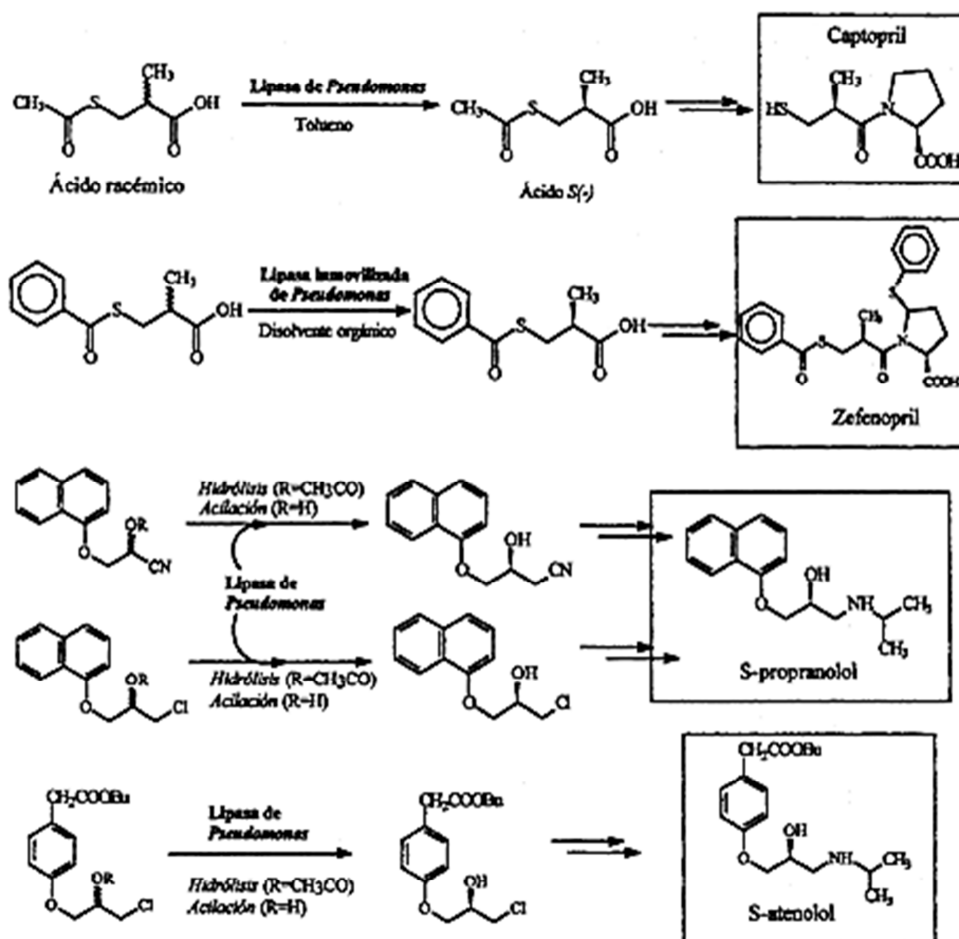


FIG. 6. Resolución de compuestos de interés farmacéutico catalizada por lipasas (Arroyo, 2000).

El interés por dichas enzimas se ha acrecentado en los últimos años debido a sus diversas propiedades catalíticas. Ello ha causado que se conviertan en catalizadores valiosos en diferentes aplicaciones industriales, tales como: aditivos en la formulación de detergentes, en la industria alimenticia para la elaboración de productos dietéticos con bajo nivel de grasas y colesterol, en la industria del papel con el objetivo de eliminar la cera de la pulpa del papel, en la industria farmacéutica en la obtención de moléculas bioactivas, así como en procesos de síntesis química para la obtención de compuestos ópticamente puros (**Hernaiz y col., 1999**) modificación de grasas y otros lípidos por hidrólisis y esterificación (**Kazlauskas, 1994**) .

La principal aplicación de las lipasas se ubica en la industria de los detergentes. Actualmente, también se han incorporado en procesos de la industria alimentaria, para la producción de aromas y en la maduración de quesos; en agroquímica para la producción de insecticidas y otros pesticidas. Sin embargo, su incursión más importante, ha sido en la industria farmacéutica para la resolución de mezclas racémicas de fármacos y sus precursores (naxopreno e ibuprofeno) (**Jaeger y col., 2002**). Otra aplicación importante es la modificación de grasas y aceites, así como la síntesis de biosurfactantes, entre otras (Tabla 2) (**Ángel R, 2007**).

Las lipasas han sido utilizadas anteriormente como agentes terapéuticos en el tratamiento de trastornos gastrointestinales, dispepsias, manifestaciones cutáneas de alergias digestivas, etc. (**Mauvernay y col., 1970**).

Tabla 2. Aplicaciones industriales de lipasas microbianas

INDUSTRIA	FUNCIÓN	PRODUCTO O APLICACIÓN
Detergentes	Hidrólisis de grasas	Eliminación de manchas de grasa
Lácteos	Hidrólisis y modificación de grasa butírica	Desarrollo de sabores en leche, queso y mantequilla
Panadería	Modificación de sabores	Prolongación de la vida de anaquel
Bebidas	Síntesis de aromas	Bebidas frutales
Salsas	Modificación de propiedades organolépticas	Mayonesas, salsas
Alimentos saludables	Transesterificación	Alimentos bajos en grasa saturada
Cárnicos	Desarrollo de sabores, modificación de grasa animal	Embutidos
Grasas y aceites	Transesterificación; hidrólisis	Mantequilla, margarina, aceites vegetales
Químicos finos	Resolución de mezclas racémicas	Construcción de bloques quirales
Farmacéutica	Transesterificación, hidrólisis	Lípidos específicos de fácil digestión
Cosméticos	Síntesis	Emulsificantes
Piel	Hidrólisis	Productos de piel
Papel	Hidrólisis	Papel con mejor calidad
Limpieza	Hidrólisis	Remoción de grasas

2.1.6 Perspectivas

El gran desarrollo de los aspectos relativos a la producción y utilización de lipasas experimentado en los últimos años permite pronosticar que nuevas aplicaciones serán vigorosamente desarrolladas en los próximos años en el campo de la síntesis orgánica. Una de ellas es su uso en la industria de celulosa, con la transesterificación selectiva de fitoesteroles de madera.

Otra aplicación industrial emergente de la transesterificación en disolventes orgánicos con lipasas es para la producción de equivalentes de mantequilla de cacao, sustituto de grasa en leche humana “Betapol”, ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) para uso farmacéutico bajos en calorías, lípidos estructurados y producción de biodisel a partir de aceites vegetales (Jaeger y Reetz, 1998).

Este tipo de hidrolasas pertenece a uno de los grupos de enzimas más importantes que pueden ser utilizados como biocatalizadores en la producción de compuestos biodegradables. El que las lipasas puedan catalizar la síntesis de éster y las reacciones de transesterificación en solventes orgánicos, abrió la posibilidad de producción de poliésteres biodegradables. También los poliésteres aromáticos se pueden sintetizar por biocatálisis con lipasas (Linko y col., 1998).

Las lipasas son también marcadores enzimáticos en el sector médico, pueden ser utilizadas como herramientas de diagnóstico y su presencia o aumento de los niveles puede indicar cierta infección o enfermedad (pancreatitis aguda y lesiones de páncreas) (Lott y Lu, 1991).

En los últimos años, se han desarrollado varios métodos enzimáticos utilizando sondas marcadas con evitar isótopos inestables y peligrosos. Después de analizar distintas enzimas hidrolíticas para adaptarse a las exigencias especiales, lipasas fúngicas resultó ser la más práctica (Kynclova y col., 1995).

2.1.7 Fuentes

Las lipasas son enzimas quimioselectivas, regioselectivas y estereoselectivas; su disponibilidad es elevada porque pueden ser producidas por la mayoría de los organismos (Tabla 3) (Palomo J, 2003).

Tabla 3. Organismos productores de lipasas

Fuente	Organismo
Mamíferos	<i>Homo sapiens</i> (páncreas) <i>Sus scrofa ssp.</i> (páncreas) <i>Equus ferus caballus</i> (páncreas) <i>Cavia porcellus</i> (páncreas)
Hongos	<i>Rhizomucor meihei</i> <i>Humicola lanuginosus</i> <i>Rhizopus oryzae</i> <i>Candida rugosa</i> <i>Aspergillus niger</i>
Bacterias	<i>Chromobacterium viscosum</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Bacillus thermocate nulatus</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i>

Estas enzimas hidrolíticas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza; forman parte de los procesos metabólicos degradativos de algunas plantas y animales, pero generalmente se obtienen con altos rendimientos por organismos microbianos (hongos y bacterias), siendo los últimos una de las fuentes más importantes a nivel industrial porque las producen de forma extracelular, facilitando así su extracción y purificación, un ejemplo típico lo son las lipasas producidas por los hongos *Aspergillus niger* y *A. fumigatus* (Beys y col., 2005; Schmid y Verger, 1998).

2.2 Microorganismos termófilos

Uno de los factores más importantes que influyen en la reproducción y supervivencia de los microorganismos es la temperatura. Para cada microorganismo existe una temperatura mínima, debajo de la cual no tiene lugar la proliferación, una temperatura óptima donde el crecimiento y desarrollo es alto y una temperatura máxima, después de la cual el crecimiento es imposible. A dichas temperaturas se les llama *temperaturas cardinales*. La temperatura de crecimiento de un microorganismo abarca normalmente un margen de 30 grados. De acuerdo a los rangos de temperatura de crecimiento, los microorganismos se pueden clasificar en las siguientes categorías: *psicrófilos* que crecen bien a 0°C y tienen una temperatura óptima de 15°C o inferior, la máxima es de aproximadamente 20°C; *mesófilos* que crecen a una temperatura óptima de 25 a 30°C, siendo la mínima de 15 a 20°C y la máxima de casi 45°C; *termófilos* que pueden crecer a temperaturas de 55°C o superiores, una mínima de 30°C y la óptima de 50°C y *extremófilos* que pueden crecer a 90°C o más, y algunos tienen una temperatura máxima de 100 °C (Lehninger, 1991).

2.2.1 Hongos termófilos

Entre los organismos eucariotas, sólo unas pocas especies de hongos tienen la capacidad de crecer a temperaturas superiores a 45°C. Estas formas incluyen a hongos termófilos y termotolerantes, que arbitrariamente se distinguen sobre la base de su mínima y máxima temperatura de crecimiento (Cooney y Emerson, 1964). Los hongos termófilos tienen una temperatura mínima de crecimiento por encima de 20°C y una temperatura máxima de crecimiento igual o superior a 60°C, con una óptima de 50°C; mientras que las formas termotolerantes tienen un rango de temperatura de crecimiento desde abajo 20°C hasta 50°C.

Tabla 4. Temperaturas cardinales de hongos termófilos y termotolerantes *

Hongo	Topt (°C)	Tmax (°C)	Referencia
<i>Mucor pusillus</i>	35 - 45	55	Maheshwari y col., 2000
<i>Thermomyces lunuginosus</i>	45-50	60	Maheshwari y col., 2000
<i>Thermoidium sulfureaum</i>	45	55	Maheshwari y col., 2000
<i>Thermoascus aurantiacus</i>	40 - 45	55	Maheshwari y col., 2000
<i>Aspergillus fumigatus</i> *	30	50	García, 2007
<i>Penicillium bacillisporum</i> *	30	50	García, 2007
<i>Rhizomucor pusillus</i> *	40	50	García, 2007
<i>Chrysosporium thermophilum</i>	50	70	García, 2007
<i>Dactylomyces thermophilus</i>	50	70	García, 2007
<i>Thermoascus aurantiacus</i>	50	70	García, 2007

Un gran número de hongos termófilos han sido aislados por diferentes investigadores a partir de materiales calientes y otras fuentes (Tabla 4).

El primer hongo termófilo estudiado fue *Mucor pusillus*, el cual fue aislado del pan y descrito hace un siglo por Lint. Tiempo después, Tsiklinskaya descubrió otro hongo termófilo, *Thermomyces lanuginosus*, desarrollado en una papa que había sido inoculada con suelo de jardín. Miehe en 1930 aisló cuatro especies de hongos termofílicos: *Mucor pusillus*, *Thermomyces lanuginosus*, *Thermoidium sulfureum* y *Thermoascus aurantiacus* y comparó las capacidades de los hongos mesofílicos con los termofílicos (Maheshwari y col., 2000), inoculando los hongos individualmente sobre substratos de cultivos puros en frascos estériles y observó que la temperatura final del material depende de la temperatura máxima de desarrollo de los hongos utilizados.

García (2007) aisló un grupo de seis hongos de la corteza del eucalipto, y los incubó a diferentes temperaturas (20-70°C) para poder clasificarlos. Encontró que tres de ellos eran termotolerantes (*Aspergillus fumigatus*, *Penicillium bacillisporum* y *Rhizomucor pusillus*) y otros tres (*Chrysosporium thermophilum*, *Dactylomyces thermophilus* y *Thermoascus aurantiacus*) termófilos.

Los microorganismos termófilos ofrecen mayores ventajas para los procesos biotecnológicos, muchos de los cuales se llevan a cabo rápidamente y con mayor eficiencia a altas temperaturas. También se reducen los costos de los procesos a nivel industrial. En cuanto a sus enzimas, los termófilos son capaces de catalizar reacciones bioquímicas a altas temperaturas y generalmente son más estables que las enzimas

para los mesófilos, prolongando así la vida de anaquel de las preparaciones enzimáticas (Brock, 1998).

2.2.1.1 *Thermomyces lanuginosus*

Es un hongo termófilo ampliamente distribuido (anteriormente fue conocido como *Humicola lanuginosa*). Ha sido aislado en varias partes del mundo de diversos materiales, entre los que sobresale la materia orgánica en descomposición (tallos, raíces, hojas de hierbas, composta y excremento de aves y mamíferos). El pH óptimo de crecimiento de la mayoría de las cepas investigadas es de 6.5. (Singh, 2003).

Es un hongo termófilo, sus cepas crecen generalmente a una temperatura máxima de 60°C, una mínima por arriba de 30°C y una temperatura óptima de crecimiento de 50°C.

Thermomyces lanuginosus está clasificado como un Deuteromycete (Hongos Imperfectos), que es unicelular o septado y presenta reproducción asexual formando aleuriconidias. En varios medios de cultivo, las colonias de *T. lanuginosus* crece entre 2.5 y 5 cm de diámetro en dos días, a 45-50°C. En un inicio, las colonias aparecen de color blanco, con 1 mm de altura, pero pronto se vuelven grises o gris verdoso, a partir del centro de la colonia. Posteriormente la colonia se vuelve marrón, y las colonias oscuras aparecen de color mate oscuro a negro.

En el microscopio se pueden observar conidios inmaduros, con un diámetro de 5.5-12 µm, incoloros y con pared lisa; los cuales se vuelven de color marrón oscuro y globoso

a medida que maduran y forman conidios con pared gruesa y arrugada. Las aleuriosporas son generalmente ramificadas (Cooney y Emerson, 1964).

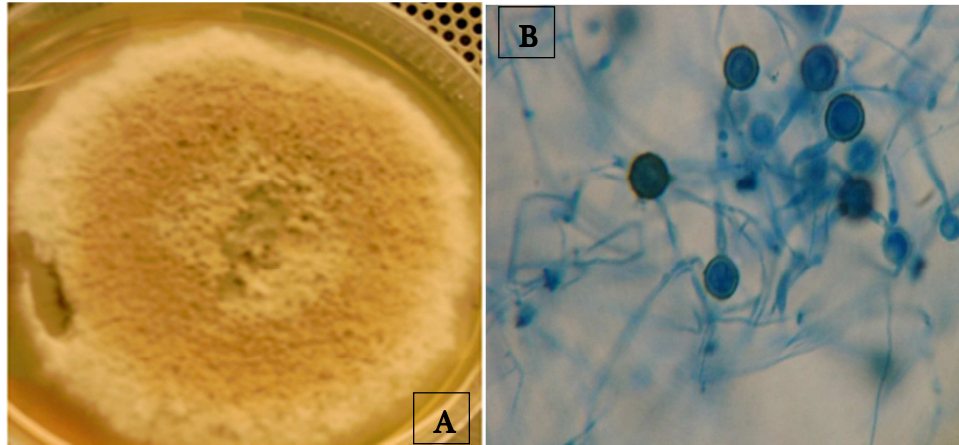


FIG. 7A. Morfología colonial de *T. lanuginosus* después de crecer en PDA por 7 días a 45°C. **B:** Estructura característica de *Thermomyces lanuginosus*, microscopio óptico objetivo 40x.

Este hongo ha sido ampliamente estudiado, encontrándose que puede producir un gran número de enzimas, las cuales son estables a elevadas temperaturas y un amplio rango de pH. *T. lanuginosus* produce altos niveles de xilanasas, mananasas y otras glicosil hidrolasas (Singh, 2000). También produce otras enzimas degradativas tales como α -amilasas, glucoamilasas (Nguyen, 2002), pectinasas (Puchart, 1999), fitasas (Berka, 1998), proteasas (Hasnain, 1992) y lipasas (Berg, 1998).

2.3 Lipasas fúngicas

Los hongos, a diferencia de otros microorganismos, crecen favorablemente en la naturaleza sobre substratos sólidos con bajo contenido de humedad, como trozos de

madera, semillas, raíces, hojas de plantas; en partes secas de animales como piel, huesos y materia fecal (Mitra y col., 1996). Los hongos son los microorganismos que se adaptan mejor a la fermentación en medio sólido y por tal razón la mayoría de preparaciones enzimáticas obtenidas por este método son de origen fúngico.

Por su morfología micelial y actividades enzimáticas, los hongos filamentosos son los microorganismos más empleados para la producción de metabolitos en FMS (Robinson y col., 2001; Durand, 2003). Por otro lado, están mejor adaptados para crecer bajo condiciones combinadas de baja actividad de agua y en presencia de sustratos complejos, siendo ésta otra razón de que la mayoría de las enzimas obtenidas por FMS sean de origen fúngico. Además, los hongos filamentosos tienen la capacidad de penetrar en el soporte, lo que logran por medios mecánicos y enzimáticos, esto con la finalidad de anclarse firmemente a la superficie del mismo y asimilarlo mejor. Dentro de los hongos filamentosos los géneros que más se emplean en la producción de enzimas por FMS son: *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Penicillium*, etc. (Mitra y col., 1996).

Mateos y col. (2006) reportaron la producción de lipasas por el hongo *Rhizopus homothallicus* utilizando bagazo de caña como soporte, lactosa como fuente de carbono y aceite de oliva como inductor a una temperatura de 40°C.

El-Shahed y col. (1998) reportaron que *Aspergillus fumigatus* puede producir dos lipasas, la lipasa A a 30°C y la B a 45°C, ambas utilizando como inductor aceite de coco.

Hernández y col. (2009) reportaron la producción de lipasas utilizando agrolita como soporte inerte con un medio de cultivo que contiene aceite de oliva como inductor y

lactosa como fuente de carbono. El pH inicial fue de 6.5 y se llevó a cabo la fermentación a 45°C durante 20 h.

2.4 Enzimas termoestables

La principal restricción del uso de enzimas como biocatalizadores de procesos radica en su inherente labilidad derivada de su compleja estructura molecular.

La estabilidad de una enzima puede definirse como la capacidad de retener su actividad en una condición ambiental determinada. Esta estabilidad enzimática es afectada por algunos factores ambientales como la temperatura, el pH, fuerza iónica del medio y la presencia o ausencia de ligandos o sustrato, concentración de enzima, otras proteínas en el sistema, tiempo de incubación, la presencia o ausencia de activadores e inhibidores (**Segel, 1968**). Por otra parte debido a su naturaleza protéica se toman en cuenta los siguientes factores a nivel molecular.

