

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA

ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS



Tesis:

**“EVALUACION Y SELECCIÓN DE UNA MEJOR CEPA PRODUCTORA DE
ENZIMAS LIPASAS”**

Presentada por:

ANAHI GAYOSSO ESPINDOLA

Tesis presentada como requisito parcial para obtener el
título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Buenavista Saltillo, Coahuila, México

Noviembre, 2012

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

"EVALUACION Y SELECCIÓN DE UNA MEJOR CEPA PRODUCTORA DE ENZIMAS LIPASAS"

Presentada por:
ANAHI GAYOSSO ESPINDOLA

TESIS:
Que Se Somete a Consideración del H. Jurado Examinador Como Requisito Parcial Para

Obtener Título de:
INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

El presente trabajo ha sido evaluado y aprobado por el siguiente comité:



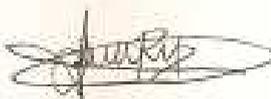
Dr. Mario Alberto Cruz Hernández
Director



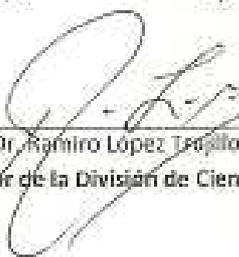
Dra. Ruth E. Belmares Cerda
Codirector



Dra. Ana Verónica Charles Rodríguez
Sinodal



Q.F.B. Alejandra Rodríguez Gutiérrez
Sinodal



Dr. Raimiro López Tejillo
Coordinador de la División de Ciencia Animal



Buenvista, Saltillo Coahuila, México
Noviembre de 2012

DEDICATORIAS

A MI HIJO, PANCHITO (+) que es lo más hermoso que DIOS me dio y que he tenido en la vida no tengo palabras para agradecerle lo inmensamente que fui feliz con él. Donde quiera que yo este, tu vas estar y como un ángel cuidarás de mi te quiero mucho mi pequeño siempre tendrás un lugar muy especial en mi corazón y en mi vida porquetú eres todo para mí.

MIS PADRES, quienes han sido un ejemplo en esta vida y que han luchado junto con migo contra todo y siempre encuentran salida a todo problema que se presenta en el camino y que tratan de darnos todo lo que pueden, para lograr nuestro sueños que también son de ustedes gracias por todo su amor y confianza que me dieron, a ti Arnulfo Gayosso Rosales(+) donde quiera que estés espero que cuides de nosotros y compartas nuestras alegrías y quiero que sepas que aquí tienes un lugar muy especial , a ti Elvira Espindola Vargas que has sido una mujer fuerte y nos has enseñado a sonreír aunque estemos en medio de una tormenta los quiero mucho.

MIS HERMANAS(NOS) Cris, Claris, Neto, Raúl, Sixto, quienes siempre han estado con migo en las buenas y en las malas muchísimas gracias por todo.

MI SOBRINA, brisa que es como mi hija gracias mi niña por darme todo tu cariño y siempre será correspondido sabes que siempre cuentas con migo y siempre voy a estar ahí cuando me necesites.

AGRADECIMIENTOS

Le doy gracias a dios y a la vida por permitir realizar mis sueños

Debo agradecer de manera especial y sincera al Dr.Mario Alberto Cruz Hernández por aceptarme para realizar esta tesis bajo su dirección. Su apoyo y confianza en mi trabajo y su capacidad para guiar mis ideas ha sido un aporte invaluable, no solamente en el desarrollo de esta tesis, sino también en mi formación. Le agradezco también el haberme facilitado siempre los medios suficientes para llevar a cabo todas las actividades propuestas durante el desarrollo de esta tesis. Muchas gracias

A mis asesores: Dra. Ruth E. Belmares Cerda, Dra. Ana Verónica Charles Rodríguez,QFB. Alejandra Rodríguez Gutiérrez, por la colaboración de revisión y asesoría de este trabajo porque sin su apoyo no hubiera sido posible la culminación de este trabajo. Muchas gracias.

A todos los compañeros del laboratorio de Ingeniería Química especialmente Lulú y al Dr. Julio quien siempre me han apoyado y brindado su confianza. Muchas gracias

A la empresa de NANOINGREDIENTES BIOACTIVOS, S.A. DE C.V. por su apoyo.Gracias

A todos mis amigos: Cyntia, Antonia, Bty, Carina, Paty, Rafael. Muchas gracias

Francisco Barragan por estar conmigo en todos los momentos mas felices y mas difíciles de mi vida. Muchas Gracias

INDICE

RESUMEN	6
1. INTRODUCCIÓN	7
2. OBJETIVOS	10
2.1 OBJETIVO GENERAL	10
2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	10
3. HIPOTESIS	11
4. JUSTIFICACION	12
5. ANTECEDENTES	13
5.1 LIPASAS.....	13
5.2 PRODUCCIÓN DE LIPASAS	16
5.3 MICROORGANISMOS UTILIZADOS EN LA PRODUCCIÓN DE LIPASAS	17
5.4 PROPIEDADES DE LAS LIPASAS.	19
5.5 APLICACIONES.....	20
6. MATERIALES Y METODOS	22
6.1 ETAPA I: CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE ENZIMAS LIPASAS	22
6.1.1 IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE LIPASAS POR EL MÉTODO DE RODAMINA B.	23
6.2. ETAPA 2: SELECCIÓN DE LA MEJOR CEPA PRODUCTORA DE LIPASAS	23
6.2.1 DETERMINACION DE LA VELOCIDAD DE CRECIMIENTO RADIAL (V_{cr}).....	23
6.2.2 PREPARACIÓN DEL INOCULO	24
6.2.3 FERMENTACIÓN	25
6.2.4 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ENZIMATICO CRUDO (EEC)	26
6.2.5 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMATICA	26
6.2.6 DETERMINACION DE BIOMASA	27
6.3 ETAPA 3: CINETICA DE PRODUCCIÓN DE LIPASA	27
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
7.1 CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE LIPASAS.	28
7.2 SELECCIÓN DE LA MEJOR CEPA PRODUCTORA DE LIPASAS.....	30
7.3 EVALUACIÓN CINÉTICA DE LA PRODUCCIÓN DE LIPASAS POR <i>ASPERGILLUS NIGER</i>	36
8. CONCLUSIONES	39
9. REFERENCIAS	40

RESUMEN

En este presente trabajo se estudiaron 8 microorganismos correspondientes a la colección del Departamento de Investigación en Alimentos (DIA-UAdeC), las cuales fueron aisladas de la zona del semidesierto de Coahuila. Se identifico microscópicamente los hongos posiblemente productores de lipasas y de igual manera se llevo a cabo por medio del método de hidrólisis de triacilglicerol en presencia de Rodamina B, para seleccionar las mejores cepas productoras de lipasas se hizo por velocidad de crecimiento radial y actividad encimatica. Por último se realizo una cinética para seleccionar una cepa mejor. De los 8 hongos estudiados se obtuvo que la cepa con una mayor actividad lipolítica y mayor velocidad de producción de lipasa fue la cepa *Aspergillus niger*GH1. Con condiciones de pH 6, a 30°C a una velocidad de agitación de 130rpm con una concentración de esporas de 1×10^7 esp/mL usando como fuente de carbono aceite de oliva de 2%.

Palabras clave: identificación de microorganismos, lipas, producción.

1. INTRODUCCIÓN

La presencia de lipasas ha sido observada desde 1901 en *Bacillus prodigiosus*, *B. pyocyaneus* y *B. fluorescens* (Eijkman, 1901), Las enzimas encargadas de hidrolizar triglicéridos han sido estudiadas por más de 300 años, pero la habilidad de las lipasas para catalizar la hidrólisis y también sintetizar esteres ha sido reconocido desde hace apenas 70 años (Van Der Walle, 1927). Las lipasas difieren en varias de sus propiedades, éstas dependen de su origen (el cual puede ser fúngico, bacteriano, de mamíferos, etc.).