Interacción entre:

Puentes disulfuro
Puentes de hidrógeno
Interacciones electrostáticas

Factores conformacionales como:

Estabilidad de α -hélice
Hidrofobicidad interna
Estabilidad entrópica

Protección contra:

Desaminación de carboxilamina
Oxidación de grupos sulfidrilo

(**Nosoh y Takeshy, 1991**).

Como ya se ha explicado las enzimas son ampliamente utilizadas en varios procesos biotecnológicos, muchos de ellos se llevan a cabo en temperaturas elevadas. Las proteínas mesófilas (excepto algunas) no son estables en condiciones de temperaturas altas, ya que gran parte de su estabilidad se debe al microambiente en el cual están expuestas. Una exposición a altas temperaturas acelera la desnaturalización de las proteínas que conforman las enzimas. Para analizar estas características de las enzimas se analiza su termoestabilidad (**Nosoh y Takeshy 1991**).

La termoestabilidad, es el efecto de la temperatura en la estabilidad de una enzima. Esta puede determinarse experimentalmente incubando soluciones enzimáticas a diferentes temperaturas en ausencia de sustrato bajo condiciones constantes, retirando alícuotas a diferentes intervalos de tiempo y determinando la actividad en mezclas de reacción que contienen sustrato. La actividad residual puede ser determinada a pH constante y a la temperatura óptima de la enzima (**Whitaker, 1994**).

Una enzima o proteína se llama termoestable, cuando tiene una larga vida media a una alta temperatura seleccionada. Una temperatura alta debe ser una que se encuentre por encima de los límites termófilo para el crecimiento [$> 55^{\circ} \text{C}$]. La mayoría, pero no todas las proteínas de los termófilos son termoestables (**Turner, 2007**). Razones fundamentales para elegir enzimas termoestables en el bioprocesamiento es su termoestabilidad intrínseca, lo que implica posibilidades para el almacenamiento prolongado (a temperatura ambiente), una mayor tolerancia a disolventes orgánicos (**Kristjansson, 1989**).

Los microorganismos termófilos y las enzimas termoestables han sido temas de investigación que han sido ampliamente estudiados durante las últimas tres décadas,

pero el interés en los organismos termófilos y cómo sus proteínas son capaz de funcionar a temperaturas elevadas se inició en la década de los 60's por el trabajo pionero de **Brock y col. (1986)** (Tabla 5).

Tabla 5. Enzimas termoestables producidas por hongos

Hongo	Enzima	Topt (°C)	% Actividad Residual	Referencia
<i>Fusarium solani</i> FS1	Lipasa	30	80; una hora a 50°C	De Mascena y col, 1999
<i>Humicola lanuginosus</i> Y-38	Lipasa	60	50; una hora a 65°C	Arima y col., 1972
<i>Rhizopus oryzae</i>	Lipasa	35	65; 30 min a 45°C	Hiol y col., 2000
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Lipasa	45	100; 20 h a 60°C	Ibrahim y col., 1987
<i>Chaetomium thermophile</i>	Lacasa	45	50; 50 min a 70°C	Maheshwari y col, 2000
<i>Humicola insolens</i>	β -glucosidasa	60	50; 15 min a 65°C	Maheshwari y col, 2000
<i>Humicola grisea</i> (mutante)	β -1,4 endoglucanasa	50	50; 10 min a 70°C	Maheshwari y col, 2000
<i>Humicola insolens</i>	β -1,4 endoglucanasa	50	50; 5 min a 95°C	Maheshwari y col, 2000
<i>Talaromyces emersonii</i> EG I	β -1,4 endoglucanasa	75 - 80	50; 104 min a 75°C	Maheshwari y col, 2000

En la tabla 5 se puede observar a diferentes hongos productores de enzimas termoestables, los cuales, en su mayoría son hongos termófilos, siendo la única excepción *Fusarium solani* FS1. **De Mascena y col. (1999)** reportaron la producción de una lipasa extracelular empleando este hongo mesófilo mediante fermentación en medio líquido, empleando un medio de cultivo con peptona y aceite de olivo. Después de 72 horas de incubación a 25°C obtuvieron una actividad enzimática de 10.5 U/mL, con un pH óptimo de 8.6 y a una temperatura de 30°C

En el caso de las lipasas termoestables, **Arima y col. (1972)** produjeron una lipasa extracelular del hongo *Humicola lanuginosa* cepa Y-38, la cual fue aislada en Japón. Se utilizó un medio que contiene aceite de soya, almidón, licor de maíz y antiespumante. El tiempo de fermentación fue de 80 h a 45°C. **Hiol y col. (2000)** reportaron la obtención de lipasas por el hongo *Rhizopus oryzae* a 45°C en un tiempo de 4 días. Por su parte, **Ibrahim y col. (1987)** produjeron lipasas con diferentes cepas de *T. lanuginosa* con un medio optimizado que contienen sorbitol, licor de maíz, aceite de silicona como antiespumante y aceite de ricino de ballena como inductor enzimático. Mantuvieron el pH entre 7-8 y llevaron a cabo la fermentación a 45°C por 30 h, obteniendo una actividad de 120 U/mL.

2.5 Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática

De manera similar a las reacciones químicas, la velocidad de las reacciones catalizadas enzimáticamente se incrementa con la temperatura en un factor de 2-3 por cada 10°C. Conforme aumenta la temperatura, se comunica más energía cinética a las moléculas reactantes resultando en la producción de más colisiones por unidad de tiempo (**Segel,**

1968). A temperaturas elevadas el incremento es retardado hasta una máxima velocidad y después de ésta la actividad disminuye, tal y como se puede observar en la **Figura 8**. El decremento en la tasa de actividad es el resultado de la temperatura en la estabilidad de la enzima, causada por la termosensibilidad natural de la proteína (Bisswanger, 2002).

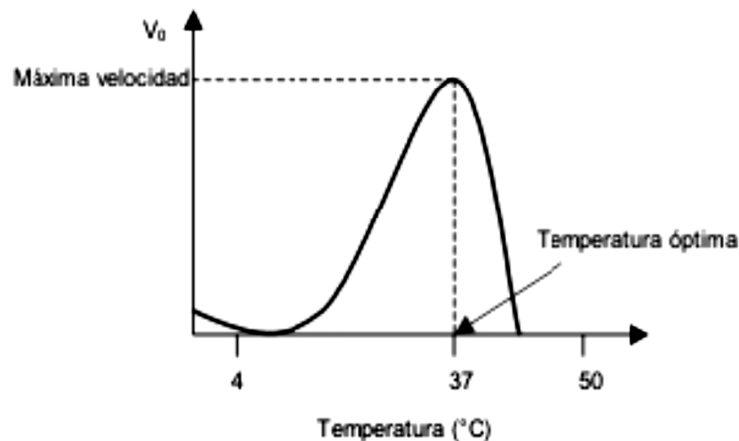


FIG 8. Efecto de la temperatura en la actividad enzimática.

La temperatura óptima de la enzima es un parámetro de la tasa operacional verdadera. A bajas temperaturas, la tasa de formación de producto es constante, pero a temperaturas elevadas disminuye. El resultado de la disminución de la cantidad total de enzima presente es causado por la desnaturalización en función del tiempo y la temperatura. La estabilidad depende de varios factores, entre los cuales se incluyen el pH, fuerza iónica del medio y la presencia o ausencia de ligandos. Las enzimas de bajo peso molecular, compuestas por una cadena polipeptídica que posee enlaces disulfuro son usualmente más estables al calor que las de elevado peso molecular o que las enzimas oligoméricas (Segel, 1968).

En general, las energías de activación para transformar los reactantes a productos (catálisis) en reacciones catalizadas enzimáticamente están en un rango de 25 a 63 kJ/mol y las energías de desactivación están en un rango de 200 a 630 kJ/mol. A temperaturas elevadas, la desnaturalización se lleva a cabo muy rápidamente, debido a que muchas moléculas tienen suficiente energía para estar en estado de desnaturalización. El efecto de la temperatura en la estabilidad puede ser determinado experimentalmente incubando soluciones enzimáticas a diferentes temperaturas en ausencia de sustrato bajo condiciones constantes, retirando alícuotas a diferentes intervalos de tiempo y determinando la actividad en mezclas de reacción que contienen al sustrato. La actividad debe ser determinada a pH constante y a la temperatura óptima de la enzima (**Whitaker, 1994**).

Para muchas reacciones, la expresión de la velocidad puede escribirse como producto de un factor dependiente de la temperatura (**Levenspiel, 2002**). Y para la mayoría de las reacciones se ha encontrado que el factor dependiente de la temperatura se ajusta a la ecuación de Arrhenius (Ec 1 y 2):

$$k = Ae^{\left(-\frac{Ea}{R*T}\right)}$$

(Ec. 1)

$$Lnk = LnA - \frac{Ea}{R} * \frac{1}{T}$$

(Ec. 2)

En donde:

k = Constante de velocidad (h^{-1})

A = Constante para la reacción (h^{-1})

E_a = Energía de activación (kJ/mol)

R = Constante universal de los gases ($\text{kJ/K}\cdot\text{mol}$)

T = Temperatura ($^{\circ}\text{K}$)

El efecto de la temperatura sobre la velocidad de reacción está dado por la energía de activación y por el nivel de temperatura, como se observa en la **Figura 9**, de la cual, se deduce lo siguiente:

- 1) Si se cumple la ecuación de Arrhenius, representando $\ln k$ *versus* $1/T$ se obtiene una recta de pendiente grande sólo si E_a es grande, y pendiente pequeña sólo si E_a es pequeña.
- 2) Las reacciones con energía de activación grande son sensibles a la temperatura; las reacciones con energía de activación pequeña son poco sensibles a la temperatura.

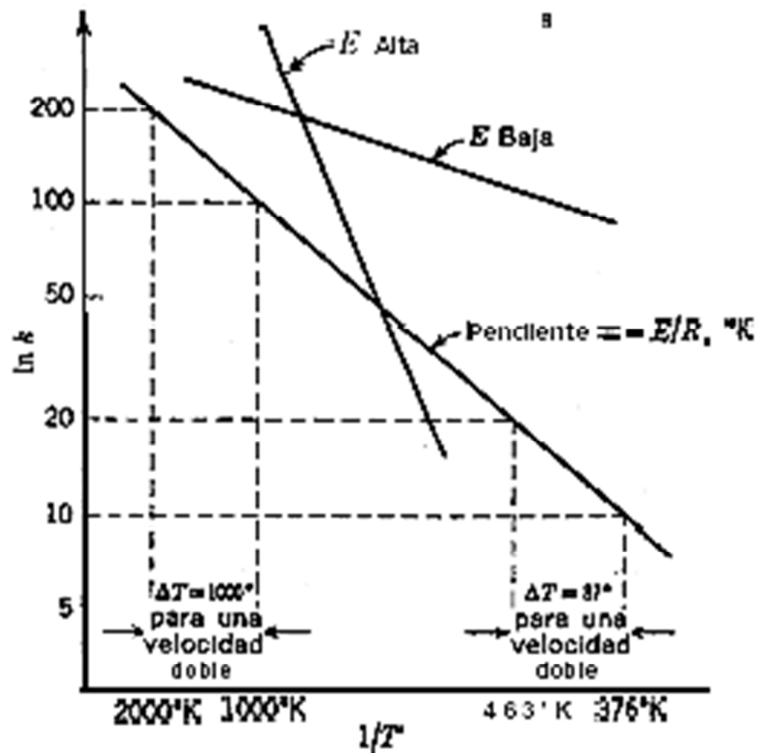


FIG 9. Esquema representativo de la influencia de la temperatura sobre la velocidad de reacción.

(Levenspiel, 2002).

Otro método para cuantificar el efecto que tiene la temperatura en la actividad enzimática es la determinación de Q_{10} , la cual está definida como el incremento en la tasa de reacción cuando se incrementan 10°C la temperatura:

$$Q_{10} = \frac{\text{Tasa de reacción}_{T+10^{\circ}\text{C}}}{\text{Tasa de reacción}_T}$$

(Ec. 3)

El coeficiente de temperatura (Q_{10}) representa el factor por el cual la tasa de una reacción aumenta por cada incremento de 10 grados en la temperatura. La tasa, representa una medida del progreso de un proceso (velocidad a la cual los productos de una reacción se originan, mmol/s). En un experimento típico, el ritmo de los procesos fisiológicos en la investigación se miden a dos temperaturas diferentes T1 y T2 (donde $T2 > T1$), lo que se obtiene son dos tasas de reacción a dos diferentes temperaturas. La Ec. 3 se utiliza para estimar el Q_{10} del proceso. Los valores de Q_{10} son útiles ya que pueden utilizarse para inferir mecanismos del proceso fisiológico investigado. Q_{10} es un coeficiente adimensional, pues es el factor por el cual una tasa cambia, y es una manera útil de expresar la dependencia de la temperatura de un proceso. Si la velocidad de reacción es completamente independiente de la temperatura, el valor del coeficiente será de 1. Para los sistemas biológicos, Q_{10} el valor esta generalmente entre 1.5 y 2.5 (**PhysiologyWeb, 2005**).

2.6 Métodos de producción de enzimas

El método tradicional para la producción de enzimas es la fermentación. Los procesos de fermentación se pueden dividir generalmente en dos: fermentación en medio líquido (FML) y fermentación en medio sólido (FMS). La fermentación en medio sólido se distingue de los cultivos sumergidos por el hecho de que el crecimiento ocurre cerca de superficies de materiales sólidos con bajos contenidos de humedad entre 30 y 80% (**Laukevics y col., 1984**).

Un factor muy importante para definir el medio de producción de enzimas es el costo. La fermentación en medio líquido tiene ciertas ventajas tales como son un buen

control del proceso y fácil recuperación de las enzimas extracelulares, micelio o esporas; sin embargo, los productos están muy diluidos y los extractos enzimáticos son menos estables que los producidos por fermentación en medio sólido. La FMS presenta ciertas ventajas dentro de las cuales destacan la simplicidad del método, bajos costos de producción, alta concentración de enzima y bajas cantidades de líquido residual (**Sandhya y col., 2005**).

Las enzimas pueden ser producidas por fermentación en medio líquido (FML) o sólido, siendo la última, más productiva y económica. Por tanto, en diversos reportes han seleccionado este sistema de fermentación como modelo de estudio para la síntesis de este tipo de biocatalizadores.

Para comprobar el bajo costo que presenta la producción de enzimas por FMS comparada con la FML, **Tengerdy (1996)** llevó a cabo un estudio donde reportó la producción de celulasas por ambos medios, obteniendo que para producir un kg de esta enzima por FML tenía que invertir 20 dólares, mientras que por FMS sólo le costaba 0.2 dólares.

Por otro lado, existen varios estudios que nos comprueban la mayor productividad en FMS contra FL. **Manimaran y col. (2008)** produjeron xilanasas con el hongo termófilo *Thermomyces lanuginosus* usando mazorca de maíz como sustrato por ambos métodos de fermentación. Por FMS obtuvieron 19.32 U/mg mientras que por FL 1.77 U/mg, es decir, 10 veces menor actividad por FML que con FMS.


Resultados parecidos obtuvieron **Mateos y col. (2006)** y **Córdova y col. (1998)** en la producción de lipasas. Los primeros utilizaron *Rhizopus homotallicus* y como sustrato

para la FML licor de maíz, mientras que para la FMS aceite de oliva como inductor y bagazo de caña como soporte. Córdova y Roussos (1998) utilizaron al hongo *Rhizopus miehei* con glucosa como fuente de carbono. Los primeros obtuvieron para la FML 8,600 U/mg contra 10,700 U/mg con la FMS. Los segundos obtuvieron 5.7 U/mL para la FL y 21 U/mL.

2.5.1 Fermentación en medio sólido

La fermentación en sólido (FMS) puede definirse como aquella en la cual, el crecimiento microbiano y la formación de productos ocurre en la superficie de sustratos o soportes sólidos. Este tipo de fermentación incluye a numerosos procesos microbianos naturales bien conocidos, por ejemplo, el crecimiento de microorganismos en el suelo, el composteo, la pudrición de la madera, el cultivo de hongos comestibles y la producción artesanal de alimentos orientales (Cannel y Moo-Young, 1980).

Uno de los usos de los principales usos de la FMS es la producción de productos de alto valor agregado como metabolitos secundarios con actividad biológica, que incluyen antibióticos, factores de crecimiento vegetal, **enzimas**, ácidos orgánicos, biopesticidas, biosurfactantes, combustible biológico, compuestos aromáticos, entre otras aplicaciones (Pandey 2003; Raimbault, 1998).

	<p>CAPÍTULO 3</p> <p>JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</p>
--	---

3. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS:

3.1 Justificación

Es conocido que una gran variedad de microorganismos, como bacterias, hongos, levaduras, plantas y tejidos de animales son capaces de producir lipasas. Con el incremento de la demanda industrial surge la posibilidad de producir este tipo de enzimas de microorganismos exóticos (termófilos, termotolerantes, alcalófilos, etc) que pueden ser utilizados en biocatálisis en la nueva era de la biotecnología (Prakasham y col., 2005).

Los microorganismos extremófilos han despertado un gran interés durante los últimos años, debido a la elevada estabilidad térmica, resistencia a desnaturalizantes químicos y pHs extremos de sus enzimas, que las hacen especialmente adecuadas para su uso en procesos de biotransformación en condiciones extremas de pH, salinidad y temperatura. Los microorganismos termófilos crecen a temperaturas superiores a 45°C, y en algunos casos (hipertermófilos) incluso por encima de 90°C.

El estudio de los hongos para la producción de enzimas se ha basado principalmente en los hongos mesófilos, pero en la actualidad se ha incrementado el interés en la producción de enzimas de microorganismos termófilos, debido a que éstas tienen características de estabilidad de gran interés industrial. Gracias a la termoestabilidad, las enzimas pueden tener un gran número de aplicaciones en la industria de alimentos, farmacéutica, química, petrolera, papelera, peletera y de detergentes. Además, también pueden ser utilizadas en la síntesis de aminoácidos, síntesis orgánica

y para estudiar modelos de termoactividad y termoestabilidad (Johnvesly y Naik, 2001; Germano y col., 2003; Haki y Rakshit, 2003; Sandhya y col., 2005).

La disponibilidad de lipasas termoestables permitiría operar a altas temperaturas, con el lógico incremento de la velocidad de reacción y una más fácil solubilización de los sustratos, aspecto que constituye con frecuencia un factor limitante en algunas aplicaciones de este tipo de enzimas (p.ej. reacciones de síntesis en medios con bajo contenido en agua).

Las lipasas producidas por termófilos se han convertido en candidatos idóneos sobre las procedentes de mesófilos para tales aplicaciones debido a su natural termoestabilidad y actividad en solventes orgánicos. Dicha termoestabilidad es requerida dentro de los procesos biotecnológicos, como en la síntesis enantioselectiva de compuestos, por lo que actualmente existe interés en la obtención de lipasas con características novedosas, activas en altas temperaturas y pHs.

Aunque algunos microorganismos mesófilos son capaces de producir enzimas termoestables, en la actualidad, la mayoría de los reportes sobre este tipo de biocatalizadores emplean microorganismos termófilos debido a que presentan una mayor estabilidad intrínseca; dicha estabilidad puede explicarse por una diferencia en la composición de aminoácidos, lo que le da una mayor estabilidad a las estructuras de los termófilos.

3.2 Hipótesis

Los hongos termófilos seleccionados para este estudio producirán enzimas hidrolíticas extracelulares con actividad lipasa que sean estables y activas a temperaturas superiores a 50°C.

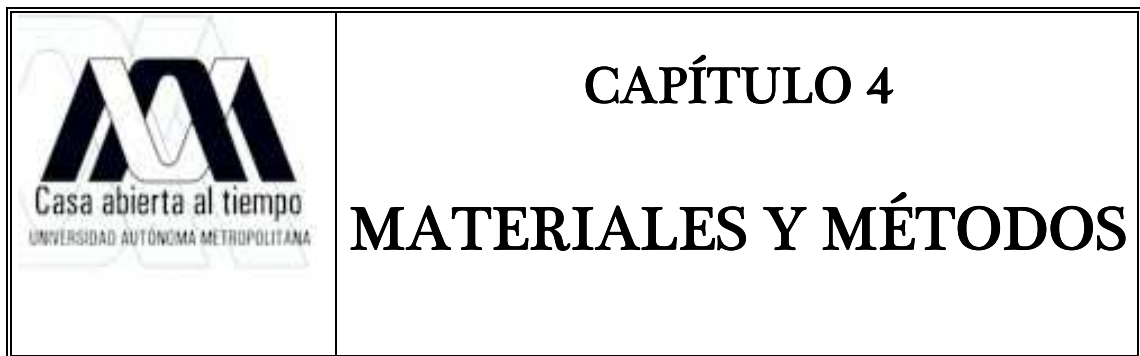
2.3 Objetivos

2.3.1 Objetivo general:

- ✓ Seleccionar al menos una cepa termófila productora de lipasas termoestables y termoactivas.

2.3.2 Objetivos específicos:

- ✓ Seleccionar las cepas capaces de crecer a 50°C en cultivo superficial.
- ✓ Seleccionar las cepas termófilas productoras de lipasas cuyo halo de hidrólisis presenten mayor intensidad.
- ✓ Seleccionar las cepas con mayor velocidad de crecimiento y producción de lipasas en FMS.
- ✓ Determinar el efecto de la temperatura sobre la actividad y estabilidad de las enzimas producidas en FMS por las cepas seleccionadas.



4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Microorganismos

Se utilizaron 29 cepas de hongos termófilos procedentes del laboratorio de Bioprocesos de la Universidad de Guadalajara las cuales fueron aisladas de pasta de coco y de bagazo de caña. Dichas cepas, fueron divididas en dos grupos; el primero conformado por 11 cepas (Tabla 6), las cuales, en estudios previos, fueron caracterizadas tanto morfológica como molecularmente; 7 de ellas identificadas como cepas del género *Thermomyces lanuginosus*; 3 cepas identificadas como cepas del género *Rhizomucor* y una más como cepa del género *Helicosporium*. El segundo grupo de cepas (Tabla 6) conformado por un total de 18 cepas no identificadas y cuya morfología es similar a la presentada por el género *Thermomyces sp.*

Tabla 6. Cepas fúngicas empleadas para la realización de este trabajo.

Cepa	Género	Cepa	Género	
T1BcIV	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	1BcV1 s-2	<i>Thermomyces sp.</i>	
T1.4eB		3 s-2		
T1.6bB		1BdV s-2		3cbIV s-1
T1.10aB		2bV s-2 2		3cV s-3 1
T2.5aB		2cbIII s-1		3V s-1
T2.7cB		2ccIV s-1		3VbIII s-1
T2.9aB		2cc1IV s-1		4V s-1
R1.7cB	<i>Rhizomucor pusillus</i>	2CaIII s-1	4VaIV s-1	
R1.8cB		2V1 s-1	5 s-2	
R2.1B		2VaIV s-2	5BaIII s-2	
H4.4A	<i>Helicosporium sp.*</i>			
Grupo I		Grupo II		

*La cepa 4.4A no fue posible caracterizarla molecularmente, así que solamente fue identificada morfológicamente.

4.2 Reactivación, conservación y propagación de cepas

Para su reactivación las cepas fueron inoculadas por picadura con un palillo estéril en cajas de Petri con 30 mL de PDA e incubadas a 45°C durante 7 días.

La conservación fue llevada a cabo en tubos de ensayo con 15 mL de PDA, inoculando con un palillo estéril e incubando a 45°C por 7 días. Después de este tiempo, se conservaba el tubo en refrigeración a 4°C, durante 15 días.

Para la propagación de cepas, se utilizó un tubo de ensayo para inocular cajas de Petri con 30 mL de PDA mediante picadura con palillo estéril.

4.3 Preselección de cepas termófilas productoras de lipasas

Para llevar a cabo la selección de las cepas productoras de lipasas termoestables, se llevó a cabo una preselección en tres etapas. La primera basada en el crecimiento a 50°C, la segunda a la velocidad radial y la tercera en la producción de lipasas en placa.

4.3.1 Selección de cepas por su temperatura

Para determinar la velocidad radial de crecimiento se utilizaron cajas de Petri desechables con 30 mL de medio PDA. Se inoculó mediante picadura, usando un palillo estéril, a dos temperaturas (30 y 50°C). Las cepas que presentaron crecimiento a 50°C y no a 30°C fueron seleccionadas para determinar su velocidad radial de crecimiento y la intensidad del halo de hidrólisis para la producción de lipasas.

4.3.2 Velocidad radial

Las cepas seleccionadas fueron inoculadas por picadura en cajas de Petri con 30 mL de PDA e incubadas a 50°C.

El crecimiento de los hongos se midió a través del tiempo con una regla graduada (cada 24 h). Se midieron 3 diámetros de la colonia en cada caja de Petri, se graficaron los valores de los radios a través del tiempo y se analizó por regresión la línea recta resultante; las pendientes obtenidas de la ecuación fueron las velocidades de crecimiento radial. Los ensayos se realizaron por duplicado (ANEXO A1).

4.3.3.1 Selección de cepas por la intensidad de su halo de hidrólisis

Se utilizó un medio de cultivo con la siguiente composición (g/L): PDA, 39; aceite de oliva, 20 y Rodamina B 1 mg/mL, 10 mL. Se emulsificó el PDA con el aceite de oliva y se esterilizó a 15 psi durante 15 min. La solución de Rodamina B fue esterilizada por filtración utilizando un filtro de 0.2 μm y fue adicionada a la emulsión cuando ésta se encontraba a una temperatura de 60°C. Se agitó la emulsión y se procedió a llenar cajas de Petri con 30 mL de medio de cultivo (**Kouker y Jaeger, 1986**).

Se inoculó por picadura en el centro con un palillo estéril y se incubó a 50°C hasta que se observó la formación de un complejo fluorescente bajo la luz UV (48-96 h). Se midieron 3 diámetros de la colonia y 3 diámetros de halo en cada caja de Petri. Los ensayos se realizaron por duplicado.

4.3.3.2 Determinación de concentración de Rodamina B

Se realizó un experimento previo, para determinar la concentración de Rodamina B a emplear para observar mas claramente la flourescencia en el halo de hidrólisis. Para esta etapa, se utilizó como control a un hongo que con anterioridad se sabía que era buen productor de lipasas (*Rhizopus homotallicus*). Dicho hongo termoestable, fue crecido en PDA a 30°C durante 7 días para después ser inoculado por picadura en el centro con un palillo estéril, incubándose a 45°C.

4.4 Producción de lipasas en fermentación en medio sólido (FMS)

Se utilizaron 10 cepas para esta etapa, las cuales fueron seleccionadas con la metodología anterior.

4.4.1 Soporte

Para los estudios de producción de lipasas por FMS se usó agrolita con un tamaño de partícula de entre 0.80 y 1.20 mm (tamiz no. 16 y 20). Este soporte inerte se lavó dos veces con agua corriente y una vez más con agua destilada caliente. Se escurrió el exceso de agua y se secó a 60°C por dos días.

4.4.2 Medio de cultivo

El soporte inerte se impregnó con el medio Pontecorvo modificado [3x] cuya composición es la siguiente (g/L): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 21.6; Urea, 6; KH_2PO_4 , 6; KCl, 2.4; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2.4; Extracto de levadura, 2.4; Glucosa, 86.4; Aceite de oliva, 21.6; PVA,

6.48; Solución de elementos traza, 5 mL/L, pH inicial 6.5. El medio de cultivo se emulsificó en una batidora Oster® de 2 velocidades Mod. 2523-13 durante 10 minutos. La composición de la solución de elementos traza es la siguiente (mg/L): Na₂B₄O₇·10H₂O, 100; MnCl₂·4H₂O, 50; Na₂MoO₄·2H₂O, 50; CuSO₄·5H₂O, 250; ZnSO₄·7H₂O, 100; FeCl₃, 85. Para garantizar la solubilidad de las sales se ajustó el pH a 3.5.

4.4.3 Producción del inóculo

Aunque en muchos reportes encontrados en la bibliografía se utiliza como inóculo esporas, en nuestro caso, se utilizó micelio; esto debido a que en experimentos llevados con anterioridad, se demostró que no hay diferencias significativas al utilizar esporas (3×10^7) como micelio (0.125 y 0.5 discos de micelio) como inóculo para FMS, tanto en los parámetros cinéticos como en la actividad lipasa (Peña y col., 2009).

El inóculo se propagó en medio PDA con y sin celofán como se indica a continuación. El inóculo en cajas de Petri se utilizó para las FMS de las 10 cepas pre-seleccionadas, y el pre-inóculo se utilizó para la FMS de las cepas seleccionadas para las cinéticas de producción (T1.10aB y 3cV s-3 1).

4.4.3.1 Inóculo en cajas de Petri

Para la producción del micelio se prepararon 3 cajas de Petri con 25 mL de PDA. Cada caja se inoculó con un disco de micelio de 0.6 cm de diámetro y se incubaron a 45°C. Pasado este tiempo, de la periferia de la colonia se cosecharon discos de micelio de 0.6 cm de diámetro, utilizando como inóculo 1 disco de micelio por cada gramo de agrolita. Para inocular, los discos se suspendieron en 10 mL de medio de cultivo con

10 perlas de vidrio y se agitó en vortex durante 2 min. Finalmente, se mezclaron la agrolita con el medio de cultivo y el inóculo, durante 10 minutos.

4.4.3.2.1 Preparación del pre-inóculo

Para llevar a cabo cinéticas de producción de lipasas, se eligieron dos de las cepas estudiadas, modificándose la preparación del inóculo; esta modificación se llevó a cabo para obtener una mezcla más homogénea, y así lograr mejores resultados.

Se utilizaron cajas de Petri con medio PDA, a las cuales se les colocó una membrana de celofán (#82). En condiciones asépticas se procedió a inocular y se incubaron las cajas a una T de 45 °C durante 7 días.

4.4.3.2. 2 Inóculo en medio líquido

Se prepararon matraces de 125 mL con 25 mL de medio Pontecorvo [1x] modificado, al cual se le adicionó KH_2PO_4 (KH_2PO_4 0.1 mmol - K_2HPO_4 0.01 mmol) para que el medio tuviera un amortiguador que asegurara que el hongo creciera en su rango de pH óptimo y tubos de vidrio con que contenían un lecho de 2.5 cm de perlas de vidrio y 5 mL de medio de cultivo. Posteriormente, las cajas producidas en el pre-inóculo fueron utilizadas para cortar discos de micelio con un horador. Se colocaron 2 discos de micelio en cada uno de los tubos de vidrio previamente preparados y se desagregó el micelio durante 1 minuto en un vórtex; la suspensión producida fue utilizada para inocular cada uno de los matraces de forma independiente cuyo

volumen de medio fueron 25 mL. Finalmente, los matraces inoculados fueron incubados a una temperatura de 40°C, con agitación a 150 rpm durante 72 horas, manteniendo una atmosfera húmeda. Después de este tiempo, este cultivo en medio líquido fue utilizado como inóculo para la fermentación en medio sólido. Posteriormente, se mezclaron la agrolita con el medio de cultivo y el inóculo, durante 10 minutos.

4.4.4 Condiciones de FMS

El soporte inerte impregnado con el medio de cultivo y el inóculo, se empacó en columnas de fermentación ($\varnothing_i = 2.2$ cm y $L = 25$ cm); mismas que se incubaron a tres temperaturas (40, 45 y 50°C) durante 72 horas bajo las siguientes condiciones: Tasa de aireación, 60 mL/min; pH_i, 6.5; Humedad inicial, 65%; 20 g de materia húmeda por columna; 1.85 mL medio de cultivo por gramo de soporte y con un tamaño de inóculo de 1 disco de micelio por cada 3 gramos de agrolita, para las cajas Petri, y 10%(p/v) para el inóculo en medio líquido.

El crecimiento del cultivo se monitoreó de manera indirecta a través de la producción de CO₂, por lo cual, las columnas de fermentación fueron conectadas a un dispositivo descrito por **Saucedo-Castañeda (1991)**, y así poder obtener los parámetros cinéticos de la fermentación (ANEXO A2). Con cada cepa se trabajó por duplicado, a las tres temperaturas.

4.4.5 Obtención del biocatalizador

Para la primera etapa, en donde se analizaron 10 cepas, la fermentación fue detenida a las 72 horas. Para el caso de las cinéticas, la fermentación duró 120 horas, tomándose muestras cada 24 horas (duplicado). Las columnas fueron colocadas en refrigeración por 30 minutos, para detener el crecimiento fúngico. Pasado este tiempo, se determinó el pH adicionando 10 mL de agua comercial (marca Aguafiel[®]) a 1 gramo de materia húmeda fermentada, se agitó en vórtex y se midió el pH.

Para determinar el contenido de humedad en las muestras se usó una termobalanza.

Después de llevar a cabo la extracción enzimática, para la conservación de los biocatalizadores, y su posterior utilización, la materia fermentada fue deshidratada a 30°C en una corriente de aire (10 L de aire seco por minuto por columna) hasta sequedad, para así poder obtener los biocatalizadores.

4.5 Cuantificación de actividad lipasa

4.5.1 Obtención de los extractos enzimáticos

Antes de deshidratar los biocatalizadores se procedió a hacer la extracción, para después medir actividad enzimática.

Se vació el contenido de cada columna en bolsas de polietileno, se mezcló el contenido para homogeneizarlo. Se colocaron 2 gramos en un tubo Corning de 50 mL y se les

adicionó 10 mL de agua comercial (marca Aguafiel[®]). Se agitó en vortex durante 1 minuto y el sobrenadante fue colocado en tubos Eppendorf para ser centrifugados 3 minutos a 10 mil rpm. El sobrenadante fue recolectado (extracto enzimático) y conservado a 4°C.

4.5.2 Medición de actividad

Se utilizó el método de hidrólisis de p-nitrofeniloctanoato (pNPO) (Mateos y col., 2006) leyendo la absorbancia en un lector de microplacas Elisa (ELx 808 BioTek[®]).

Se preparó una solución 10 mM de p-nitrofenol octanoato (pNPO) en 2-propanol, con la cual se llevó a cabo una mezcla 1:10 con buffer Tris-HCl 100 mM y 0.25% de PVA (pH 8). El medio de reacción para la determinación de actividad enzimática contiene 50 μ L del extracto enzimático y 100 μ L de con la solución pNPO-buffer.

Se registró la liberación de p-nitrofenol 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 μ mol 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 ($\epsilon = 3057 \text{ cm}^2 \text{ mmol}^{-1}$) (ANEXO A3).

Para realizar el cálculo de actividad lipolítica sobre ésteres de pNP se obtiene la curva de reacción, cuya pendiente (aumento en absorbancia a 405nm por min) se emplea para calcular la actividad.

4.5.3 Medición de termoestabilidad

La termoestabilidad fue medida incubando los extractos enzimáticos a cuatro diferentes temperaturas (30, 40, 50 y 60°C) durante 4 horas, tomando muestra cada hora. La actividad enzimática fue medida por el método de hidrólisis de p-NPO (Mateos y col., 2006). Para este paso, se utilizó el extracto enzimático producido a la temperatura en donde se presenta mayor actividad lipasa (40°C).

4.5.4 Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática

Para analizar el efecto que tiene la temperatura sobre la actividad enzimática, se utilizó una metodología diferente. Se empleó un equipo llamado pH-stato (Mettler DL21 titrator), con el cual, se mide la actividad lipolítica se determina midiendo los ácidos grasos liberados durante 10 minutos de reacción, a partir de una emulsión de un triglicérido (trioctanoína, en este caso), utilizando NaOH 0.1 N como valorante.

Los extractos obtenidos de las cinéticas de producción de lipasas de las dos cepas seleccionadas, fueron los utilizados para evaluar el efecto de la temperatura en la actividad. La variación de la temperatura de reacción fue en intervalos de 10°C, de 30 a 60°C.

Se preparó un buffer Tris-HCL 0.3 mM (pH 6.9) y una solución 1:10 de goma arábiga al 10% y trioctanoína; esta última se emulsificó con una batidora *Oster* de 2 velocidades Modelo 2523-13 durante 10 minutos. La mezcla de reacción consta de 6 mL de la emulsión con 24 mL de buffer Tris-HCl pH 6.9 para dar un volumen final de

30 mL, los cuales se colocan en el reactor del pH-stato (Mettler DL21 titrator). Dicho reactor se mantiene a temperatura constante con un baño de agua. Antes de comenzar la titulación se fija el pH en 7.0 con el valorador automático. Se inicia la reacción agregando 100 mg del biocatalizador finamente molido a la mezcla de reacción, manteniéndose constante el pH del medio con la adición continua de NaOH 0.1N durante 5 minutos.

Se obtiene una curva de valoración graficando la cantidad de valorante añadido en función del tiempo. Cada ensayo se realizó por triplicado.

Se calcula la actividad lipolítica a partir de la siguiente ecuación:

$$A \text{ (U/g)} = \frac{\text{Vol. NaOH 0.1N gastado (mL)}}{\text{tiempo (min)}} \times \frac{0.1 \text{ mol NaOH}}{1000 \text{ mL}} \times \frac{1 \times 10^6 \text{ } \mu\text{mol NaOH}}{1 \text{ mol}} \times \frac{1}{\text{biocatalizador (g)}}$$

Donde A, es la actividad de la enzima, expresada en Unidades lipasa por gramo de biocatalizador en polvo (U/g), donde una unidad enzimática es definida como la cantidad de enzima necesaria para liberar un μmol de ácido graso por minuto.

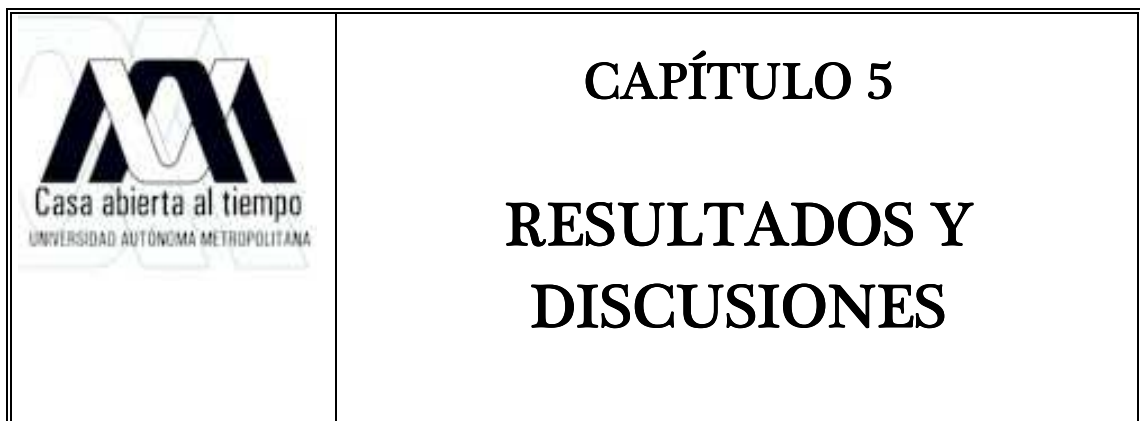
Con los datos obtenidos se obtuvieron los valores de Energía de Activación (E_a) y Q_{10} para los extractos enzimáticos. Para el cálculo de E_a se utilizó la ecuación de Arrhenius, en donde se graficó el logaritmo natural de la actividad enzimática vs el inverso de la Temperatura ($^{\circ}\text{K}$), despejándose la E_a de la pendiente.