Las lipasas (EC 3. 1. 1. 3) hidrolizan triglicéridos a ácidos grasos y glicerol, y bajo ciertas condiciones catalizan la reacción inversa. Algunas de estas enzimas son también capaces de catalizar reacciones de transesterificación e hidrólisis enantioselectivas (Pokorny D y cols,1994). Estas enzimas hidrolíticas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y están presentes en los procesos metabólicos degradativos de algunas plantas y animales. Ellas son producidas por un gran número de microorganismos a partir de los cuales se obtienen usualmente para fines comerciales, un ejemplo típico lo son las lipasas producidas por los hongos *AspergillusnigeryA. fumigatus* (Schmid RD y col,1998).

El interés por estas 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 MJ y cols,1999), modificación de grasas y otros lípidos por hidrólisis y esterificación (Kazlauskas R,1994).

Los problemas asociados al uso sistemático y controlado de las enzimas no se encuentran totalmente resueltos(Hofelmann M y cols,1985 y Guisan JM y cols,1998).Tanto la composición de la enzima como las condiciones empleadas para su procesamiento, pueden ser determinantes en las propiedades catalíticas de la misma y en los diversos resultados que se puedan obtener. El conocimiento de nuevos microorganismos productores de enzimas lipasas y de la diversidad de condiciones necesarias para la producción de las mismas, son de gran utilidad si se desean emplear para cualquiera de los fines antes mencionados, y debe ser por tanto, el fundamento de todo estudio.

El presente trabajo tiene como objetivo evaluar y seleccionar una cepa productora de enzima lipasas obtenidas del proceso de fermentación fúngica en estado líquido, que permita ser utilizada en futuros trabajos de investigación, tales como encapsulación o microencapsulación para su posible aplicación en personas con problemas de obesidad o mala digestión.

Como se menciona anteriormente las nuevas tecnologías que permitan incrementar la producción de enzimas lipasas, así como, su actividad es uno de los temas que son más estudiados en la actualidad.

Dentro de estos procesos; podemos mencionar a la encapsulación que empezó a desarrollarse entre 1930 y 1940 por la National Cash Register (NCR), en Ohio, EEUU, para la aplicación comercial de un tinte a partir de gelatina como agente encapsulante. La aplicación en alimentos es más reciente, debido sobre todo a un abaratamiento de la tecnología, que ha despertado el interés de la industria alimentaria. Este proceso permite, en función de la tecnología aplicada, encapsular nutrientes para que no sean atacados, degradados u oxidados, así como enzimas o células completas, permitiendo que los sustratos y productos entren y salgan de la cápsula.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar y seleccionar la mejor cepa productora de enzima lipasas para caracterizarla en cuanto a su actividad enzimática.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Identificar y seleccionar microorganismos productores de lipasas por el método de hidrólisis de triacilglicerol en presencia de rodamina B.
- Medir la actividad lipolítica de los microorganismos seleccionados por fermentación en medio líquido por el método de espectrofotometría utilizando paranitrofenil propianato como sustrato.
- Evaluación cinética de la producción de la enzima lipasa por la cepaseleccionada.

3. HIPOTESIS

Al menos un microorganismo evaluado por el método de la Rodamina B tendrá la capacidad de producir la enzima lipasa y será seleccionado cinéticamente por su alta actividad enzimática.

4. JUSTIFICACION

Una de las principales necesidades que este proyecto engloba de manera general es el potencial de utilización de enzimas tecnológicamente mejoradas, tales como la encapsulación que puede ser a futuro una herramienta que llegue a solucionar problemas como la obesidad y la mala digestión mediante la administración de enzimas lipasas obtenidas a partir de hongos como: *Aspergillus* que fueron aislados principalmente de la zona semidesértica de nuestro País y que puedan ser ingeridos por nuestra población Mexicana mediante un vehículo.

En la región semidesértica del norte de México existe una gran diversidad de microorganismos capaces de producir lipasas con potencial aplicación en diversas áreas como alimentos, farmacia, detergentes y entre otros. Las lipasas producidas por los microorganismos aislados presentarán propiedades de gran interés para las industrias alimentaria y farmacéutica. El gran potencial que presenta la gran biodiversidad de la región semidesértica del Estado de Coahuila de Zaragoza no ha sido explotado en referencia al aislamiento de cepas capaces de producir lipasas fúngicas los cuales pueden presentar ventajas enormes sobre las ya reportadas.

En el presente trabajo se pretende obtener una cepa de *A. niger* aislada del semidesierto del estado de Coahuila que presente la mayor actividad lipolítica y obtener las mejores condiciones cinéticas de producción para que sea aplicada en la industria de los alimentos.

5. ANTECEDENTES

5.1 LIPASAS

La presencia de lipasas ha sido observada desde 1901 en gran variedad de microorganismos, pero una de las primeras fuentes fueron las especies *Bacillus prodigiosus*, *B. pyocyaneus* y *B. fluorescens* (Rivera-Pérez, C. y García-Carreño, F. (2007), las lipasas producidas por estos microorganismos han sido estudiadas a detalle. Las enzimas encargadas de hidrolizar triglicéridos han sido estudiadas por más de 300 años, pero la habilidad de las lipasas para catalizar la hidrólisis y también sintetizar ésteres ha sido reconocido desde hace apenas 70 años (Rivera-Pérez, C. y García-Carreño, F. 2007).

Las lipasas, o enzimas lipolíticas (triacilglicerol ester hidrolasas EC 3.1.1.3) son parte de la familia de las hidrolasas, catalizan la hidrólisis de triglicéridos (Figura 5.1) en la interfase aceite-agua y son estables en solventes orgánicos (Rohit y cols. 2001).

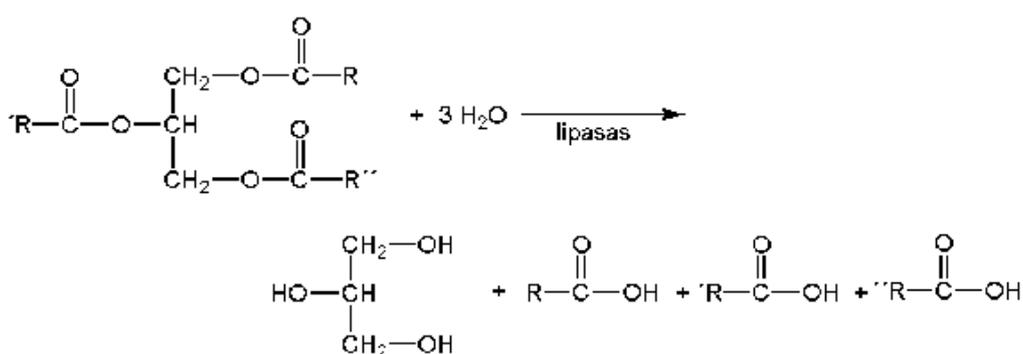


Figura 5.1 Hidrólisis de triglicéridos.

Además de su rol fisiológico en la hidrólisis de grasas neutras, las lipasas catalizan la hidrólisis o síntesis enantio- y regio-selectiva de una amplia variedad de sustratos naturales tales como soya, aceite de pescado, ricino y frutas cítricas (Rivera-Pérez, C. y García-Carreño, F.2007), así mismo pueden llevar a cabo la esterificación, interesterificación y transesterificación en medios no acuosos (Coca J y cols,2001;Coca,J y Dustet,C 2006;Gutiérrez-Alvarado y col,2009;Houde, A y col,2004;Marini, A y col,2011)

Las lipasas constituyen uno de los grupos más importantes de biocatalizadores con aplicación biotecnológica, con éxito en la síntesis de biopolímeros, biodiesel, agroquímica, en la elaboración de detergentes, cosméticos y confitería. También se usan en la producción de enantiómeros farmacéuticos para terapia médica de reemplazo, como por ejemplo en la administración de lipasa pancreática de cerdo en casos de insuficiencia pancreática exocrina (Schmid y col.1998).

La mayoría de las lipasas microbianas son extracelulares y, usualmente, las células se descartan después de la fermentación tras centrifugación o filtración. Para concentrar el extracto enzimático se puede ultrafiltrar, precipitar con sulfato de amonio o extraer con solventes orgánicos. Como técnica de purificación, generalmente se emplea la combinación de varios métodos cromatográficos como filtración en gel, interacción hidrofóbica o intercambio iónico. Nuevas técnicas como la utilización de membranas y los sistemas de dos fases e inmunopurificación se han ido gradualmente utilizando, en la vanguardia de la purificación de lipasas (Saxena y col, 2003).