El valor de Q_{10} se determinó relacionando las tasas de reacción a dos distintas temperaturas con 10°C de diferencia (50 y 60°C).

4.6 Cinética de producción de lipasas

Para llevar a cabo los estudios cinéticos de producción de lipasas en FMS se eligieron dos de las 10 cepas estudiadas, la 3cV s-3 1 y T1.10aB. Las cinéticas tuvieron una duración de 120 horas y se muestreo cada 24 horas. Se realizaron cinéticas de producción a tres temperaturas (40, 45 y 50°C). Las condiciones de la FMS fueron las mismas que las reportadas anteriormente, con la única diferencia en la preparación del inóculo (pre-inóculo en medio líquido), esto, con el fin de homogeneizar el contenido de las columnas y obtener mejores resultados.

A los extractos enzimáticos producidos se les midió actividad enzimática, para obtener la cinética de producción de lipasas. Además se evaluó la termoestabilidad del extracto enzimático y el efecto de la temperatura en la actividad enzimática.



5. RESULTADOS Y DISCUSIONES

A continuación se presentan los resultados obtenidos durante el trabajo experimental con los cuales, se cubren los objetivos planteados para este trabajo. También se presenta una discusión sobre los mismos.

5.1 Selección de cepas por su temperatura

Se inició con una preselección de cepas, para posteriormente llevar a cabo la producción y caracterización del extracto enzimático. La primera etapa de preselección se basó en el crecimiento a 30 y 50°C.

De las 29 cepas evaluadas en este trabajo todas crecieron a 50°C y solo tres lo hicieron a 30°C (1.7cB, 1.8cB y 2.1B, las cuales fueron identificadas molecularmente como *Rhizomucor pusillus*). Éstas 3 cepas fueron descartadas para nuestra investigación debido a que son consideradas como termoestables, y el trabajo está enfocado solamente el estudio de cepas de hongos termófilos. Así que nos quedamos en su mayoría con las cepas pertenecientes a *Thermomyces lanuginosus*, el cual es considerado como un hongo termófilo.

5.2 Velocidad radial

Los resultados de velocidad radial a 50°C de las cepas seleccionadas se presentan en la **Figura 10**. La cepa H4.4A es la que tiene una velocidad radial más baja (0.3 cm/d),

mientras que las cepas 3 s-2 y 5 s-2 son las que mayor velocidad radial presentan (1.21 y 1.24 cm/d respectivamente). De las 26 cepas evaluadas, 12 presentan una velocidad radial mayor a la del promedio (0.9 cm/d).

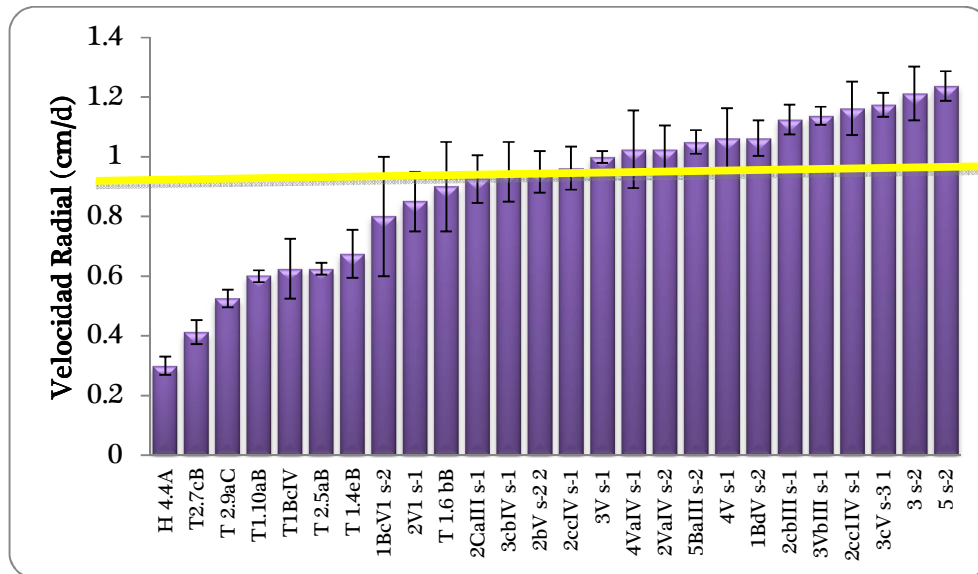


FIG. 10. Velocidad Radial cepas termófilas a 50°C en PDA.

(La barra amarilla indica el valor promedio)

García (2007) reportó la velocidad radial de hongos tanto termófilos como termotolerantes, crecidos en PDA a 50°C. Par el caso de los hongos termotolerantes (*Aspergillus fumigatus* y *Penicillium bacillisporum*) se obtuvieron valores de velocidad radial de 0.46, 0.24 y 4.85 cm/d, mientras que para los hongos termófilos (*Chrysosporium thermophilum*, *Dactylomyces thermophilus* y *Thermoascus aurantiacus*) se obtuvieron valores de 1.63, 3.04 y 12.82 cm/d. Los valores obtenidos en este trabajo, solo son mayores a los obtenidos por *A. fumigatus* y *P. bacillisporum*, mientras que para el resto de los ejemplos la velocidad de crecimiento radial es menor.

Todas las cepas fueron usadas para determinar el índice de potencia de producción de lipasas.

5.3 Bioensayo detección actividad lipasa

En esta etapa, las 26 cepas preseleccionadas fueron inoculadas por la técnica descrita en la metodología, midiéndose tanto halos de hidrólisis como el de la colonia, utilizando una técnica cualitativa para detectar a aquellas cepas con capacidades lipolíticas.

5.3.1 Selección de cepas por la intensidad de su halo de hidrólisis

Para realizar esta prueba, se tuvieron varios problemas para poder observar claramente la formación del halo. En un inicio se esterilizaban todos los componentes del medio en autoclave. Se probaron diferentes concentraciones de Rodamina, sin observar ningún cambio. Después de una extensa revisión bibliográfica, se llegó a la conclusión de que la Rodamina B es termolábil, por lo que tenía que ser esterilizada por separado del resto de los componentes de la emulsión.

Se probaron tres concentraciones de sol. Rodamina 1 mg/mL, para ver con cual se observaba mejor la formación del halo de hidrólisis: 1, 10 y 100 mL/L de medio selectivo. Se utilizó una cepa control para montar esta técnica (*Rhizopus homotallicus*). (**Figura 11**). Al observar las cajas bajo la luz UV, se encontró que la concentración de 10 mL era con la cual se observaba más claramente el halo, por lo que se escogió para llevar a cabo la prueba con las 26 cepas estudiadas.

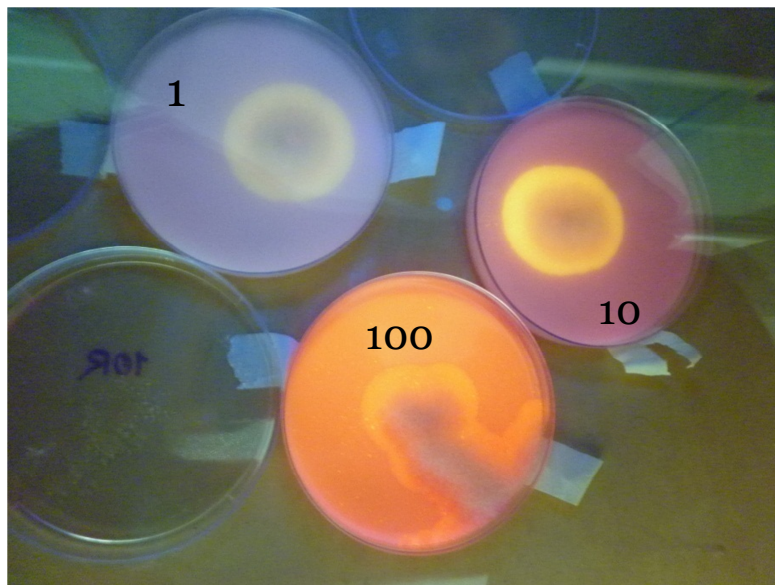


FIG 11. Diferentes concentraciones de Rodamina B para detección de actividad lipasa

Para observar los halos de hidrólisis las 26 cepas tuvieron que ser incubadas a 50°C por un período de 96 h. Los resultados obtenidos nos permitieron clasificar las cepas en tres grupos (Tabla 7):

1. Aquellas que presentaron un halo con mayor intensidad de color (coloración naranja). Son un total de 10 cepas (**Figura 12A**).
2. Las que presentan halo, pero que este no es tan intenso (color amarillo), ni definido, ni se encuentra alrededor de toda la colonia. Son un total de 13 cepas (**Figura 12B**).
3. Las que no presentan formación de halo de hidrólisis. Solo tres cepas forman parte de este grupo (**Figura 12C**).

En este caso, no se presentan resultados de Índice de Potencia (IP, relación del diámetro de halo de hidrólisis y diámetro de la colonia) debido a que el diámetro del

halo no fue mayor que el de la colonia en ninguno de los dos casos, aunque el crecimiento en las orillas es menor (micelio muy fino); por lo tanto no se puede hablar de un valor de IP mayor a 1. A pesar de esto, se encontraron diferencias en cuanto a la intensidad de la coloración del halo. De acuerdo con los resultados obtenidos, así como lo reportado por **Kouker y Jaeger (1986)**; por lo que se eligió a las cepas que presentaron una coloración naranja (Grupo 1).

Tabla 7. Clasificación de las cepas por su actividad lipasa. Grupo 1: cepas que presentan halo con color más intenso, Grupo 2: cepas que presentan halo con coloración menos intensa y Grupo 3: cepas que no presentaron halo.

GRUPOS	1	2VaIV s-2 H4.4A	3 s-2 T1.10aB	3cV s-3 1 T1.6bB	4VaIV s-1 T2.5aB	5BaIII s-2 T2.9aC
	2	1BcV1 s-2 2cc1IV s-1	1BdV s-2 2V1 s-1 T1.4eB	2bV s-2 2 3cbIV s-1 2ccIV s-1	2CaIII s-1 3VbIII s-1 5 s-2	2cbIII s-1 4V s-1
	3		T1BcIV	T2.7cB	3V s-1	

Una vez seleccionadas las cepas con mayor intensidad de hidrólisis en los bioensayos en cultivo superficial se procedió a evaluar la producción de lipasas por FMS. En estos estudios se evaluó la producción de CO₂ en línea y se determinó la actividad enzimática después de un tiempo de cultivo de 72 horas.

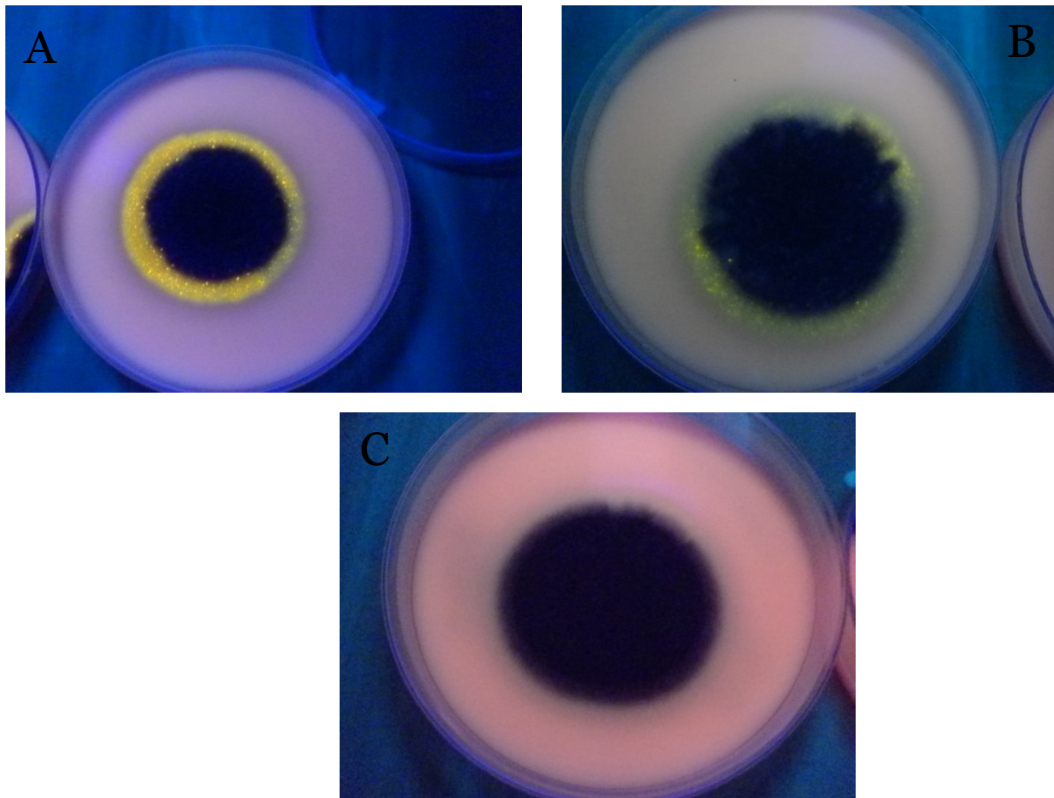


FIG 12. Halo de hidrólisis de diferentes cepas termofilas a 50°C durante 96 h. **A.** Cepa que presenta una mayor intensidad en su halo de hidrólisis. **B.** Cepa que presenta una intensidad menor en su halo de hidrólisis. **C.** Cepa que no presenta halo de hidrólisis.

5.4 Efecto de la temperatura sobre el crecimiento en FMS

Se determinó el efecto de la temperatura sobre el crecimiento y la producción de lipasas por las 10 cepas seleccionadas. Para ello, se realizaron cinéticas de producción de CO₂ en FMS. Los valores de producción de CO₂ fueron usados para la estimación de variables asociadas al crecimiento. Se calculó la máxima producción de CO₂ (mgCO₂/gms), la tasa específica de producción de CO₂ (μ) (h⁻¹) y la duración de la fase lag (h).

5.4.1 Fase lag

Esta fase es un período de adaptación, cuando el inóculo es llevado de un ambiente a otro, en ella, los organismos sufren una reorganización tanto en su velocidad de crecimiento como en sus constituyentes macromoleculares.

Dicho parámetro fue calculado en base a los datos de velocidad de producción de CO₂ vs tiempo, realizando una regresión lineal utilizando los valores hasta el primer máximo de la velocidad de producción de CO₂.

Para la mayoría de las cepas, la duración de la fase lag a las tres temperaturas estudiadas dura entre 4-8 horas, siendo la cepa H4.4A la que presenta valores de tiempo lag de 8 h al ser incubada a 40°C y alrededor de 20 h al ser incubada a 45 y 50°C (Figura 13).

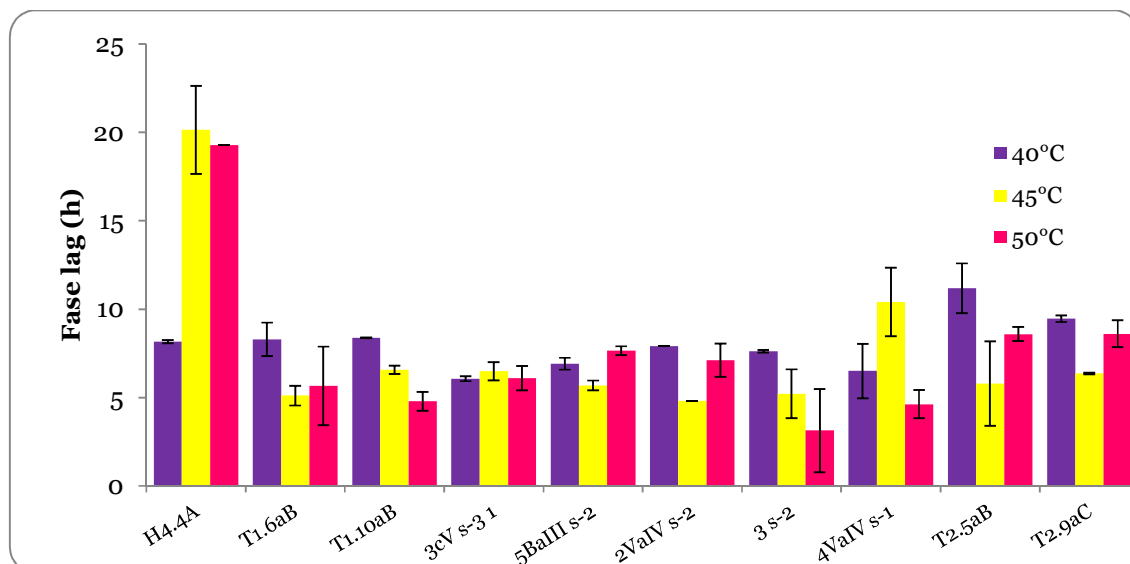


FIG. 13. Fase de adaptación de las 10 cepas termófilas a 40, 45 y 50°C durante la FMS, utilizando aceite de oliva como inductor, 65%*H*, pH=6.5 y aireación de 60 mL/min.

Para las cepas T1.10aB y 3s-2, la fase de adaptación fue disminuyendo conforme la temperatura fue aumentando. Esto indica una mejor adaptación de dichas cepas a su nuevo ambiente con temperaturas elevadas.

Las cepas H4.4A, 3cV s-3 1 y 4VaIV s-1 presentan una mayor fase lag a 45°C, mientras que el resto de las cepas a la misma temperatura presentan el menor tiempo de adaptación.

A continuación se presentan las cepas divididas en cuatro grupos dependiendo de la duración de la fase lag en función de la temperatura. En el **grupo I** se encuentran las cepas que presentan una menor fase lag a 40°C, el **grupo II** las que tienen una fase de menor duración a 45°C y en el **grupo III** aquellas que a 50°C su fase lag es (**Tabla 8**).

Tabla 8. Clasificación de las cepas por el valor de su fase lag en función de la temperatura

<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>
H4.4A (8.2 h)	5BaIII s-2 (5.7 h)	3 s-2 (3.1 h)
3cV s-3 1 (6.1 h)	2VaIV s-2 (4.8 h)	4VaIV s-1 (4.6 h)
	T1.6bB (5.1 h)	T1.10aB (4.8 h)
	T2.5aB (5.8 h)	
	T2.9aC (6.4 h)	
	3cV s-3 1 (6.1 h)	

Nos interesa encontrar cepas que tengan un valor pequeño de fase lag, es decir, que su tiempo de adaptación sea lo mas breve posible. La mayoría de las cepas presentaron fases lag relativamente cortas, a excepción de la cepa H4.4A, siendo 40°C la

temperatura a la cual tardan mayor tiempo en adaptarse. En caso, el grupo IV sobresale, al tener una menor fase a adaptación a 50°C.

5.4.2 Velocidad específica de producción de CO₂ (μ)

La velocidad específica de producción de CO₂ (μ) depende principalmente de la composición y concentración del medio de cultivo, presencia de inhibidores, temperatura y pH; nos indica la afinidad del microorganismo por las condiciones de cultivo. El valor de este parámetro es la relación entre la velocidad de producción de CO₂ y el CO₂ producido para cada tiempo.

En la **Figura 14** se presentan los valores de μ para cada una de las cepas a las tres temperaturas de estudio. Dichos valores oscilan entre 0.4 y 1.1 h⁻¹.

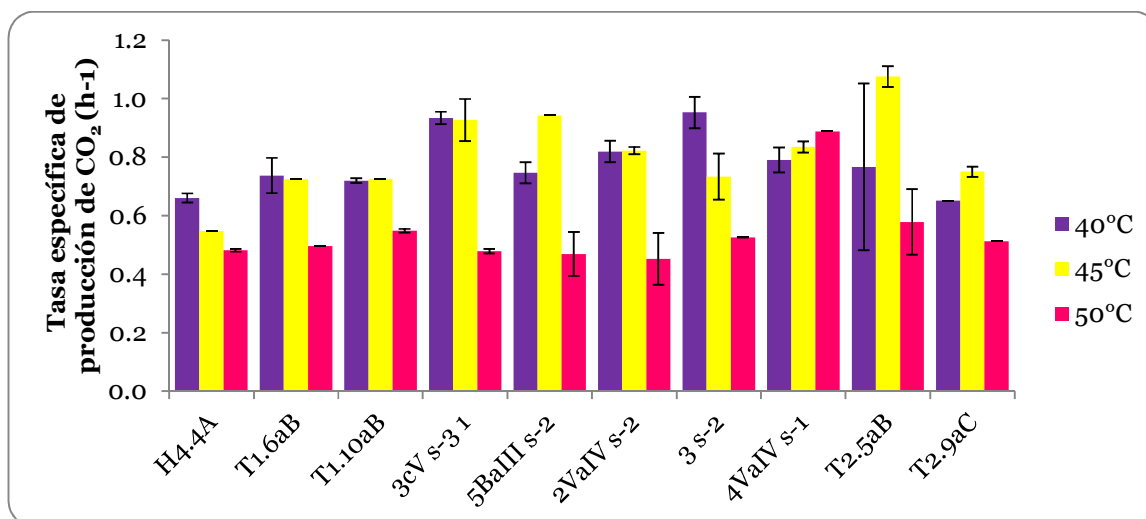


FIG. 14. Valores de μ_{max} a 40, 45 y 50°C durante la FMS, utilizando aceite de oliva como inductor, 65%H, pH=6.5 y aireación de 60 mL/min.

Con base en este parámetro cinético, las cepas fueron clasificadas en 4 grupos, en función del valor más alto de μ_{max} en función de la temperatura. El **grupo I** está compuesto por aquellas cepas que tuvieron un mayor valor de μ_{max} a 40°C, en el **grupo II** las que lo tienen a 45°C y el **grupo III** a 50°C. Existe un **grupo IV** en el cual el valor de μ_{max} es igual tanto a 40 como a 45°C (**Tabla 9**).

Tabla 9. Clasificación de las cepas por el valor de μ_{max} en función de la temperatura

GRUPOS			
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
H4.4A	5BaIII s-2	4VaIV s-1	2VaIV s-2
3 s-2	T2.5aB		3cV s-3 1
	T2.9aC		T1.6bB
			T1.10aB

Las cepas H4.4A y 3s-2 presentan el mismo comportamiento: conforme la temperatura aumenta su valor de μ disminuye, lo que nos indica que dichas cepas prefieren temperaturas bajas.

Caso contrario ocurre con la cepa 4VaIV s-1, la cual al aumentar la temperatura aumenta también su μ , lo que nos indica que esta cepa crece con mayor velocidad a temperaturas elevadas.

Por otro lado, el grupo IV presenta valores de μ muy parecido a 40 y 45°C, pero disminuyendo para 50°C, lo cual nos indica que a mayor temperatura su velocidad de crecimiento disminuye.

El grupo II presenta un comportamiento diferente, las cuales a 45°C aumenta el valor de μ_{\max} con respecto al obtenido a 40°C, pero vuelve a disminuir para 50°C.

Existen reportes de parámetros cinéticos de *Thermomyces lanuginosus* obtenidos por **Jensen y col. (2009)**, los cuales nos muestra valores de μ_{\max} que oscilan entre 0.55 h⁻¹ (estado estacionario) y 0.84 h⁻¹ (para un sistema bifásico). Para ambos casos en fermentación en medio líquido utilizando medio YPS modificado, obteniendo un valor máximo de μ de 0.89 h⁻¹, incubando a 50 °C a las 8 h. En este trabajo se obtuvieron valores de μ_{\max} mayores a los reportados por Jensen y col. (1.08 ±0.035 h⁻¹, para la cepa T2.5aB) pero a 45°C, no a 50°C. Cabe señalar que la cepa 4VaIV s-1 es la que presenta el mismo valor de μ_{\max} (0.89 h⁻¹) pero en un tiempo ligeramente mayor, 9 horas.

Esta es la variable a la cual se le dio más peso, a la hora de elegir a las mejores cepas. En este caso, se prefieren aquellas que presentan un valor elevado de μ , ya que esto nos habla acerca de la alta afinidad que presenta el hongo termófilo a las condiciones en las que se encuentra. En este caso, se eligieron a las cepas del grupo IV, las cuales sobresalen por su alta tasa específica de producción de CO₂.

5.4.3 Producción final de CO₂

Para el caso de la producción de CO₂, se analizó el CO₂ producido durante las 72 horas que duró la fermentación. Se observa que la temperatura a la que se produjo mayor cantidad de CO₂ fue a 45°C, menos 5BaIII s-2 y T2.9aC, sobresaliendo la cepa T2.5aB y T1.10aB (165.2 y 154.9 CO₂/gms, respectivamente) (**Figura 15**).

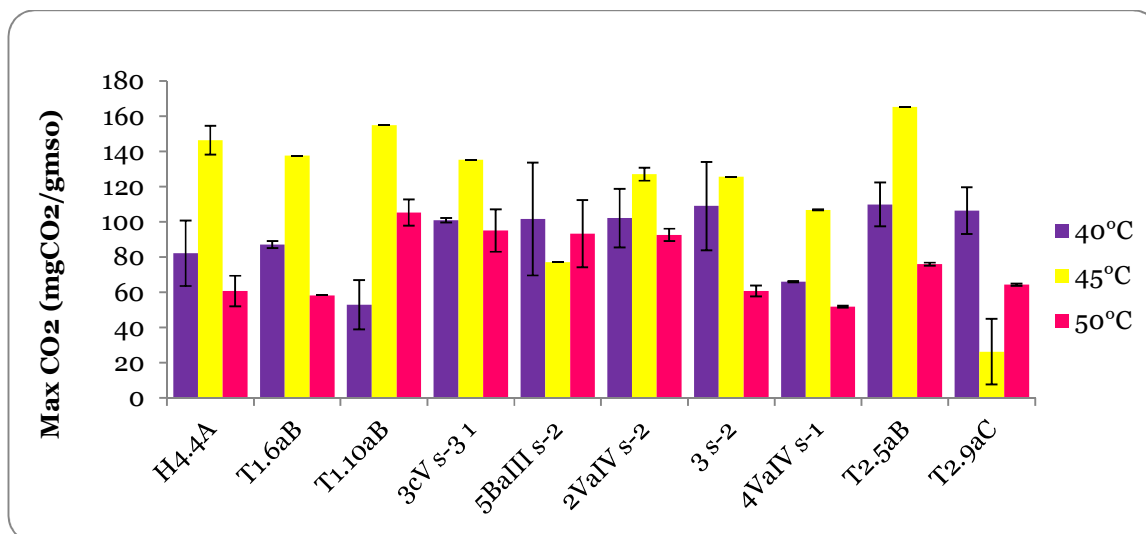


FIG. 15. Producción de CO₂ a 40, 45 y 50°C durante la FMS, utilizando aceite de oliva como inductor, 65%H, pH=6.5 y aireación de 60 mL/min.

En esta sección cabe agregar el concepto de *mineralización*, el cual nos indica la fracción de carbono orgánico que se transforma en CO₂. Haciendo el balance de carbono presente en el medio (ANEXO A4), obtenemos que hay una concentración de 94 mg de carbono/g soporte. Con este dato, se calculó el porcentaje de mineralización de cada una de las 10 cepas, a las tres temperaturas de estudio (Tabla 10).

De manera general, se observa que los porcentajes de mineralización son bajos (menos del 50%). La temperatura a la que se presenta el mayor porcentaje de mineralización es a 45°C, con excepción de la cepa T2.9aC. 50°C es la temperatura en donde menor porcentaje de mineralización existe. Las cepas que mejor mineralizan el carbono orgánico son la T1.6aB, la 3 cV s-3 1, la T.10aB y T2.5aB.

Tabla 10. Mineralización (%) del Carbono durante la FMS a 40, 45 y 50°C de las diez cepas termófilas.

T(°C)	40°C (%)	45°C (%)	50°C (%)
Cepa			
H4.4A	23.62	42.05	16.74
T1.6aB	25.01	39.55	30.25
T1.10aB	15.20	44.50	27.31
3cV s-3 1	29.00	38.88	26.80
5BaIII s-2	29.19	22.21	26.62
2VaIV s-2	29.35	36.50	17.48
3 s-2	31.32	36.13	14.91
4VaIV s-1	18.98	30.69	17.47
T2.5aB	31.59	47.48	21.83
T2.9aC	30.59	7.57	18.52

En cuanto a este parámetro, nos interesa encontrar a las cepas que tengan una mayor producción de CO₂, ya que este nos indica indirectamente el crecimiento fúngico; sobresaliendo las cepas T1.6aB, T1.10aB y 3cV s-3 1.

5.5 Producción de actividad lipasa

Para determinar la producción de lipasas a diferentes temperaturas se evaluó la producción a las 72 h de incubación. En casi todos los casos, se presenta una mayor actividad lipasa con las cepas producidas a 40°C que con las obtenidas a 45°C. Las cepas T1.6aB, T1.10aB y 3cV s-3 1 presentan la mayor producción de lipasa a 45°C (Figura 16).

El mayor valor de actividad lo presenta la cepa T2.5aB a 40°C (10.4 U). En general, a 50°C la actividad se ve disminuida en todos los casos, teniendo su máximo valor con la cepa T1.6aB (2.03 U).

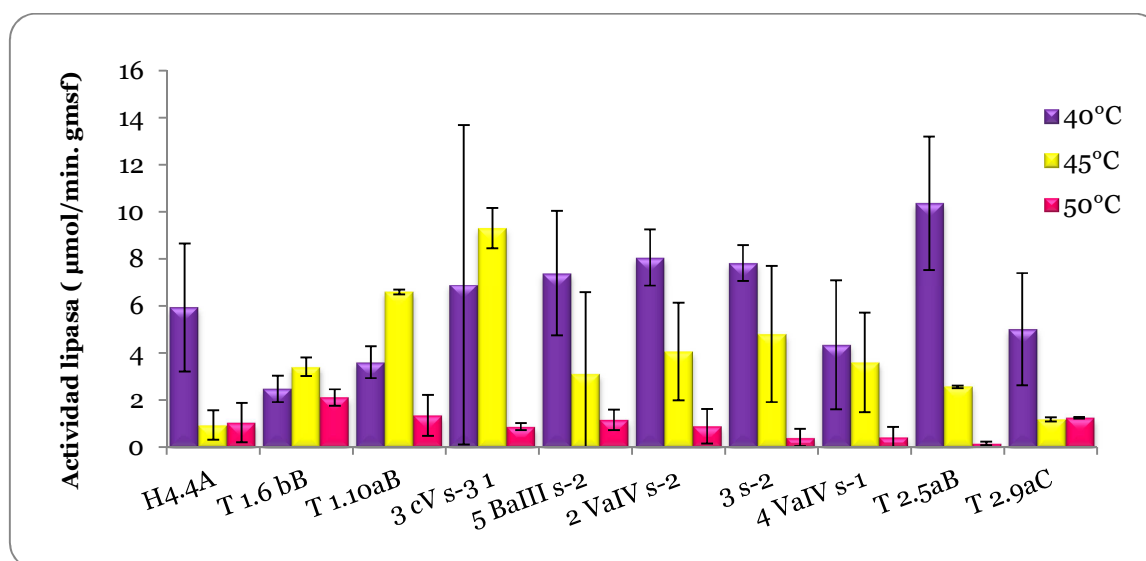


FIG. 16. Producción de actividad lipasa por 10 cepas de hongos filamentosos a 40, 45 y 50°C por FMS, utilizando aceite de oliva como inductor, 65%H, pH=6.5 y aireación de 60 mL/min.

Se pueden observar unas grandes barras de error, las cuales se pueden explicar debido a que nuestra metodología del proceso de Fermentación en Medio Sólido no nos

ofrece resultados homogéneos, presentando los duplicados resultados muy diferentes. Analizando toda la metodología, se decidió modificar la forma de inocular, pasando de utilizar círculos de micelio a un inóculo en medio líquido; de esta manera logramos una distribución mas homogénea del inóculo, asegurando una mejor heterogeneidad y repetitividad, disminuyendo así el error experimental. Este cambio en la metodología se llevó a cabo basándonos en experimentos previos aún no reportados de Avila (2011).

5.6 Efecto de la temperatura en la estabilidad enzimática

Los extractos enzimáticos obtenidos de las FMS llevadas a cabo a 40°C fueron utilizados para medir la termoestabilidad durante 4 horas a diferentes temperaturas (30, 40, 50 y 60°C).

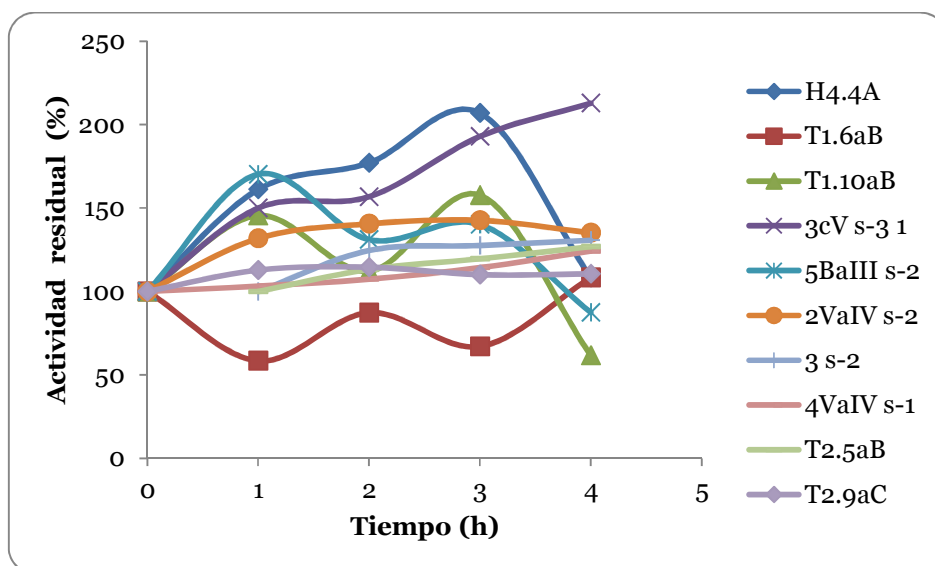


FIG. 17. Estabilidad térmica a 30°C de los extractos enzimáticos producidos por 10 cepas termófilas.

En la **Figura 17** se presenta la actividad lipasa residual incubando a 30°C en función del tiempo. En los extractos obtenidos de las cepas T1.10aB, 5BaIII s-2 y 2VaIV s-2 se observa un efecto de activación térmica después de dos horas de incubación; el extracto de H4.4A se activa un 100% a las tres horas, cayendo drásticamente después. Conforme aumenta el tiempo de incubación, el extracto de la cepa 3cV s-3 1 va activándose progresivamente, hasta llegar a más del 200% de actividad residual a las 4 horas. Los extractos de las cepas T2.9aC, 4VaIV s-1, 3 s-2 y T2.5aB no presentan ningún efecto, manteniendo la actividad constante durante las 4 horas de incubación. Un comportamiento diferente es el presentado por el extracto de la cepa T1.6aB, el cual sufre de una desactivación térmica a 30°C

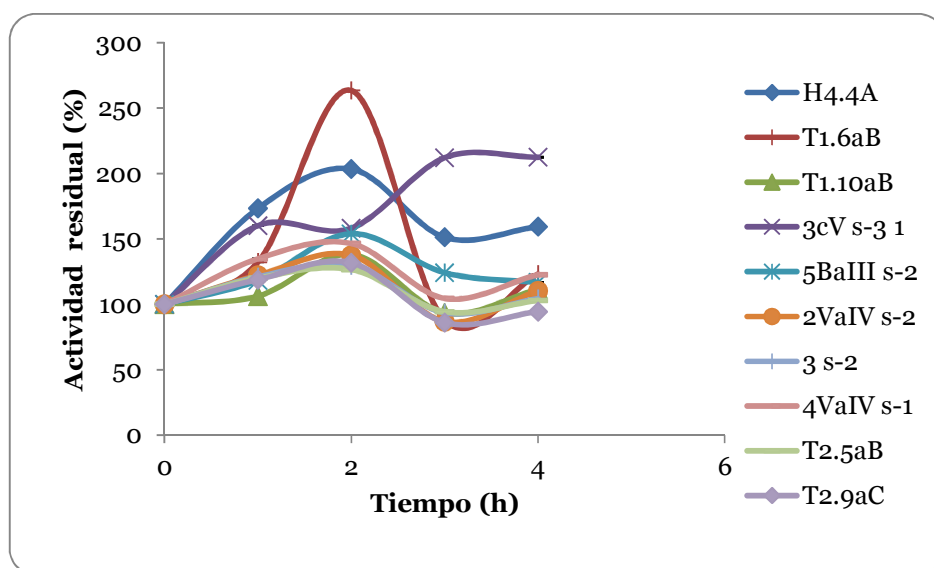


FIG. 18. Estabilidad térmica a 40°C de los extractos enzimáticos producidos por 10 cepas termófilas.

A 40°C se pueden observar dos comportamientos, en cuanto a estabilidad térmica se refiere (**Figura 18**). Existe un grupo de cepas (5BaIII s-2, 4VaIV s-1, 3cV s-3 1, 2VaIV s-2, T1.10aB, T2.9aC y T2.5aB) el cual sufre de una activación de alrededor del 20% a las

dos horas de incubación, después comienza a desactivarse hasta regresar al 100% de actividad residual. El otro grupo, sufre una activación térmica mas marcada, siendo el extracto de la cepa T1.6aB la que mayor actividad residual presenta a las 2 horas (150%) pero cae drásticamente después de este punto. Los extractos de las cepas 3cV s-3 1 y H4.4A siguen sufriendo del efecto de activación después de las 4 horas de incubación.

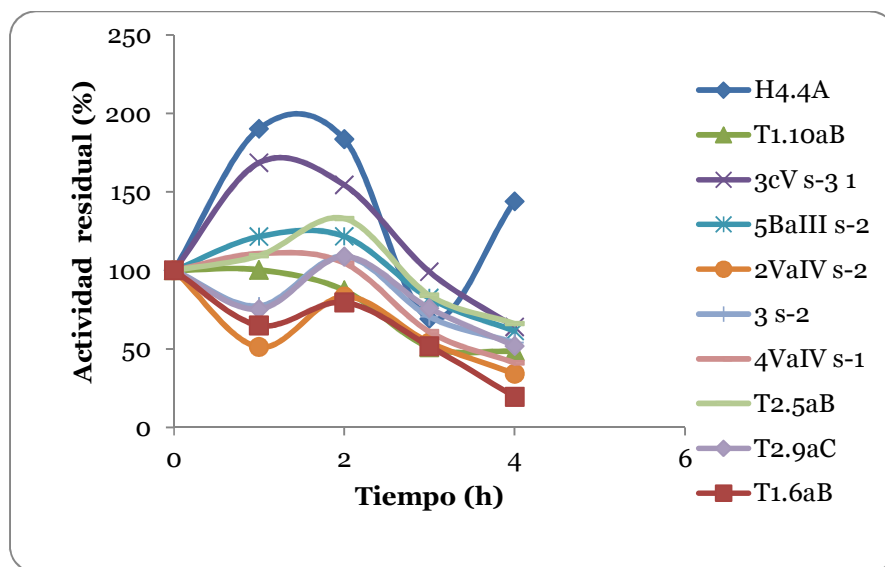


FIG. 19. Estabilidad térmica a 50°C de los extractos enzimáticos producidos por 10 cepas termófilas.