Entre los beneficios particulares que ofrece el uso de las lipasas, se pueden destacar el aumento en la especificidad de reacción, presentar actividad a condiciones de temperatura y pH moderadas, además de la baja generación de residuos.

Las lipasas están presentes ampliamente en la naturaleza, en plantas, animales y microorganismos. En células vegetales, las lipasas se encuentran en organelos celulares de reserva de energía como las mitocondrias (Rohit y col. 2001) y en animales son encontradas en el páncreas (Hasan y col. 2006). En las células microbianas las lipasas intervienen en procesos metabólicos de lípidos como degradación, absorción, reconstrucción y metabolismo lipoproteínico (Rohit y col. 2001).

Las lipasas difieren en varias de sus propiedades, éstas dependen de su origen (el cual puede ser fúngico, bacteriano, de mamíferos, etc.), ellas catalizan la hidrólisis o síntesis de una gran variedad de esteres carboxílicos y liberan ácidos orgánicos y glicerol. Todas ellas muestran una alta especificidad sobre los sustratos.

La producción de lipasas está influenciada por el tipo y concentración de la fuente de carbono y de nitrógeno, el pH del cultivo, la temperatura de crecimiento y la concentración de oxígeno disuelto (Elibol y Ozer. 2001). El uso de carbono lipídico parece ser generalmente esencial para obtener una alta producción de lipasa, además, muy pocos autores han observado buena producción de lipasas en ausencia de grasas o aceites (Sharma R y col. 2001).

5.2 PRODUCCIÓN DE LIPASAS

Las primeras lipasas utilizadas provenían del páncreas de los animales, generalmente cerdos, de aquí su nombre de lipasa pancreática, pero en los últimos tiempos se han encontrado potenciales fuentes de lipasas en un gran número de microorganismos que abarcan hongos (*Penicillium*, *Rhizopus*, *Rhizomucor*, *Geotrichum*, *Aspergillus spp*) levaduras (*Candida*) y bacterias (*Pseudomonas*) que son las más destacadas en cuanto a producción industrial (Montesinos Segui, J. L.,1993;Pokorny, D,1994;Sánchez Ferrer, A.2008)

En algunas publicaciones hacen mención que hay microorganismos potenciales productores de lipasas, lo que repercute en una diversificación de las investigaciones que no ocurría si existiera un número reducido, y por consiguiente no se conoce en profundidad cuales son los mecanismos de producción de la enzima ya que dependerá del microorganismo utilizado (Montesinos Segui, J. L.,1993).

En los años 60 y 70 la producción de enzimas y en concreto de lipasas, fueron en Erlenmeyer. El seguimiento en este tipo de procesos de datos esenciales para la fermentación como el pH, la temperatura y el oxígeno disuelto son realizados fuera de línea, lo que provoca una incertidumbre en los datos, así como impide una actuación inmediata. Las enzimas son producidas principalmente por fermentaciones en medios líquidos (FL) o sólidos (FMS) (Córdoba López, J.y Roussos S,2001).

En la década de los 80 se comienzan a introducir los primeros birreactores en los laboratorios de investigación como equipos específicos para realizar fermentaciones, en

los que se efectúa una monitorización en línea de las variables anteriormente mencionadas (Montesinos Segui, J.L.1993).

Factores del medio ambiente como el pH y la temperatura, muestran una alta influencia en el crecimiento y excreción de lipasas microbianas. Por lo general, la producción de lipasa es estimulada por lípidos (Sánchez Ferrer, A.2008). La actividad de la lipasa está fuertemente inducida por una amplia gama de acil esterres incluyendo triglicéridos, Tween, etc. Y se reprime por los ácidos grasos de cadena larga, incluyendo el ácido oleico. La fuente de nitrógeno en el medio determina los niveles de producción de lipasa (Rajendran, A,2009).

Por lo general hongos y bacterias son la opción para la producción comercial de lipasa. La producción de lipasa extracelular depende de varias condiciones de cultivo tales como nitrógeno, carbono, inductor de lípidos, presencia de sales inorgánicas, la disponibilidad de oxígeno disuelto y la aireación (Rajendran, A,2009;Sánchez Ferrer, A.2008).

5.3 MICROORGANISMOS UTILIZADOS EN LA PRODUCCIÓN DE LIPASAS

Una extensa variedad de microorganismos son capaces de producir lipasas, lo que permite tener un amplio rango de propiedades lipolíticas con respecto a una posición específica, especificidad de ácidos grasos, temperatura, pH óptimos y termoestabilidad. Algunos de los microorganismos utilizados se enlistan en la tabla 5.3.

Tabla 5.3. Microorganismos productores de lipasas (Sharma Ry col. 2001).

Hongos			Ito <i>et al.</i> 2001	
		<i>P. aeruginosa</i> KKA-5	Sharon <i>et al.</i> 1998	
		<i>P. cepacia</i>	Penereac'h y Baratti. 1996; Lang <i>et al.</i> 1998; Hsu <i>et al.</i> 2000	
		<i>P. fluorescens</i>	Maragoni. 1994; Lacointe <i>et al.</i> 1996	
		<i>P. fluorescens</i> MF0	Guillou <i>et al.</i> 1995	
		<i>P. fragi</i>	Mencher y Alford. 1967	
		<i>P. glumae</i>	Frenken <i>et al.</i> 1993; Noble <i>et al.</i> 1994	
		<i>P. mendocina</i>	Jaeger y Reetz. 1998	
		<i>P. putida</i> 3SK	Lee y Rhee. 1993	
		<i>P. pseudoalcaligenes</i> F-111	Lin <i>et al.</i> 1995, 1996	
		<i>Pseudomonas</i> sp.	Sin <i>et al.</i> 1998; Miyazawa <i>et al.</i> 1998; Reetz y Jaeger. 1998; Dong <i>et al.</i> 1999	
		<i>Pseudomonas</i> sp. KWI56	Yang <i>et al.</i> 2000	
		<i>Acremonium</i>	<i>A. strictum</i>	Okeke y Okolo. 1990
		<i>Alternaria</i>	<i>A. brassicicola</i>	Berto <i>et al.</i> 1997
		<i>Aspergillus</i>	<i>A. carneus</i>	Helisto y Korpela. 1998
			<i>A. flavus</i>	Long <i>et al.</i> 1996, 1998
			<i>A. fumigatus</i>	Satyanarayan y Johri. 1981
			<i>A. japonicus</i>	Satyanarayan y Johri. 1981
			<i>A. niger</i>	Chen <i>et al.</i> 1995
			<i>A. nidulans</i>	Mayordomo <i>et al.</i> 2000
	<i>A. oryzae</i>		Ohnishi <i>et al.</i> 1994a,b	
	<i>A. repens</i>		Kaminishi <i>et al.</i> 1999	
	<i>Beauveria</i>	<i>B. bassiana</i>	Hegedus y Khachatourians. 1988	
	<i>Eurotrium</i>	<i>E. herbanorium</i>	Kaminishi <i>et al.</i> 1999	
	<i>Fusarium</i>	<i>F. oxysporum</i>	Rapp. 1995	
Hongos	<i>Geotrichum</i>	<i>G. candidum</i>	Sugihara <i>et al.</i> 1994; Ghosh <i>et al.</i> 1996	
		<i>Geotrichum</i> sp	Macedo <i>et al.</i> 1997	
	<i>Mucor</i>	<i>M. circinelloides</i>	Balcão <i>et al.</i> 1998	
		<i>M. hiemalis</i>	Ghosh <i>et al.</i> 1996	
		<i>M. javanicus</i>	Ishihara <i>et al.</i> 1975	
		<i>M. miehei</i>	Rantakyla <i>et al.</i> 1996; Lacointe <i>et al.</i> 1996; Plou <i>et al.</i> 1998	
		<i>M. racemosus</i>	Ghosh <i>et al.</i> 1996	

Por lo tanto, en los últimos años, el estilo de vida adoptado por la sociedad ha obligado al ser humano a buscar nuevas alternativas en sus hábitos alimenticios a través de exhaustivos estudios científicos, logrando así la innovación de productos funcionales capaces de combatir desordenes en la salud. El presente trabajo pretende evaluar y seleccionar microorganismos capaces de producir la enzima lipasa con la finalidad de aplicarsea futuro en nuevos productos para el sector alimenticio y de la salud que vengan a solucionar problemas de obesidad o mala digestión.

5.4PROPIEDADES DE LAS LIPASAS.

Hace aproximadamente un siglo, el microbiólogo C. Eijkmann reportó que ciertas bacterias producían lipasas cuya actividad era la hidrólisis del enlace éster en los triacilglicéridos, empleando como medio de reacción sistemas acuosos. Sin embargo, posteriormente se observó que permanecían activas en solventes orgánicos y se comenzaron a desarrollar estudios, elucidando su aplicación como una herramienta en la química orgánica; por lo cual, ahora se conocen algunas propiedades catalíticas que las caracterizan de otras enzimas. Generalmente 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 lo que, 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 Eggert, 2002).

5.5 APLICACIONES.

Sus aplicaciones se encuentran en muchas áreas de la biotecnología debido a su capacidad para catalizar diversas reacciones de hidrólisis y síntesis, sus propiedades enantioselectivas, su baja especificidad de sustratos y su estabilidad en diversas condiciones de temperatura y pH (Lima y col., 2003).

su aplicación más importante ha sido en la industria farmacéutica para la resolución de mezclas racémicas de fármacos y sus precursores (naxopreno e ibuprofeno). Otra aplicación importante es la modificación de grasas y aceites, así como la síntesis de biosurfactantes

Tabla 5.5 algunas de sus aplicaciones (Schmid y Verger, 1998; Rohit y col., 2001; Lima y col., 2003).

INDUSTRIA	FUNCION	Producto o aplicación
Detergentes	Hidrólisis de grasas	Eliminación de manchas de grasa
Lácteos	Hidrólisis y modificación de grasa butírica	Desarrollo de sabores de leche, queso y mantequilla
Panadería	Modificación de sabores	Prolongación de vida de anaquel
Bebidas	Síntesis de aromas	Bebidas frutales
Salsas	Modificación de supropiedades organolépticas	Mayonesas y salsas
Alimentos saludables	Transesterificación	Alimentos bajos en grasas saturadas

CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Cárnicos	Desarrollo de sabores y modificación de grasa animal	Embutidos
Grasas y aceites	Transesterificación: hidrólisis	Mantequilla, margarina y 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

6. MATERIALES Y METODOS

El desarrollo de este trabajo fue realizado en el Departamento de Ingeniería Química de la Facultad de Ciencias Químicas, en conjunto con la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Ubicados en la Ciudad de Saltillo Coahuila, México.

6.1 ETAPA I: CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE ENZIMAS

LIPASAS

En la tabla 6.1 se presentan las cepas evaluadas para la producción de enzimas lipasas. Estos microorganismos fueron donados por el Departamento de Investigación en Alimentos (DIA-UAdeC), las cuales fueron aisladas de la zona del semidesierto de Coahuila.

Tabla 6.1 Cepas evaluadas para la producción de enzimas lipasas.

Cepas
<i>Aspergillus sp</i> NH4
<i>Aspergillus ustus</i> PSS
<i>Aspergillus niger</i> PSH
<i>Aspergillus niger</i> ESH
<i>Aspergillus niger</i> Aa20
<i>Aspergillus niger</i> GH1
<i>Aspergillus sp</i> GS
<i>Aspergillus sp</i> FP390

6.1.1 IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE LIPASAS POR EL MÉTODO DE RODAMINA B.

La identificación de microorganismos productores de lipasas se llevo a cabo por medio del método de hidrólisis de triacilglicerol en presencia de Rodamina B(Müller dos Santos Y col,2003). Se prepararon placas de petri con agar bacteriológico (15 g/L), colorante (0,001 %, m/v), Tween 80[®] (0,001 g.L⁻¹) y aceite de oliva (1%, m/v). Las placas fueron inoculadas en el centro con los microorganismos productores de lipasas. El periodo de incubación fue llevado a cabo por 7 días a una temperatura de 25°C. La producción de la enzima lipasa fue identificada por la formación de un halo fluorescente visible bajo radiación UV (350 nm).

6.2. ETAPA 2: SELECCIÓN DE LA MEJOR CEPA PRODUCTORA DE LIPASAS.

6.2.1 DETERMINACION DE LA VELOCIDAD DE CRECIMIENTO RADIAL (V_{cr})

El crecimiento radial fue evaluado diariamente, las cajas fueron marcadas con los cuatro ejes en la parte inferior externa para seguir el crecimiento de la colonia (Figura 6.2).Las mediciones del crecimiento radial se realizaron del centro a los extremos de la placa.

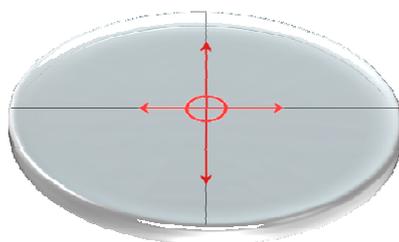


Figura 6.2.1 Imagen ilustrativa del método seguido para la medición de crecimiento radial.

Para la velocidad de crecimiento radial (V_{CR}), se obtuvieron los valores de las pendientes a partir del gráfico de crecimiento contra el tiempo, de la parte lineal de la curva de crecimiento. De esta manera se obtuvieron los valores de la velocidad específica de crecimiento radial o velocidad específica de invasión, la cual se expresó en unidades de longitud por unidad de tiempo (mm h^{-1}).

6.2.2 PREPARACIÓN DEL INOCULO

Las cepas *Aspergillus sp* fueron reactivadas en matraces Erlenmeyer de 250 mL, con 30 mL de medio PDA (39 g/L) incubados a una temperatura de 30°C durante 5 días. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se adicionaron 30 mL de una solución estéril de Tween 80 (0.01 %v/v) para remover las esporas, y se mantuvo en agitación mecánica (Thermolyne, USA) por un tiempo de 10 minutos. La cuantificación de esporas se realizó en una camarilla de Neubauer utilizando la siguiente ecuación:

$$\frac{N_{\text{esporas}}}{\text{mL}} = P_{\text{esporas}} * 25 * f_{\text{dil}} * 1 * 10^4$$

Donde:

$P_{esporas}$ es el promedio de esporas resultantes del conteo realizado en un determinado número de cuadros de la camarilla, f_{dil} es el factor de dilución empleado y $1 * 10^4$ es el factor de conversión volumétrico de la camarilla.

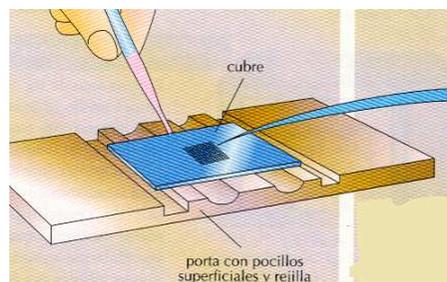


Figura 6.2.2 Conteo celular en cámara de Neubauer

6.2.3 FERMENTACIÓN

El medio de cultivo utilizado para la producción de lipasas fue el medio Czapek-dox. El medio contenía (g/L): NaNO_3 , 2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5; FeSO_4 , 0.01; K_2HPO_4 , 1; KCl, 0.5 y aceite de oliva, 2%. El medio fue ajustado a un pH de 6 y se esterilizó en un autoclave (Sterilmatic STME, USA) a una presión de 15 psi por un tiempo de 15 minutos. La inoculación se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer de 125 mL con 20 mL de medio con una suspensión de esporas de 1×10^7 esp/mL. La incubación se llevó a cabo en un agitador orbital (Inova 94, New Brunswick Scientific, USA), empleando una velocidad de agitación de 130 rpm y una

temperatura de 30 ± 2 °C durante 8 días. Los experimentos fueron llevados a cabo por triplicado.

6.2.4 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ENZIMÁTICO CRUDO (EEC)

Una vez concluido el tiempo de fermentación, las muestras fueron micro filtradas utilizando membranas de $0.45 \mu\text{m}$ (Millipore, USA). El EEC fue recuperado en tubos cónicos (Axygen, USA) para su análisis posterior.