De manera general, a 50°C se observa que los extractos mantienen la actividad constante las dos primeras horas de incubación (**Figura 19**), para después sufrir un proceso de desactivación térmica. Solo para el caso de los extractos producidos por las cepas H4.4A y 3cV s-3 1 ocurre una activación hasta las dos horas de incubación (100 y 50% de activación respectivamente) y después cae drásticamente la actividad residual.

A 60°C los extractos enzimáticos de la mayoría de las cepas sufren desactivación térmica, desde la primera hora de incubación (**Figura 20**). Solo para el caso de los extracto de T2.9aC, que se mantiene constante la actividad durante una hora y después comienza a disminuir la actividad lentamente; y T1.6aB que se activa en un 200% a las dos horas de incubación, y después disminuye la actividad en forma considerable.

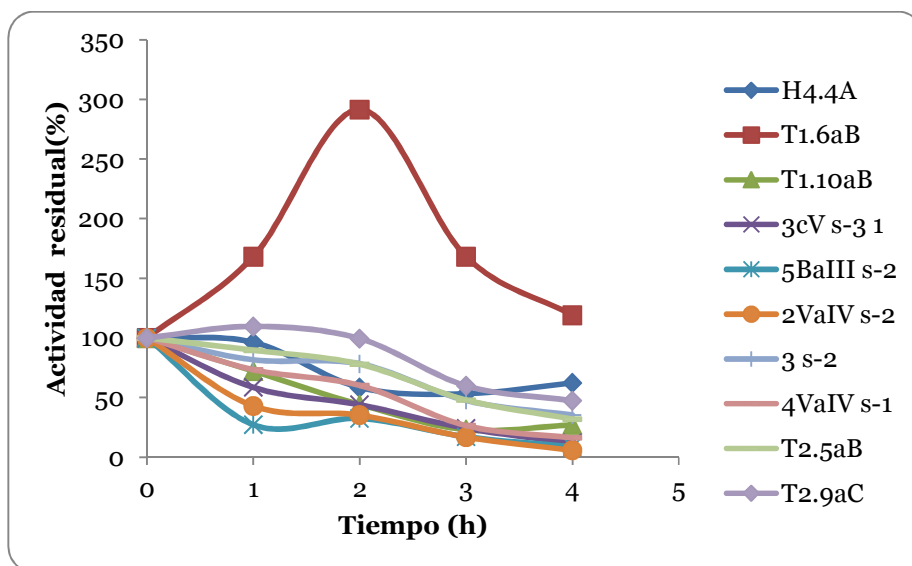


FIG. 20. Estabilidad térmica a 60°C de los extractos enzimáticos producidos por 10 cepas termófilas.

La activación térmica de las enzimas esta generalmente relacionada con el contenido de aminoácidos hidrofóbicos de la proteína (**Klump, 1992**); las lipasas son bien conocidos por su naturaleza hidrofóbica. Por lo tanto, es muy probable que la mayoría de las enzimas producidas por estos hongos termófilos sean ricas en aminoácidos hidrofóbicos.

Los resultados obtenidos en esta sección, nos llamaron poderosamente la atención, ya que esperábamos un comportamiento típico, en donde la actividad enzimática fuera disminuyendo al aumentar la temperatura y el tiempo de incubación. Pero lo que encontramos fue que casi todas las cepas, sufren de activación térmica de 30 a 50°C; para 60°C solo una cepa sufre de activación. (ANEXO A5)

5.8 Cinéticas de producción de lipasas por las cepas T1.10aB y 3cV s-3 1

Después de haber analizado los resultados anteriores, se eligieron a las cepas que mostraron mejores resultados. En cuanto a la fase lag, las cepas que presentaron un menor tiempo de adaptación fueron las presentes en el grupo III, T1.10aB, 3 s-2 y 4VaIV s-1 (4.79, 3.14 y 4.63 h, respectivamente). En el caso de la velocidad específica de producción de CO₂ (μ), nos interesa las cepas que crezcan más rápido, destacándose las presentes en el grupo IV, T1.6aB, T1.10aB, 3cV s-3 1 y 2VaIV s-2 (0.73, 0.73, 0.93 y 0.82 h-1, respectivamente). Las cepas que tienen una mayor producción de CO₂ fueron la T1.6aB, T1.10aB y 3cV s-3 1 y T2.5aB (137.63, 154.6, 135.3 y 165.24 mg CO₂/gms respectivamente, a 45°C). En cuanto a los extractos enzimáticos, se toma en cuenta a aquellos que presentaron una mayor actividad a 45°C, estos fueron producidos por las cepas 3cV s-3 1, T1.10aB y T1.6aB (9.3, 6.6 y 3.4 U/gms). En cuanto a la termoestabilidad, aunque la mayoría de los extractos enzimáticos presentan activación térmica, para los extractos de las cepas 3cV s-3 1, H4.4A y T1.6aB (entre 150% y 200% de actividad residual), es donde es más marcada dicha activación. Debido a estos resultados, se eligieron a las cepas T1.10aB y 3cV s-3 1. Para cada una de estas cepas se analizó la cinética de producción de lipasas, termoestabilidad y efecto de la temperatura en la actividad.

5.8.1 Cinéticas de producción de lipasas

Se llevó a cabo una FMS de 120 horas, tomando muestras cada 24 horas, a tres diferentes temperaturas (40, 45 y 50°C).

En las **Figuras 21** y **22** se muestra el perfil de la actividad enzimática con respecto al tiempo de cultivo a las tres diferentes temperaturas de estudio, para el extracto producido por la cepa T1.10aB y 3cV s-3 1, respectivamente.

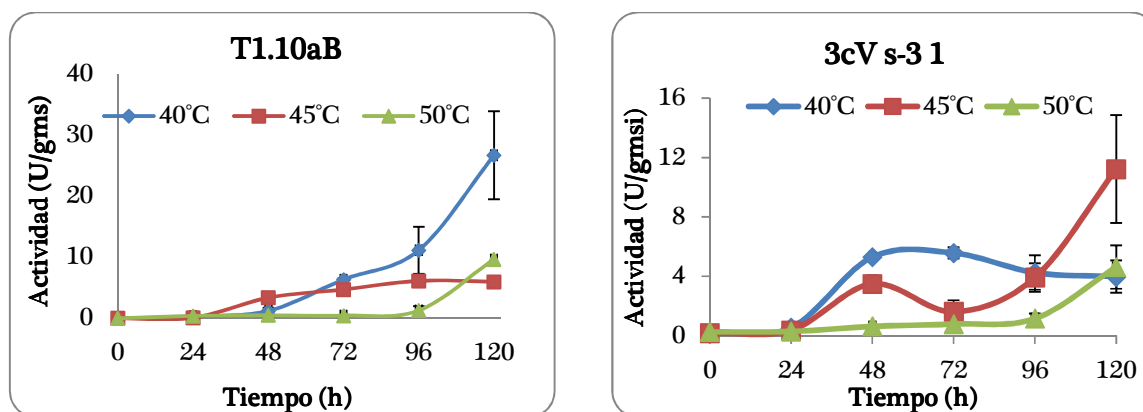


FIG. 21 y 22. Cinética de producción de lipasas para el extracto enzimático producido por la cepa T1.10aB y 3cV s-31.

Para ambos extractos enzimáticos, se puede observar que a 50°C la actividad lipasa es muy baja, encontrando su máximo a las 120 horas con 9.68 U/gms para la cepa T1.10aB y 4.62 U/gms para la 3 cV s-3 1.

Se observa que para los extractos producidos por la cepa T1.10aB (**Figura 21**) presenta un comportamiento muy parecido para ambas temperaturas (40 y 45°C), hasta las 48 horas, en donde la actividad enzimática es relativamente nula. Presenta su máximo de

actividad a las 120 horas a 40°C (26.71 U/gms). Después de las 48 horas, presenta un comportamiento constante hasta las 120 horas a 45°C.

Para los extractos producidos por la cepa 3cv s-3 1 (**Figura 22**) hasta las 24 horas no se aprecia casi actividad enzimática. A 45°C se encuentra el máximo de actividad enzimática a las 120 horas (12.21 U/gms), mientras que a 40°C a las 72 horas se obtiene el máximo con 5.56 U/gms.

Se han reportado lipasas producidas por *Thermomyces lanuginosus* en fermentación líquida donde se alcanza la máxima actividad de 80 U/mL a 45°C y después de 25 horas de cultivo. Para *Penicillium restrictum* en FMS utilizando aceite de babassú como sustrato se obtiene un máximo de actividad lipasa de 30.3 U/gms, después de 24 horas de cultivo a 30°C. Las actividades de ambas cepas estudiadas en este trabajo son inferiores a las reportadas en la literatura, aunque cabe señalar que en este estudio no se trabajaron con condiciones optimizadas.

Se eligió un solo punto para poder analizar el efecto de la temperatura tanto en la actividad como en la termoestabilidad. En ambos casos, el extracto elegido fue el producido a las 72 horas a 40°C, que aunque no son los puntos en donde se presenta una mayor actividad enzimática, fueron elegidos debido a que son los puntos con mayor actividad lipasa en donde las barras de error son menores.

5.8.2 Efecto de la temperatura en la estabilidad

Se analizó la estabilidad del extracto enzimático de ambas cepas durante 4 horas a diferentes temperaturas. En la **Figura 23** se observa que el extracto producido por la

cepa T1.10aB sufre un proceso de activación térmica en todas las temperaturas. En la primera hora de incubación, a 30°C se activa en un 50% y después de ahí disminuye un 20% a las 4 horas de incubación. Para las demás temperaturas la activación es de casi el 100% para la primera hora, llegando a 150% de activación a las tres horas a 40 y 60°C.

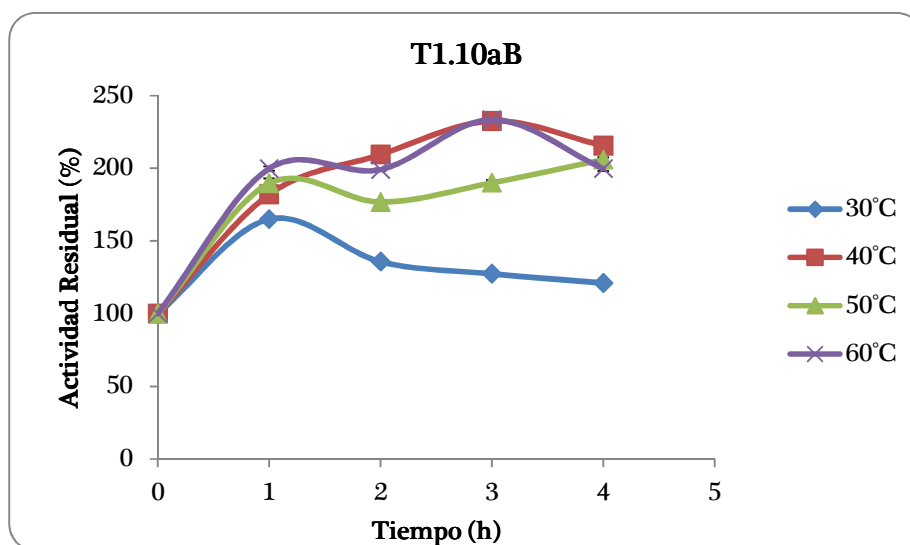


FIG. 23. Termoeestabilidad de la lipasa producida por la cepa T1.10aB

En la **Figura 24** se puede observar que el extracto producido por la cepa 3cV s-3 1 es activada térmicamente a la primer hora de incubación para las 4 temperaturas (30, 40, 50 y 60°C) en un 100, 150, 200 y 250% respectivamente. A 60°C, después de este punto, el extracto se desactiva bruscamente, hasta retener alrededor del 60% de actividad a las 4 horas. Para el resto de las temperaturas la desactivación no es tan marcada, llegando a retener entre el 80-90% de actividad.

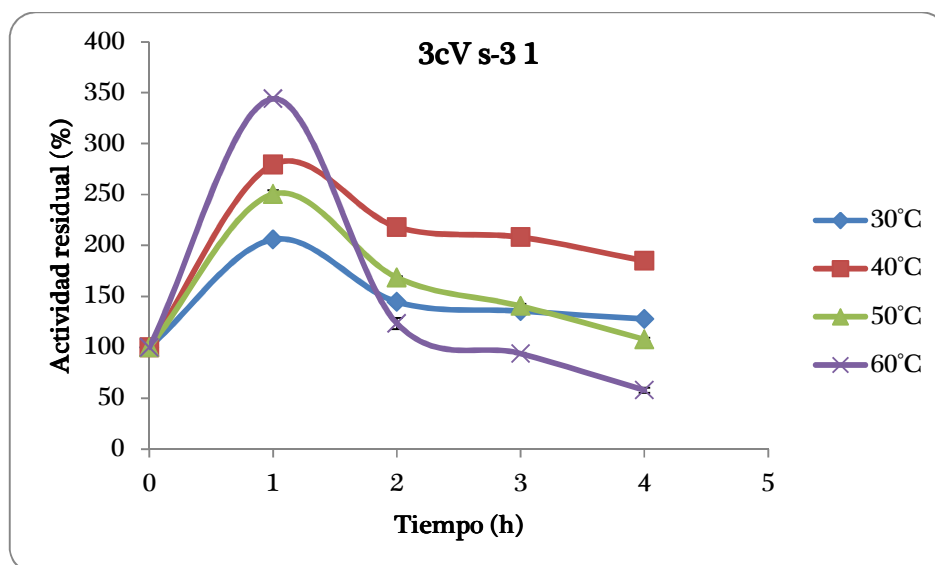


FIG. 24. Termoestabilidad de la lipasa producida por la cepa 3cv s-3 1

Algunos estudios de termoestabilidad de lipasas reportan que: *Bacillus sp* puede ser estable durante 10 minutos a 80°C, reteniendo 80% de su actividad (Bora y Kalita, 2007), mientras que Ghori y col. (2011), para la misma lipasa reporta que pierde el 50% de su actividad después de ser incubada por 65 minutos a 70°C. Weng-Liu y col. (1973) reportaron la estabilidad térmica de una lipasa de *Humicola lanuginosa* (nombre con el que se conocía antiguamente a *Thermomyces lanuginosa*), la cual conserva el 100% de su actividad después de ser incubada 20 minutos a 50 y 60°C, pero pierde el 50% de su actividad después de ser incubaba el mismo tiempo a 70°C. Comparando los resultados obtenidos en este estudio con los obtenidos por Weng-Liu, podemos decir que las lipasas obtenida en este estudio son mas estables que las suyas, siendo la producida por T1.10aB activada térmicamente aun después de 4 horas de incubación. Para que los valores obtenidos en este trabajo puedan ser comparados con los obtenidos por las lipasas producidas por *Bacillus sp* tendríamos que incubar los

extractos a mayores temperaturas, lo cual, con los resultados obtenidos, creo que se podrían obtener buenos resultados, comparables con lo reportado en la literatura.

Los extractos de ambas cepas seleccionadas se ven activados por efecto de la temperatura, siendo el extracto de la cepa 3 cV s.3 1 la que presenta una activación mas marcada.

5.8.3 Efecto de la temperatura en la actividad enzimática

Se utilizó la titulación como método para medir como afectaba la temperatura a la actividad enzimática. Este cambio de metodología, se debía principalmente a que con el uso del método del p-NPO no se observaba diferencia alguna. Suponemos que esto se debe a que al ser los pozos de la microplaca tan pequeños, no se puede llevar a cabo eficientemente el proceso de transferencia de calor.

Para llevar a cabo esta metodología, se utilizó el biocatalizador en polvo, el cual fue agregado a la mezcla de reacción, agitándose durante 5 minutos; esto a cuatro diferentes temperaturas: 30, 40, 50 y 60°C.

En la **Figura 25** se observa cómo se comporta la actividad enzimática de los extractos producidos por ambas cepas al ser medida a diferentes temperaturas. En ambos casos se observa que el aumento en la actividad es directamente proporcional a la temperatura, obteniéndose valores mas elevados de actividad para el extracto de la cepa T1.10aB (90U/gms vs 70U/gms del extracto de 3cV s-3 1 a 60°C). Después de haberse estudiado estas cuatro temperaturas, no podemos decir que encontramos la

temperatura óptima, para lo cual tendríamos que medir la actividad a mayores temperaturas.

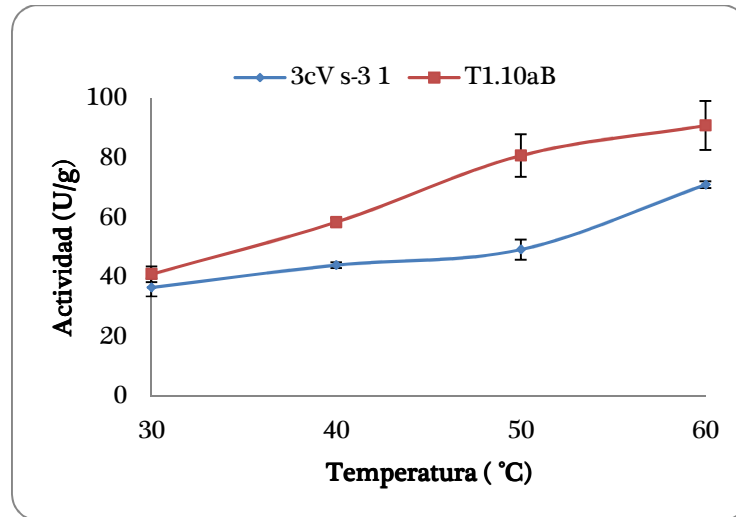


FIG 25. Efecto de la temperatura en los extractos enzimáticos producidos por la cepa T1.10aB y 3cV s-3 1

Weng-Liu y col. (1973) reportaron el efecto de la temperatura en la actividad de una lipasa purificada producida por *T. lanuginosus*. El intervalo de temperaturas analizado fue de 30-80°C. También se observa que la actividad va aumentando conforme aumenta la temperatura llegando a su máximo a 60°C, después de este punto la actividad cae en aproximadamente un 50%.

Con los valores obtenidos anteriormente y con ayuda de la ecuación de Arrhenius se calcularon el valor de la energía de activación y Q_{10} para ambos extractos lipolíticos (Tabla 11).

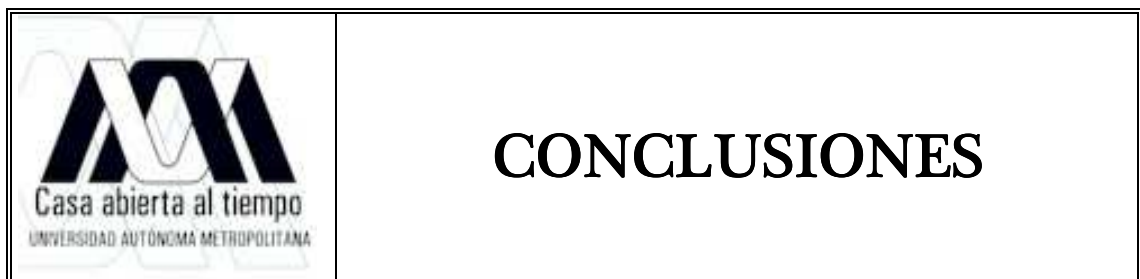
Tabla 11. Parámetros termodinámicos de los extractos enzimáticos de cepas termófilas.