6.2.5 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

La actividad enzimática se llevo a cabo siguiendo la metodología reportada por Guisány cols. (1998). Se agregaron $20 \mu\text{L}$ del reactivo p-NPP 50 mM (acetonitrilo) y 2.5ml buffer de fosfatos 25mM pH 7 a $200 \mu\text{L}$ del extracto enzimático. Posteriormente las muestras de extracto enzimático fueron incubadas a una temperatura de 37°C utilizando un baño de temperatura controlada (Precisión, USA) durante un tiempo de 20 minutos. Enseguida fueron transferidas a un baño de agua fría con el objetivo de detener la reacción. La actividad enzimática fue determinada midiendo la absorbancia en un espectrofotómetro (VE-5600V) a una longitud de onda de 348nm. La reacción fue seguida hasta por un tiempo de 30 minutos, tomando muestra cada 5 minutos. Se realizó una curva patrón de p-nitrofenol de 0-100 ppm. La actividad enzimática se determinó por medición del

incremento de la absorbancia a 348nm producido por la liberación del p-nitrofenol como resultado de la hidrólisis del éster p-nitrofenil propionato.

6.2.6 DETERMINACION DE BIOMASA

La determinación de biomasa se llevó a cabo por el método gravimétrico. El método consiste en llevar la biomasa a peso constante en un horno de secado (Felisa, México) a 110°C por 24 horas.

6.3 ETAPA 3: CINETICA DE PRODUCCIÓN DE LIPASA

Se evaluó cinéticamente la producción de la enzima lipasa por un tiempo de 192 h tomando muestras por triplicado cada 24 h de fermentación. La muestra al tiempo inicial de fermentación (0 hrs) representó la muestra control. Las muestras tomadas para el análisis de la actividad enzimática fueron destructivas.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE LIPASAS.

En la presente etapa se estudió el crecimiento y morfología de los microorganismos estudiados como posibles productores de lipasas (Tabla 6.1). En la Figura 7.1 se presenta el crecimiento a tiempo final de estas cepas. De acuerdo a la Figura, se puede ilustrar que las cepas presentan el crecimiento característico de *Aspergillus sp* y pertenecientes a la colección DIA-UAdeC de acuerdo a lo reportado por Cruz-Hernández y col., (2004).

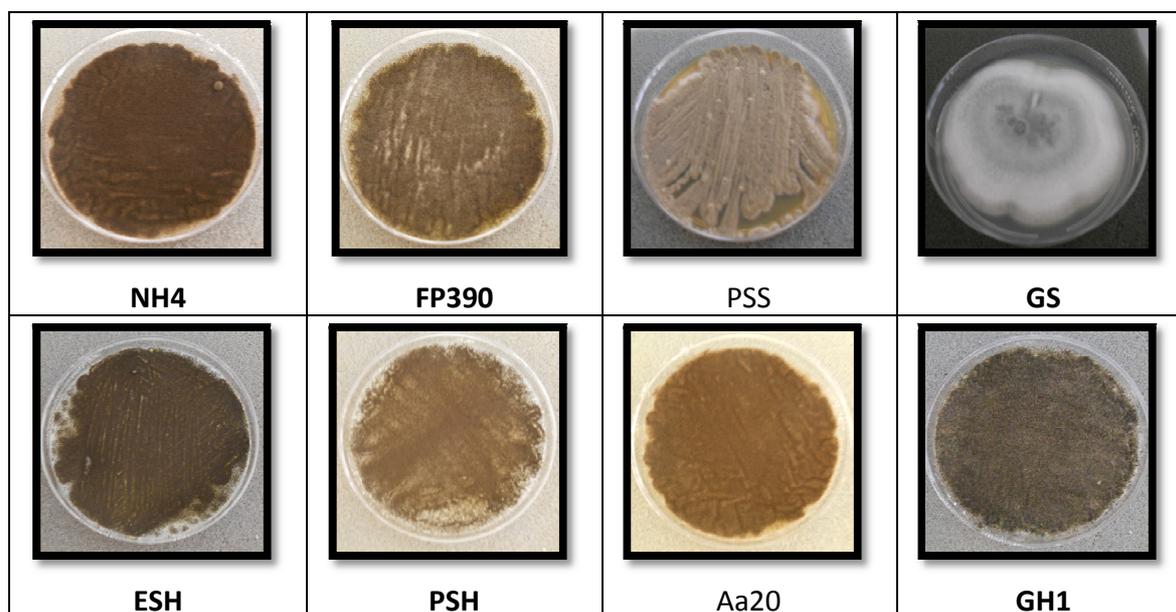


Figura 7.1 Morfología de las cepas evaluadas para la producción de enzimas lipasas.

Se determinaron las características microscópicas de las cepas evaluadas para el presente estudio obteniendo como resultado lo siguiente:

Las características microscópicas del hongo se determinaron en microscopio con objetivo de 40X, se realizaron preparaciones con el colorante de azul de lactofenol en las cuales fue apreciado el aparato reproductor de esta especie, que consta en un conidióforo en forma radial, hifa hialina, vesícula esférica mediana, fiáldes delgadas y largas que se disponen alrededor de la vesícula unidos a estos se encuentran los conidios casi globosos, desprendiéndose por la acción del colorante.

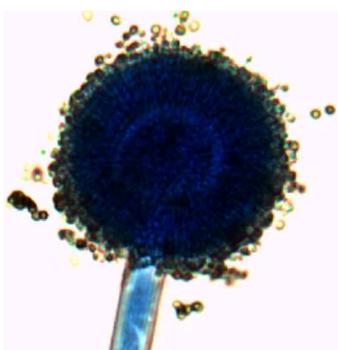


Figura 7.1.1. Microscopía de *Aspergillus niger* con azul de lactofenol.

Así mismo fueron Identificados los microorganismos productores de lipasas por el método de Rodamina B. De acuerdo a los resultados arrojados por esta prueba se determinó que las cepas productoras de la enzima lipasa son aquellas que presentaron la formación de un halo fluorescente visible bajo radiación UV (350 nm). En la Figura 7.2 se puede apreciar que las cepas que presentaron la formación de un halo fluorescente son: *Aspergillus niger* ESH, *Aspergillus niger* PSH, *Aspergillus niger* GH1, *Aspergillus niger* Aa20, *Aspergillus niger*

NH4.

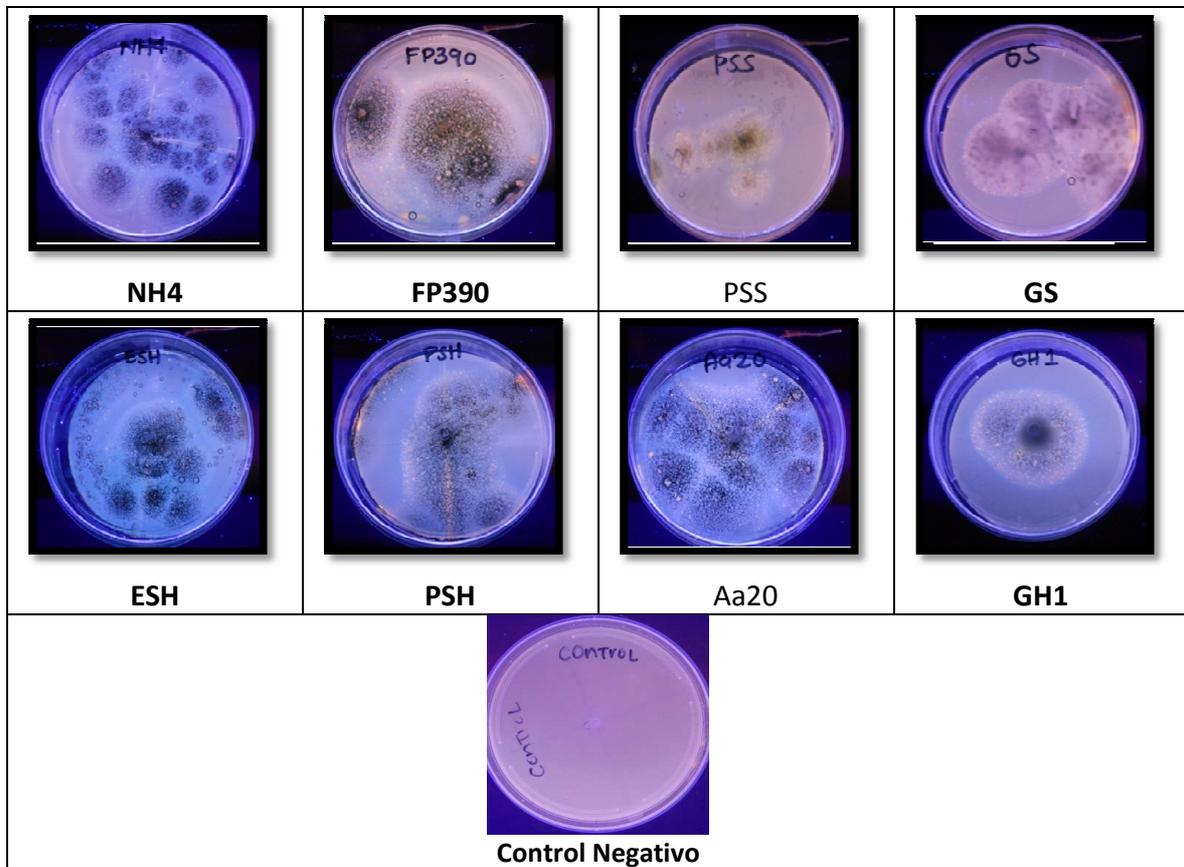


Figura 7.1.2 Imagen ilustrativa de la identificación de microorganismos productores de lipasas por el método de fluorescencia utilizando Rodamina B.

7.2 SELECCIÓN DE LA MEJOR CEPA PRODUCTORA DE LIPASAS.

En la presente etapa se determinó la cepa con mayor capacidad de producción de la enzima lipasa de acuerdo a su velocidad de crecimiento radial y la que presentara mayor actividad enzimática.

La V_{CR} (capacidad de invasión), se obtuvo graficando la relación del crecimiento y tiempo de incubación, donde la pendiente corresponde a la velocidad de crecimiento radial. Para algunas cepas se tomó solo la parte lineal para la obtención de esta pendiente. La Figura 7.2.1 ilustra el perfil de crecimiento radial y la Figura 7.2 resume la velocidad de crecimiento radial para cada una de las cepas evaluadas. En esta Figura se puede apreciar que las cepas con mayor velocidad de crecimiento radial son *Aspergillus sp* NH4, *Aspergillus niger* PSH, *Aspergillus niger* ESH, *Aspergillus niger* Aa20 (0.0298-0.0374 cm/h).

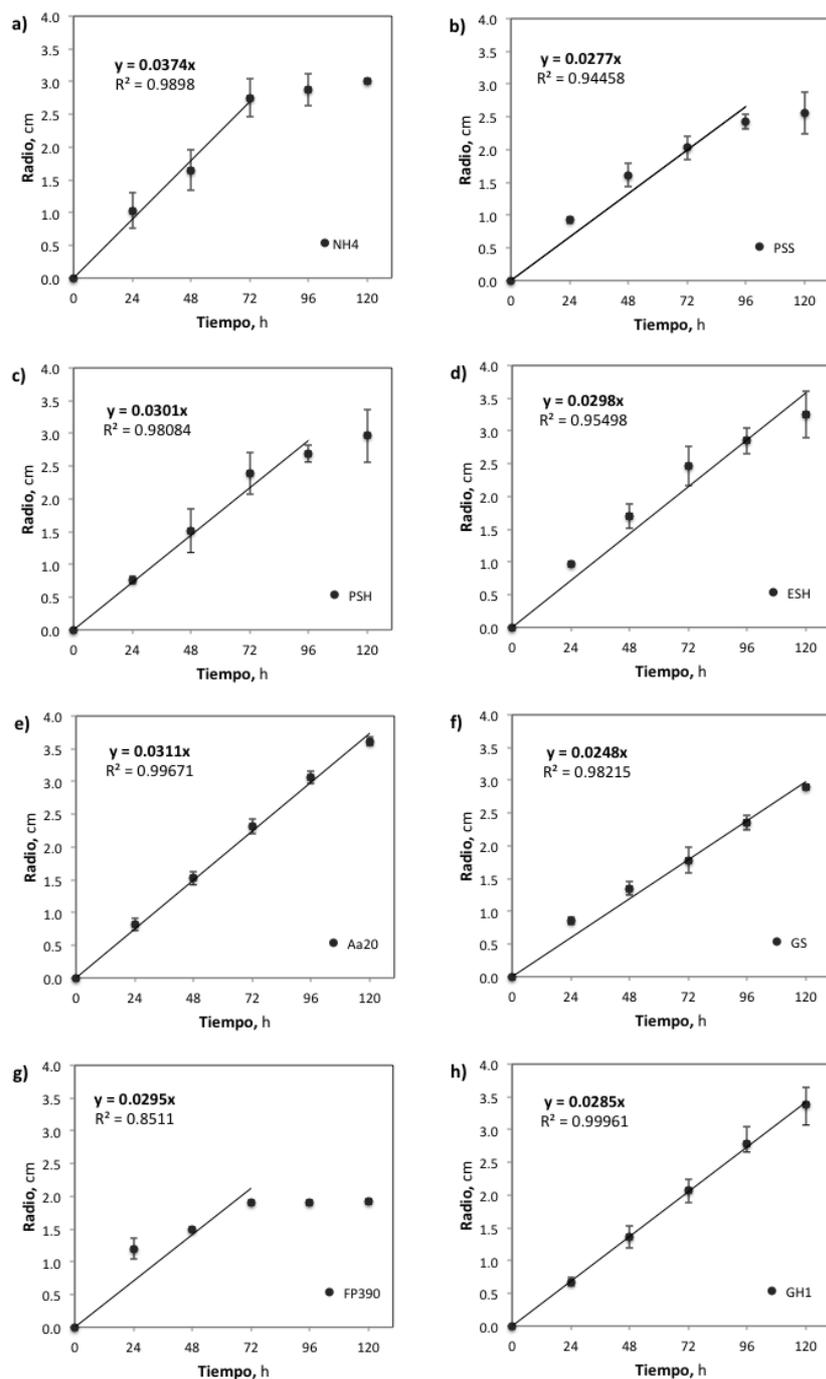


Figura 7.2 Perfil de crecimiento radial de las cepas productoras de lipasas. a) *Aspergillus* sp NH4, b) *Aspergillus ustus* PSS, c) *Aspergillus niger* PSH, d) *Aspergillus niger* ESH, e) *Aspergillus niger* Aa20, f) *Aspergillus* sp GS, g) *Aspergillus* sp FP390 y h) *Aspergillus niger* GH1.

En la Figura 7.2 (a) se muestra claramente como la cepa *Aspergillus sp* NH4 llega a un máximo crecimiento radial de 3 cm, lo cual puede atribuirse a la inhibición del crecimiento, este efecto reduce las posibilidades de producción de la enzima por tiempos más largos por lo tanto fue descartada por las necesidades del proyecto. Todas las cepas seleccionadas presentaron un crecimiento radial por encima de los 3.5 cm. Por lo tanto aun cuando la velocidad de la cepa NH4 es mayor, no presenta un crecimiento adecuado para la producción de la enzima.



Figura 7.2.1 Imagen ilustrativa de crecimiento radial evaluado en las cepas productoras de lipasas.