Cepa	Ea (kJ/mol)	Q ₁₀
T1.10aB	22.9	1.23
3cV s-3 1	17.5	1.20

*El valor de Q₁₀ fue calculado cuando la temperatura fue incrementada de 50 a 60°C

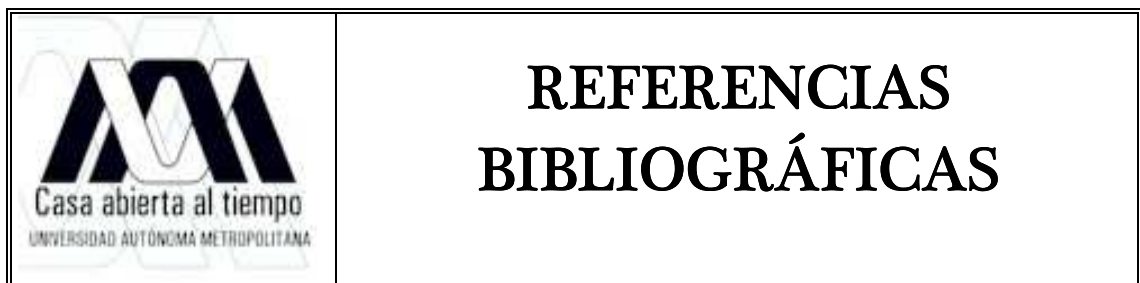
Ghori y col. (2011) reportaron un valor de energía de activación (Ea) para lipasas de *Bacillus sp.* de 20.60 kJ/mol. Comparando este valor con los obtenidos en este trabajo, ambos son muy parecidos, siendo valores pequeños, lo que nos indica una buena relación entre enzima y sustrato. Ese mismo autor reporto valores de Q₁₀ de 0.04788, cuando la temperatura aumento de 20 a 30°C. Los valores obtenidos en este trabajo son aproximadamente 25 veces mayores a lo reportado. Bajos valores de Q₁₀ demuestran una alta catálisis, por lo que podemos decir que los extractos enzimáticos de las cepas T1.10aB y 3cV s-3 1 son menos activos catalíticamente hablando que la lipasa de *Bacillus sp.*

En esta sección, considero que hizo falta que se analizaran temperaturas mas elevadas, para asi poder obtener la temperatura a la que se encuentra el máximo de actividad lipasa, además de poder calcular no solamente la energía de activación, sino también la energía de desactivación.



CONCLUSIONES

- Los hongos termófilos seleccionados en este trabajo producen lipasas extracelulares, termoestables, conservando incluso el 100% de su actividad después de 4 horas de incubación, y termoactivas a 60°C.
- De las 29 cepas evaluadas, todas crecen a 50°C, tres crecen a 30°C (termotolerantes).
- Los mayores valores de actividad enzimática se presenta a 40°C.
- Algunos de los extractos enzimáticos sufren de activación térmica.
- Las 10 cepas preseleccionadas producen lipasas que son consideradas termoestables.
- El análisis de termoestabilidad demostró que las cepas que producen extractos lipolíticos mas estables son las cepas T1.10aB y 3cV s-3 1.



REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Adrio J y Demain A. (2005). Microbial cells and enzymes. A century of progress. *Methods in Biotechnology*. Ed. Human Press. Totowa New Jersey. Pp. 127.
- Ampon K, Basri M, Salleh A, Wan W y Razak C. (1994). Immobilization by adsorption of hydrophobic lipase derivatives to porous polymer beads for use in estersynthesis. *Biocatalysis*. 10:341-351.
- Ángel R. (2007). Estudios de crecimiento y producción de lipasas por hongos filamentosos. Tesis para obtener el grado de especialista en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Arima K, Liu W y Beppu T. (1972). Studies on the lipase of thermophilic fungus *Humicola lanuginosa*. *Agricultural Biology Chemistry*. 36:893-895.
- Arroyo M. (2000). Síntesis enantioselectivas catalizadas por lipasas microbianas. *Investigación Química: Anales de la Real Sociedad Española de Química*. 2:19-24.
- Banerjee U, Sani R, Azmi W y Soni R. (1999). Thermostable alkaline protease from *Bacillus brevis* and its characterization as a laundry detergent additive. *Process Biochemistry*. 35: 213-219.
- Berg O, Cajal Y, Butterfoss G, Grey R, ALSina M, Yu B y Jain M. (1998). Interfacial activation of triglyceride lipase from *Thermomyces (Humicola) lanuginosus*: kinetic parameters and a basis for control of the lid. *Biochemistry*. 37:6615-6627.
- Berka R, Rey M, Brown K, Byun T y Klotz A. (1998). Molecular characterization and expression of a phytase gene from the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. *Applied Environmental Microbiology*. 64:4423-4427.
- Beys W, Mitidieri S, Schrank A y Vainstein M. (2005). Production and extraction of an extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Metarhiziumanisopliae*. *Process Biochemistry*. 40:321-326.
- Bhardwaj K, Raju A y Rajasekharan R. (2001). Identification, purification and characterization of a thermally stable lipase from rice bran. A new member of the (phospho) lipase family. *Plant Physiology*. 127(4):1728-38.
- Bisswanger H. (2002). Enzyme kinetics principles and methods. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim (Alemania). 2:139-143.
- Bora L y Kalita M. (2007). Production and optimization of thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus sp* LBN 4. *The Internet Journal of Microbiology*. 4(1).

- Bornscheur U, Bessler C, Srinivas R y Krishna S. (2002). Optimizing lipases and related enzymes for efficient application. *Trends in Biotechnology*. 20(10):433-437.
- Brock T. (1986). Introduction, an overview of the thermophiles. In *Thermophiles: General, Molecular and Applied Microbiology* Edited by: Brock TD. Ed. John Wiley & Sons. New York pp: 1-16.
- Brock T. (1998). *Biología de los microorganismos*. 8ª edición. Prentice Hall. España. pp: 162-168, 325-333.
- Cannel E y Moo-Young M. (1980). Solid-State fermentation systems. *Process Biochemistry*. 15: 2-7.
- Cooney D y Emerson R. (1964). Thermophilic fungi. An account of their Biology, Activities and Classification. W. H. Freeman & Co., San Francisco, CA. pp: 80-88.
- Córdova J, Nemmaoui M, Ismaili M, Morin A, Roussos A, Raimbault M y Benjilali B. (1998). Lipase production by solid state fermentation of olive cake and sugar cane bagasse. *Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic*. 5:75-78.
- Córdova J, Russos S, Baratti J, Nungaray J y Loera O. (2003). Identification of Mexican thermophilic and thermotolerant fungal isolates. *Micología Aplicada Internacional*. 15(2):37- 44.
- Dandavate V, Jinjala J, Keharia H y Madamwar D. (2009). Production, partial purification and characterization of organic solvent tolerant lipase from *Burkholderia multivorans* V2 and its application for ester synthesis. *Bioresource Technology*. 100(13):3374-81.
- De Caro J, Rouimi P y Rovey M. (1986). Hydrolysis of *p*-nitrophenyl acetate by the peptide chain fragment (336-449) of porcine pancreatic lipase. *Europe Journal of Biochemical*. 158:601-7.
- De Mascena M, Camargo M, De Morais M, Magalhaes M y De Lima J. (1999). Production of extracelular lipase by the phitopathogenic fungus *Fusarium solani* FS1. *Revista de Microbiología*. 30:304-309.
- Dosanjh S y Kaur J. (2002). Biochemical analysis of a native and proteolytic fragment of a high-molecular-weight thermostable lipase from a mesophilic *Bacillus sp*. *Protein Expression Purification*. 24 (1):71-5.
- Durand A. (2003). Bioreactor designs for solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. 13: 113-125.

- El-Shahed A, Meki M, Mohawed s y Ammar M. (1988). Lipases from *Aspergillus fumigatus* B. Activity of lipases produced at different temperatures is due to different enzymes. *Egyptian Journal of Microbiology*. 23:537-548.
- Fennema R y Danson M. (1993). Química de los alimentos. Ed. Acribia. España. Pp. 418-421.
- García C. (2007). Growth and germination of some thermophilic fungi isolated from eucalypt wood chips. *Pesq. Flor. Bras, Colombo*. 54:149-152.
- Germano S, Pandey A, Osaku A, Rocha S. y Soccol C. (2003). Characterization and stability of proteases from *Penicillun sp* produced by solid state fermentation. *Enzyme and Microbiology Technology*. 32:246-251.
- Ghorri M, Iqbal M y Hameed A. (2011). Characterization of a novel lipase from *Bacillus sp*. Isolated from tannery wastes. *Brazilian Journal of Microbiology*. 42:22-29.
- Haki G y Rakshit S. (2003). Developments in industrially important thermostable enzymes: A Review. *Biorresource Technology*. 89:17-34.
- Hasan, F, Shah, A y Hameed, A. (2006). Industrial applications of lipases. *Enzyme and Microbial Technology*. 39:235-251.
- Hasnain S, Adeli K y Storer A. (1992). Purification and characterization of an extracellular thiol-containing serine proteinase from *Thermomyces lanuginosus*. *Biochemical Cell Biology*. 70:117-122.
- Hernaiz M, Sánchez-Montero U., Sinisterra J. (1999). Modification of purified lipase from *C. rugosa* with polyethylene glycol: A systematic study. *Enzyme Microbiology Technology*. 24:181-90.
- Hernández B, Córdova J, Bárzana E y Favela E. (2009). Effects of organic solvents on activity and stability of lipases produced by thermotolerant fungi in solid-state fermentation. *Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic*. 61:136-142.
- Hiol A, Jonzo M, Rugani N, Druet D, Sarda L y Corneau L. (2000) Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit. *Enzyme and Microbial Technology*. 26:421.430.
- Houde A, Kademi A y Leblanc D. (2004). Lipases and their industrial applications: an overview. *Applied Biochemistry Biotechnology*. 118(1-3):155-170.

- Ibrahim O, Hayashi M y Nagai S. (1987). Production of a thermostable lipase by *Humicola lanuginosa* grown on sorbitol-corn steep liquor medium. *Agricultural Biological Chemistry*. 51:2145-2151.
- Jaeger K y Reetz M. (1998). Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnology*. 16:396-403.
- Jaeger K, Eggert T y Van den Burg B. (2002). Lipases for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*. 13:213-218.
- Johnvesly B y Naik G. (2001). Studies on production of thermostable alkaline protease from thermophilic and alkalophilic *Bacillus* sp. JB-99 in a chemical defined medium. *Process Biochemistry*. 37:139-144.
- Kazlauskas R. (1994). Elucidating structure mechanism relationship in lipases. Prospects for predicting and engineering catalytic properties. *Trends Biotechnology*. 12:464-472.
- Klump H, Di-Ruggiero J, Kessel M, Park J, Adams M, Robb F (1992) J. Biol. Chem. 267:22681-22685.
- Kouker, G y Jaeger K. (1986). Specific and Sensitive Plate Assay for Bacterial Lipase. *Applied and Environmental Microbiology*. 53:211-213.
- Kristjansson J. (1989). Thermophilic organisms as sources of thermostable enzymes. *Trends in Biotechnology*. 7:349-353.
- Kynclova E, Hartig A y Schalkhammer T. (1995). Oligonucleotide labeled lipase as a new sensitive hybridization probe and its use in bio-assays and biosensors. *Journal of Molecular Recognition*. 8(1-2):139-45.
- Laukevics J, Apsite A, Viesturs H y Tengerdand R. (1984). Solid substrate fermentation of wheat straw to fungal protein. *Biotechnology Bioengineer*. 26: 1465-1480.
- Lasa I y Berenguer J. (1993). Thermophilic enzymes and their biotechnological potential. *Microbiology*. 9(2):77-89.
- Lehninger L. (1991). Bioquímica. 2a edición. Editorial Omega. Barcelona, España. Pp. 199-201.

- Levenspiel, O. Cinética de las reacciones homogéneas. En: *Ingeniería de las reacciones químicas*. Tojo, G. Editorial Reverté S. A. México. 2002. 9-38.
- Linko Y, Lamsa M, Wu X, Uosukainen E, Seppala J y Linko P. (1998). Biodegradable products by lipase biocatalysis. *Journal Biotechnol.* 66(1):41–50.
- Lott J y Lu C. (1991). Lipase isoforms and amylase isoenzymes—assays and application in the diagnosis of acute pancreatitis. *Clinic Chemical.* 37:361–368.
- Maheshwari R, Girish B y Mahalingeshwara K. (2000). Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 64:461-488.
- Manimaran A, Santhosh K, Permaul K y Singh S. (2008). Hyper production of cellulase-free xylanase by *Thermomyces lanuginosus* SSBP on bagasse pulp and its application in biobleaching. *Applied Microbiology Biotechnology.* 81:887-893
- Mateos J, Rodríguez J, Roussos S, Cordova J, Abousalham A, Carriere F y Baratti J. (2006). Lipase from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid state fermentation than liquid fermentation procedures. *Enzyme and Microbial Technology.* 39:1042–1050.
- Mauvernay R, Labreur P y Labrousse M. (1970). Composition and its products. U. S. Patent No. 3,513,073.
- Mitchell D, Berobic M y Krieger N. (2000). Biochemical engineering aspects of solid state bioprocessing. *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology.* 68:65-69.
- Mitra P, Chakraverty R y Chandra A. (1996). Production of proteolytic enzymes by solid state fermentation: an overview. *Journal of Scientific and Industrial Research.* 55: 439-442.
- Montes H, Ortega L y Magaña I. (2002). Enzimas con aplicación industrial. *Avance y Perspectiva.* 21:279-282.
- Nosoh Y y Takeshy S. (1991). Protein Stability and Stabilization Through Protein Engineering. 1ª edición. Ed. Ellis Horwood. New York. pp: 18-19.
- Nguyen Q, Rezessy S, Claeysens M, Stals I y Hoschke A. (2002) Purification and characterisation of amylolytic enzymes from fungus *Thermomyces lanuginosus* strain 34626. *Enzyme Microbiology Technology.* 31:345-352.
- Pandey A. (2003). Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering.* 13: 81-84.

- Palomo J. (2003). Control y modulación de la selectividad de derivados inmovilizados de distintas lipasas, en reacciones de química orgánica desarrolladas en sistemas macro-acuosos. Tesis para obtener el grado de doctor. Universidad Autónoma de Madrid.
- Peña R, González J, Hernández B y Favela E. (2009). Efecto del tipo de inóculo de *Thizopus sp* en la producción de lipasas por fermentación en medio sólido. *XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería*.
- PhysiologyWeb. Temperature Coefficient (Q_{10}) Calculator [en línea]. Diciembre 20, 2005.
URL: < http://www.physiologyweb.com/calculators/q10_calculator.html>
- Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia. [en línea]. Septiembre 24, 2008. URL: < <http://recursostic.javeriana.edu.co/wiki/images/6/65/1dt5.gif>>
- Prankasham R. S., Ch. S. Rao, R. S. Rao. A y P. N. Sarma. 2005. Alkaline protease production by an Isolated *Bacillus circulans* under solid-state fermentation using agroindustrial waste: process parameters optimization. *Biotechnology Progress*. 21: 1380-1388.
- Prazeres F, Lemos F, García P y Cabral S. (1996). Reversed micellar membrane bioreactor. En Malcata, F. X. *Engineering of / with lipases*. Netherlands: Kluwer Academic Publishers. p. 483-513.
- Puchart V, Katapodis P, Biely P, Kremnický L, Christakopoulos P, Vrsanska M, Kekod D, Macris B y Bhat M. (1999). Production of xylanases, mannanases and pectinases by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. *Enzyme Microbiology Technology*. 24:355-361.
- Raimbault, M. (1998). General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology*. 3:1-15.
- Robinson T, Singh D y Nigam P. (2001). Solid-state fermentation: a promising microbial technology for secondary metabolite production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 55: 284-289.
- Rohit S, Yusuf C y Uttam C. (2001). Production, purification, characterization and applications of lipases. *Biotechnology Advances*. 19:627-662.

- Rúa L, Díaz T, Fernández M, Otero C y Ballesteros A. (1993). Purification and characterization of two distinct lipases from *Candida cylindracea*. *Biochim Biophys Acta*. 1156:181-9.
- Sandhya C., A. Sumantha, G. Szakacs y A. Pandey. (2005). Comparative Evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid state fermentation. *Process Biochemistry*. 40: 2689-2694.
- Saucedo G, Trejo M. (1991). On-line Automated Monitoring and Control Systems for CO₂ and O₂ in Aerobic and Anaerobic Solid-State Fermentations. *Process Biochemistry*. 29:13-24.
- Schmid R y Verger R. (1998). Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications. *Angewandte Chemie International*. 37(12):1608-1633.
- Segel, I. H. (1968). *Biochemical calculations*. Ed. John Wiley & Sons. New York. pp: 333-334.
- Silva M, Cabral M, Costa S y García P. (1991). Characteristics of a new lipase from a *Thermus sp.* bacterium. *Weinheim: GBF Monographs*, VCH. 16:417-20.
- Singh S, Madlala A y Prior B. (2003). *Thermomyces lanuginosus*: properties of strains and their hemicellulases. *FEMS Microbiology Reviews*. 27:3-16.
- Tengerdy R. (1996). Cellulase production by solid substrate fermentation. *Journal of Scientific & Industrial Research*. 55:313-316.
- Turner P, Mano G. y Nordberg E. (2007). Potencial and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining. *Microbial Cell Factories*. 6:9-22.
- Van den Burg Bertus. (2003). Extremophiles as a source for novel enzymes. *Current Opinion in Microbiology*. 6:213-218.
- Vieille C y Zeikus J. (2001). Hypertemophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 65:1-43.
- Weng-Liu, Teruhiko B y Kei A. (1973). Purification and general properties of the lipase of thermophilic fungus *Humicola lanuginosa* S-38. *Agriculture Biology Chemical*. 37(1):157-163.

- Whitaker J y Dekker M. (1994). Principles of Enzymology for the Food Sciences. 2nd edition. New York, NY.



ANEXOS

A1. Velocidad Radial

Para calcular la velocidad radial de cada cepa, se tomaron medidas a tres diferentes tiempos (72, 96 y 120 h) en tres direcciones diferentes en cada una de las cajas Petri, llevando por duplicado el experimento. Con los datos obtenidos se graficó el valor de los diámetros a través del tiempo y se llevó a cabo una regresión lineal, cuya pendiente obtenida es la velocidad de crecimiento lineal.

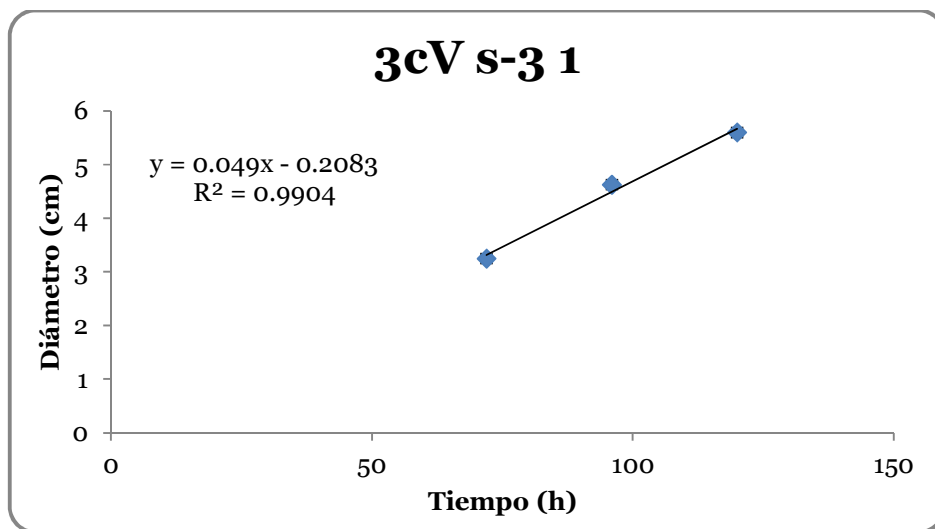


FIG. A1. Velocidad radial para la cepa 3cV s-3 1 en PDA a 50°C

En el ejemplo anterior, la cepa 3cV s-3 1 presenta una velocidad lineal de 0.049 cm/h (1.18 cm/d).

A2. Cálculo de parámetros cinéticos durante la FMS

Los valores de producción de CO₂ obtenidos durante las FMS a tres diferentes temperaturas fueron utilizados para la estimación de variables asociadas al crecimiento. Se calculó la máxima producción de CO₂ (mgCO₂/gms), la tasa específica de producción de CO₂ (μ) (h⁻¹) y la duración de la fase lag (h).