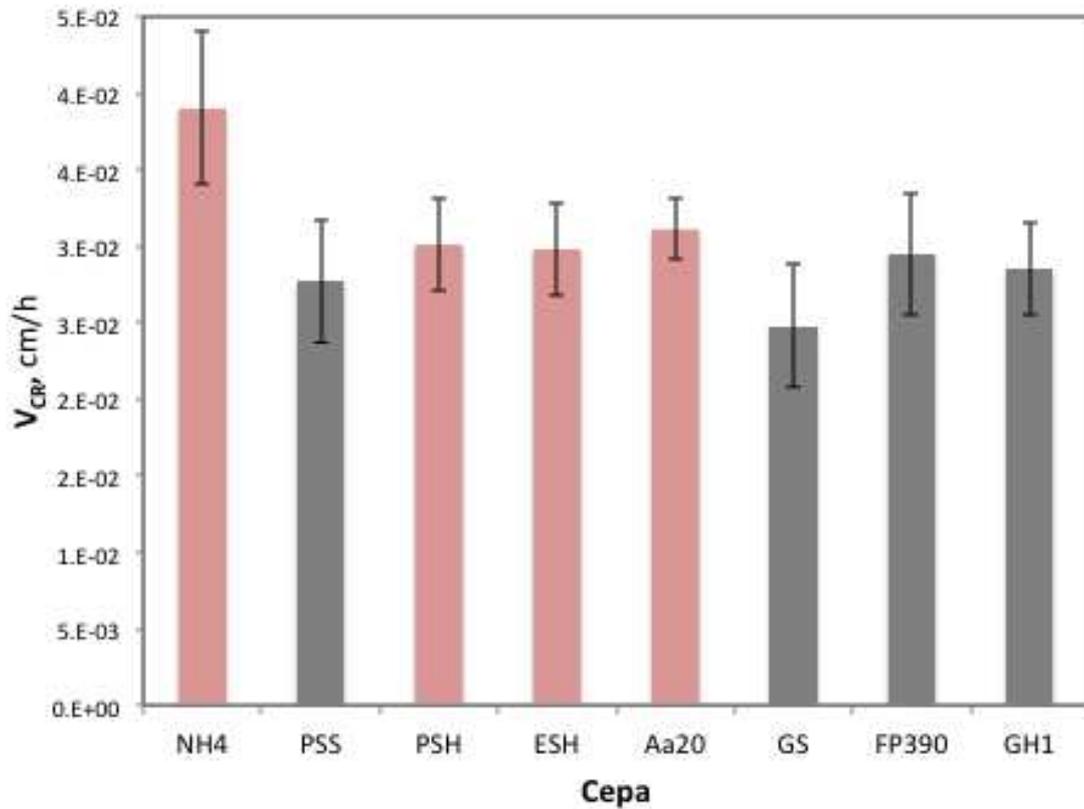


Figura 7.2.2 Velocidad de crecimiento radial de las cepas productoras de lipasas.

En base a los resultados obtenidos se prosiguió a determinar la actividad enzimática en las cepas que presentaron mayor velocidad y crecimiento radial (Figura 7.2.3). Los resultados obtenidos demostraron que *Aspergillus niger* PSH obtuvo la mayor actividad enzimática (18.91 ± 0.80 UE/mL), sin embargo este resultado no presenta diferencia significativa con la cepa *Aspergillus niger* GH1 (18.35 ± 0.93 UE/mL).

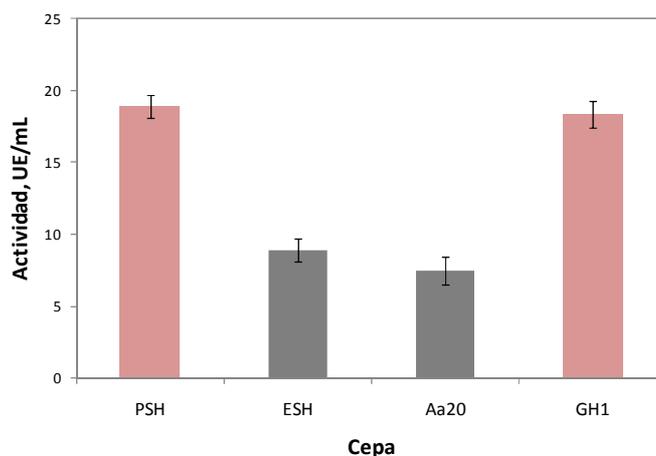


Figura 7.2.3 Actividad enzimática obtenida por las cepas que tuvieron mayor velocidad y crecimiento radial a tiempo final de fermentación (8 días).

Los resultados obtenidos en el presente estudio coincide con lo reportado por Macris y cols., (1996) donde se estudio la producción de lipasas por la cepa BTL de *Aspergillus niger* (19.7 UE/mL). **Cihangir y Sarikaya, (2004)** realizaron un estudio exploratorio de producción de lipasas por hongos aislados de diferentes suelos de Turkey encontrando que la mayor actividad enzimática la presento una sepa de *Aspergillus sp.* (17 UE/mL) a un tiempo de fermentación de 4 días. **Kebabci y cols. (2012)** determinaron la producción de lipasas de *Yarrowia*: NBRC 1658, IFO 1195 y estudiaron los efectos de la fuente de carbono, nitrógeno, pH y temperatura. Sin embargo los resultados que obtuvieron fueron menores en comparación con los obtenidos en el presente estudio (16 UE/mL).

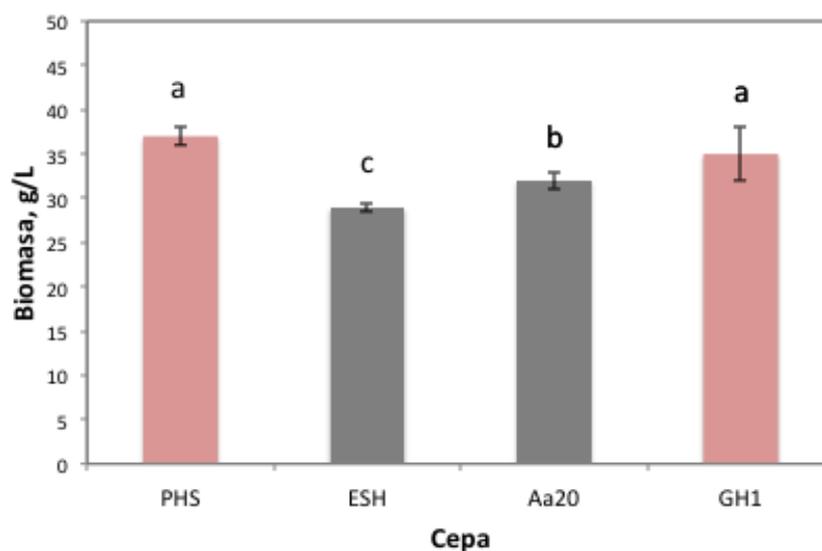


Figura 7.2.4 Producción de biomasa por las cepas que tuvieron mayor velocidad y crecimiento radial a tiempo final de fermentación (8 días).

En la Figura 7.2.4 se muestran los resultados de producción de biomasa. Se observa que las cepas con mayor actividad enzimática también presentan una mayor producción de biomasa (35-37 g/L). Estos resultados de biomasa son mayores a los reportados para la producción de lipasas por *Aspergillus sp.* (9.7-16 g/L), (Cihangir y Sarikaya, 2000; Coca y cols., 2001).

7.3 EVALUACIÓN CINÉTICA DE LA PRODUCCIÓN DE LIPASAS POR *ASPERGILLUS NIGER*.

Esta etapa tuvo como objetivo realizar un estudio cinético de la producción de lipasas de las 2 cepas que presentaron una mayor actividad lipolítica, *Aspergillus niger* PSH y

Aspergillus niger GH1. Los resultados se presentan en la Figura 7.3, donde se observa que la cepa que alcanzo su nivel máximo de producción de lipasa en un menor tiempo fue *Aspergillus niger* GH1. Sin embargo para tener una mayor claridad de la cinética, los datos fueron ajustados a un modelo logístico representado por la siguiente ecuación:

$$A = \frac{A_o A_{Max} e^{\mu t}}{A_{Max} - A_o + A_o e^{\mu t}}$$

Donde A es la actividad enzimática (UE/mL) obtenida a un tiempo determinado (t, h). A_o representa la actividad enzimática al inicio de la fermentación (UE/mL), A_{Max} representa la máxima actividad alcanzada (UE/mL) y μ la velocidad de producción de enzima lipasa (UE/mLh). Este tipo de modelos ha sido ampliamente utilizado para describir la cinética de obtención de algún producto de interés y/o para describir el crecimiento microbiano. El ajuste de este modelo a los datos obtenidos en el presente estudio fue realizado a través de una regresión no lineal por el método de suma de mínimos cuadrados utilizando Microsoft Excel Solver, 2003. El modelo tuvo un ajuste bastante satisfactorio de los datos experimentales y los predichos por el modelo, obteniendo un coeficiente de correlación $R^2=0.97-0.98$. Los parámetros cinéticos estimados de este modelo son presentados en la Tabla 7.1. De los parámetros cinéticos se puede observar que no hubo diferencia significativa en la actividad lipolítica máxima alcanzada por ambas cepas. Sin embargo la cepa *Aspergillus niger* GH1 presento una mayor velocidad de producción de la enzima ($\mu=4.52\pm 0.04E-02$ UE/mLh) alcanzando su máxima producción en un tiempo aproximado de 130 h.