Para el cálculo de la fase lag se graficó la velocidad de producción de CO₂ vs el tiempo; y se llevó a cabo una regresión lineal hasta donde se encontró el primer máximo de la velocidad. La pendiente obtenida es la duración de nuestra fase de adaptación.

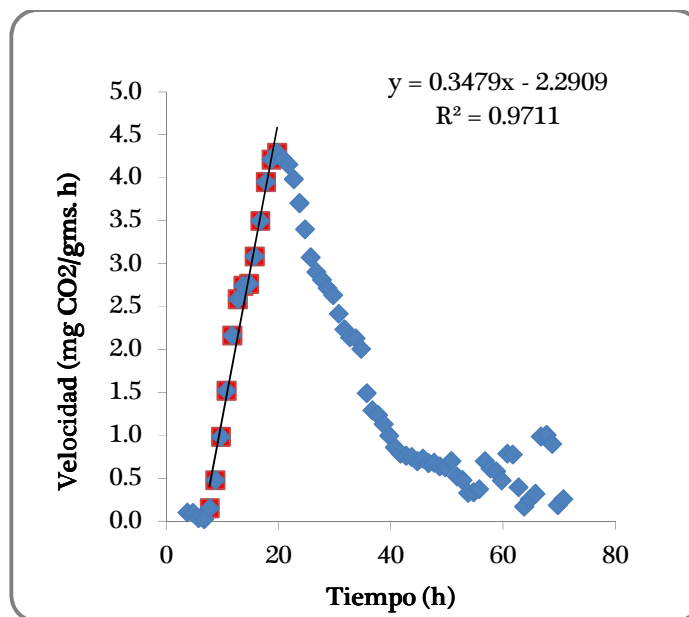


FIG. A2. Velocidad de producción de CO₂ de la cepa 3cV s-3 1 a 50°C.

La tasa específica de producción de CO₂ (μ) fue calculada para cada tiempo como una relación entre la velocidad de producción de CO₂ entre el CO₂ producido. Al final se

reportó el máximo valor de μ obtenido para cada cepa a las diferentes temperaturas de fermentación.

Por último, para el caso de la máxima producción de CO_2 , se fue sumando el CO_2 producido a cada tiempo.

A3. Curva estándar de *p*-Nitrofenol

Se preparó una solución madre 10 mM de *p*-Nitrofenol (*p*NF) en 2-propanol y a partir de ella se llevaron a cabo 10 diluciones 1:1 con buffer Tris-HCl 100 mM y 0.25% PVA (pH 8). Todo esto por duplicado.

Se midió la absorbancia de las muestras a 405 nm en un lector de placas Elisa (ELx808 BioTek®). Los valores obtenidos de absorbancia *versus* concentración de *p*NF (mmol mL⁻¹) se graficaron y se realizó un ajuste de datos por regresión lineal simple. A partir de la pendiente se determinó el coeficiente de extinción molar ($\epsilon = 6.8289 \text{ cm}^2 \text{ mmol}^{-1}$).

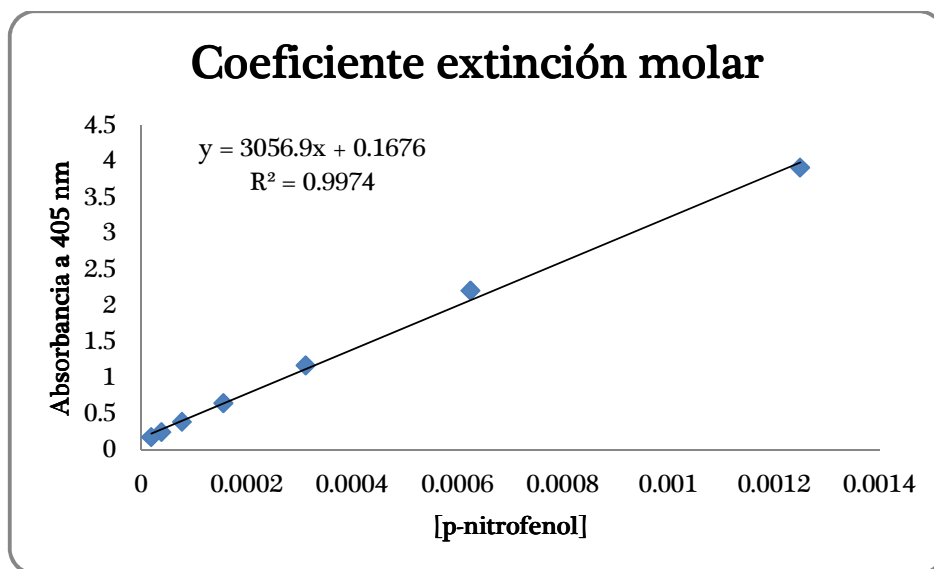


FIG. A3. Curva de *p*-nitrofenol en equipo ELx808TM BioTek® a pH 8 y 30°C.

A4. Balance Carbono en el medio Pontecorvo 3(X) para FMS

Este medio de cultivo, tiene en su composición dos componentes que funcionan como fuente de Carbono: Glucosa (86.4 g/L) y aceite de Oliva (21.6 g/L), este último, además de fuente de carbono, cumple la función de inductor.

Glucosa (PM= 180 g/mol; 72 g C/ mol):

$$\frac{86.4 \text{ g Glucosa}}{\text{L medio}} \times \frac{72 \text{ g C/mol}}{180 \text{ g/mol}} = 34.56 \text{ g C/ L}$$

Aceite de oliva (tomando el ácido oleico como el 100% de su composición, cuyo PM=282 g/mol; 216 g C/ mol):

$$\frac{21.6 \text{ g ácido oleico}}{\text{L medio}} \times \frac{216 \text{ g C/mol}}{282 \text{ g/mol}} = 16.54 \text{ g C/ L}$$

Teniendo como Carbono total:

$$(34.56 + 16.54) \text{ g C/ L} = \mathbf{51.10 \text{ g C/ L}}$$

Si se toma en cuenta que por cada gramo de agrolita se adiciona 1.85 mL de medio de cultivo, se tiene la siguiente relación:

$$\frac{1.85 \text{ mL medio}}{\text{gms}} \times \frac{51.10 \text{ mg C}}{\text{mL medio}} = \mathbf{94.54 \frac{\text{mg C}}{\text{gms}}}$$

A5. Efecto de la temperatura en la estabilidad enzimática

A continuación se presenta el comportamiento de los extractos enzimáticos de las diez cepas seleccionadas, con respecto a su termoestabilidad.

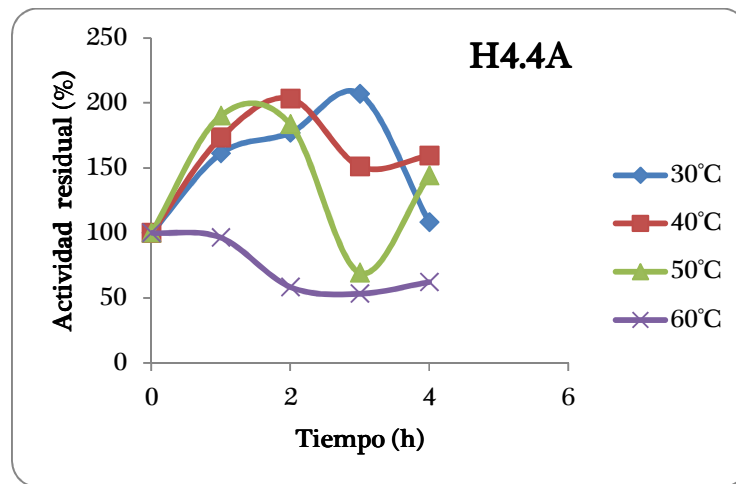


FIG. A5.1. Estabilidad térmica del extracto enzimático producido por la cepa H4.4A a diferentes temperaturas (30-60°C)

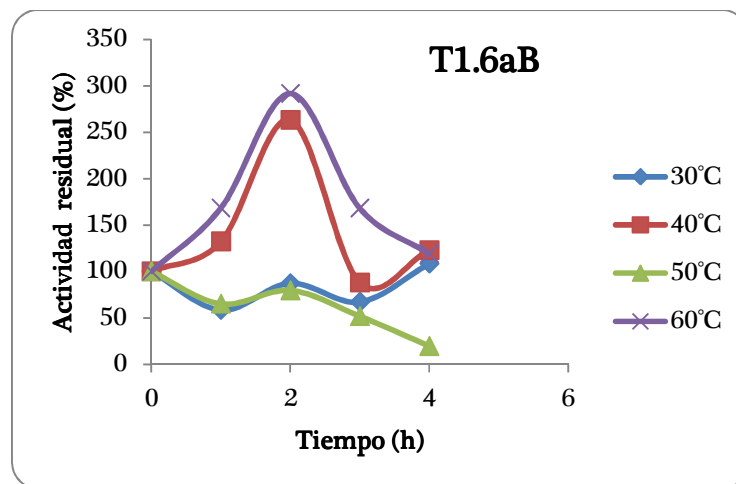


FIG. A5.2. Estabilidad térmica del extracto enzimático producido por la cepa T1.6aB a diferentes temperaturas (30-60°C)

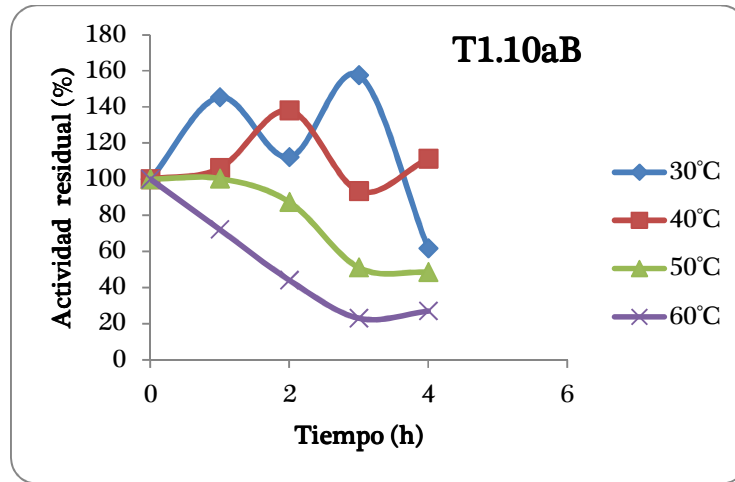


FIG. A5.3. Estabilidad térmica del extracto enzimático producido por la cepa T1.10aB a diferentes temperaturas (30-60°C)

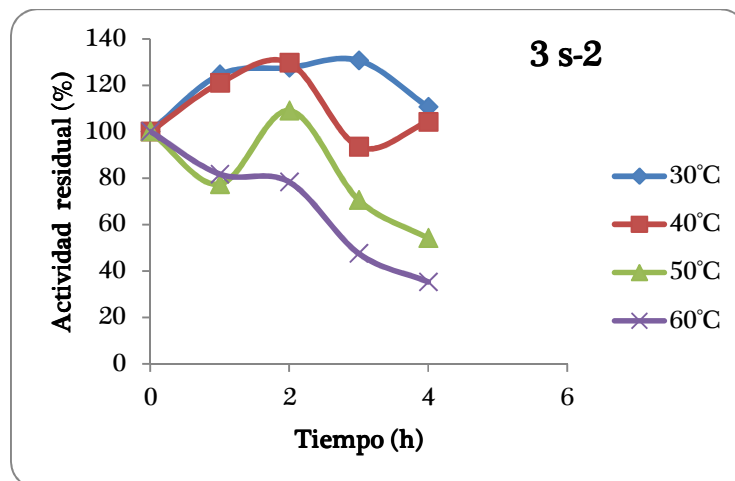


FIG. A5.4. Estabilidad térmica del extracto enzimático producido por la cepa 3 s-2 a diferentes temperaturas (30-60°C)

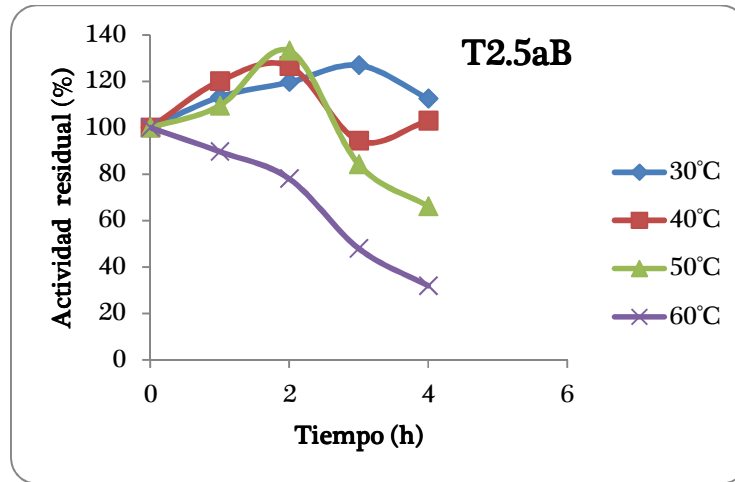


FIG. A5.5. Estabilidad térmica del extracto enzimático producido por la cepa T2.5aB a diferentes temperaturas (30-60°C)

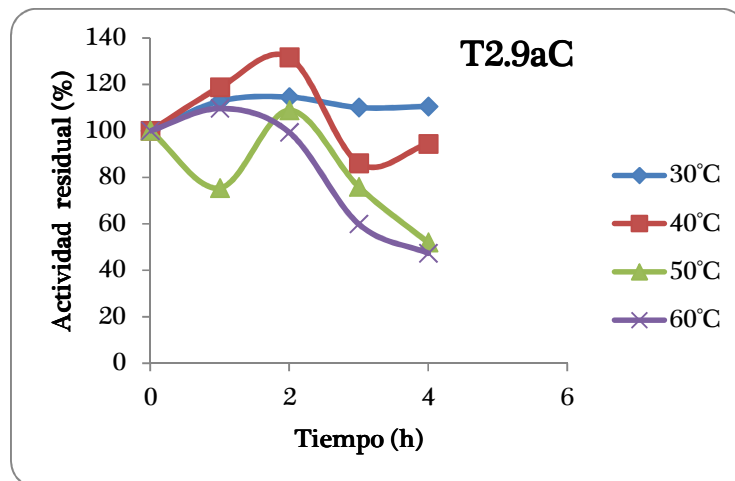


FIG. A5.6. Estabilidad térmica del extracto enzimático producido por la cepa T2.9aC a diferentes temperaturas (30-60°C)

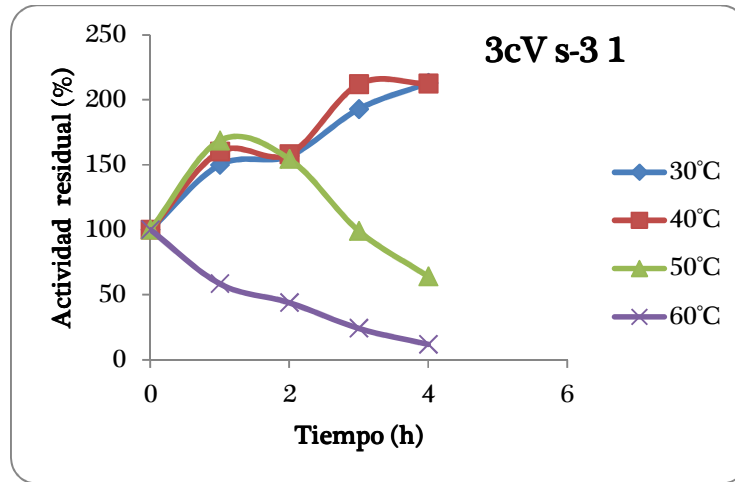


FIG A5.7. Estabilidad térmica del extracto enzimático producido por la cepa 3cV s-3 1 a diferentes temperaturas (30-60°C)

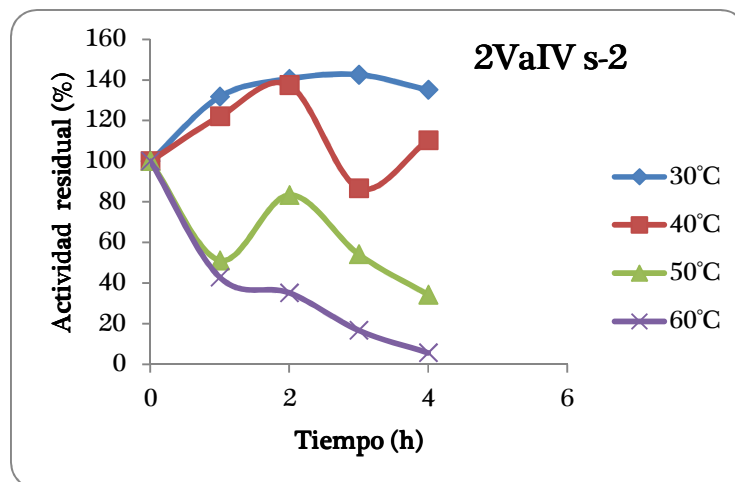


FIG. A5.8. Estabilidad térmica del extracto enzimático producido por la cepa 2VaIV s-2 a diferentes temperaturas (30-60°C)

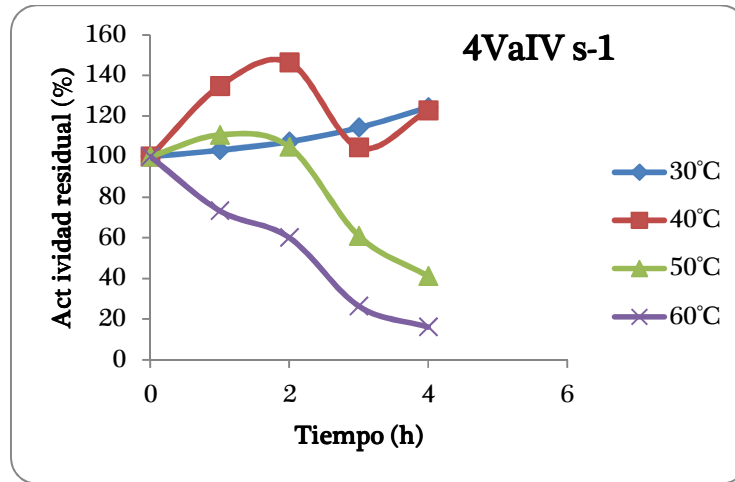


FIG. A5.9. Estabilidad térmica del extracto enzimático producido por la cepa 4VaIV s-1 a diferentes temperaturas (30-60°C)

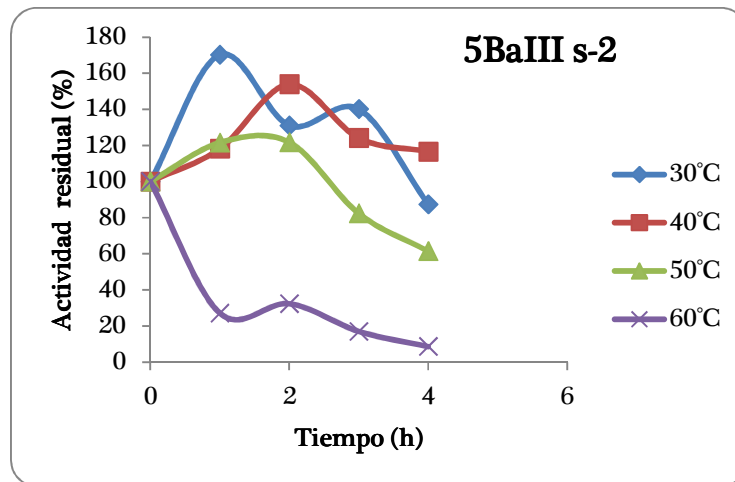


FIG. A5.10. Estabilidad térmica del extracto enzimático producido por la cepa 5BaIII s-2 a diferentes temperaturas (30-60°C)