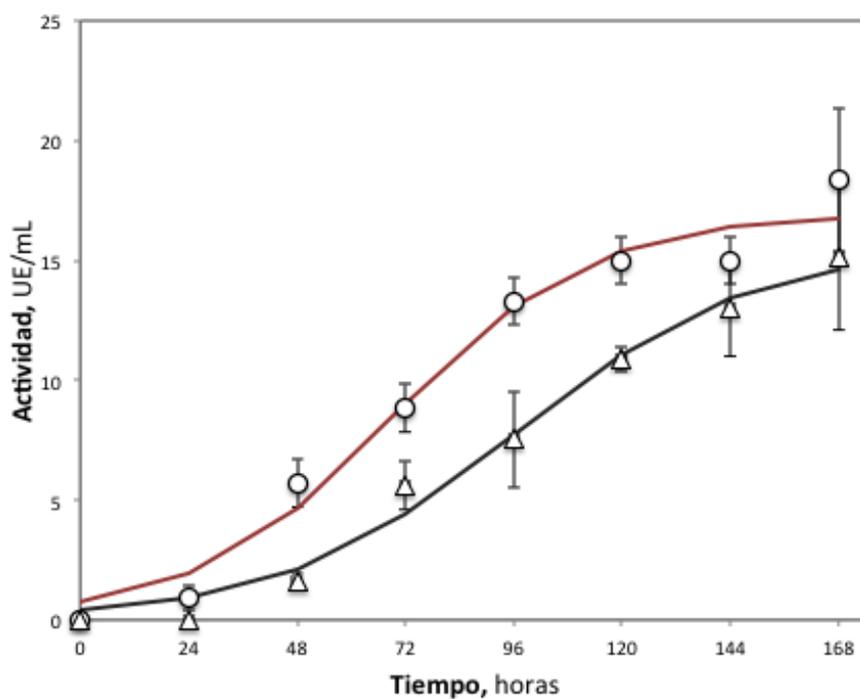


Figura 7.3 Cinética de producción de enzima lipasas por *Aspergillus niger* GH1 (o) y *Aspergillus niger* PSH (Δ). La línea continua representa el modelo logístico aplicado.

Tabla. 7.3 Parámetros obtenidos del ajuste de modelo logístico a los datos experimentales

Parámetros	GH1	PSH
A_0 , UE/MI	0.71 ± 0.05	0.39 ± 0.07
A_{max} , UE/mL	16.98 ± 1.38	15.63 ± 1.52
, UE/mLh	$4.52 \pm 0.04E-02$	$3.81 \pm 0.03E-02$

8. CONCLUSIONES

Se determinó que las 8 cepas evaluadas *Aspergillus sp* pertenecientes a la colección DIA-UAdC son productoras de lipasas. Las cepas *Aspergillus niger* PSH, *Aspergillus niger* ESH, *Aspergillus niger* Aa20, *Aspergillus niger* GH1 fueron las cepas que presentaron una mayor velocidad y crecimiento radial. De acuerdo a los resultados de actividad lipolítica se determinó que las cepas con mayor actividad son *Aspergillus niger* PSH y *Aspergillus niger* GH1. Sin embargo el estudio cinético pudo concluir que la cepa con una mayor actividad lipolítica y mayor velocidad de producción de la enzima lipasa fue la cepa *Aspergillus niger* GH1.

9. REFERENCIAS

Coca J, Hernández O, Berrio R, Martínez S, Días E and Dustet JC. (2001). Producción y caracterización de las lipasas de *Aspergillus niger* y *A. fumigatus*. *Biología Aplicada*, 18: 216-220.

Coca, J. and Dustet, C. (2006). Expression and characterization of lipase produced by *Mucor griseocyanus*. *Biología Aplicada*; 23: 224-228

Córdoba López, J. y Roussos S. Producción de lipasas de hongos termófilos cultivados en medios líquidos y sólidos. Memorias del Congreso IX Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, XIII Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica, II Congreso Internacional de Ingeniería Bioquímica Los cuales se celebraron del 10 al 14 de septiembre de 2001 en Veracruz, México

Eijkman CU (1901) Enzyme beibakterien und Schimmelpilzen. *Cbl Bakt Parasiten Infektionskr*, 29: 841-848.

Elibol M, Ozer D. (2001) Influence of oxygen transfer on lipase production by *Rhizopus arrhizus*. *Process Biochem*; 36: 325 – 9.

Guisán JM, Bastida A, Sabuquillo P, Armisen P, Fernández-Lafuente R, Huguet J. (1998) A single step purification immobilization and hiperactivation of lipases via interfacial. Adsorption on strongly hydrophobic supports. *Biotechnol Bioeng*; 58: 486-93

Gutiérrez-Alvarado, y. C., Iliná, A. y Martínez-Hernández, J. L. Selección, Identificación y Evaluación de Cepas Productoras de Lipasa Aisladas del Semidesierto Mexicano. Memorias del XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería; VII Simposio Internacional de Producción de Alcoholes y Levaduras, 21-26 de junio 2009 Acapulco, Guerrero

Hasan Fariha, Ali Shah Aamer, Hameed Abdul (2006) Industrial applications of microbial lipases. *Enz. Microb. Technol.* 39: 235-251

Hernaiz MJ, Sánchez-Montero, Sinisterra JM. (1999) Modification of purified lipase from *C. rugosa* with polyethylene glycol: A systematic study. *Enzyme Microb Technol*; 24: 181-90.

Hofelmann M, Hartmann J, Zink A, Schreier P.(1985) Isolation, purification and characterization of lipase isoenzymes from a technical *Aspergillusniger* enzyme. J of Food Sci; 50:1721.4

Houde, A., Kademi, A., Leblanc, D., (2004) Lipases and their industrial applications: an overview. *Appl.Biochem. Biotechnol.* 118: 155-170.

Jaeger KE y Eggert T.(2002) Lipases for biotechnology. *Revista.*13: 390-397.

Kazlauskas R.(1994) Elucidating structure mechanism relationship in lipases. Prospects for predicting and engineering catalytic properties. *Trends Biotechnol;* 12: 464.72.

Lima VMG., Krieger N., Sarquis MIM., Mitchell DA., Ramos LP. y Fontana

JD.(2003) Effect of Nitrogen and Carbon Sources on Lipase Production by *Penicilliumaurantiogriseum*. *Food Technology and Biotechnology.*

41 (2):105-110.

Marini, A., Imelio, N, Picó, G., Romanini, D. y Farruggia, B. (2011). Isolation of a *Aspergillusniger* lipase from a solid culture medium with aqueous two-phase systems. *Journal of Chromatography B*, 879: 2135– 2141.

Montesinos Segui, J. L. (1993). Definición de estrategias de operación en procesos biotecnológicos mediante el uso de técnicas de monitorización y control: aplicación a la producción de lipasas por *Candida rugosa*. Tesis Doctoral, programa doctoral de biotecnología bioquímica de desarrollo de procesos. Universidad Autónoma de Barcelona.

Müller dos Santos, M., López de Almeida Amazonas, M. A., Alexander Mitchell, D. y Krieger, N. Selección de Macrohongos Productores de Lipasas y Proteasas. Memorias XIV Simpósio Nacional de Fermentações. Universidade Federal de Santa Catarina Centro Tecnológico Depto. de Eng.Química e Eng.de Alimentos. 5 a 8 de Agosto de 2003, Maria do Mar Hotel, Florianópolis, SC.

Pokorny, D., Freidrich, J. and Cimerman, A. (1994). Effect of nutritional factors on lipase biosynthesis by *Aspergillusniger*. Biotechnology letters Volume 16 No. 4 pp. 363-366.

Rajendran, A., Palanisamy, A. and Thangavelu, V. (2009). Lipase Catalyzed Ester Synthesis for Food Processing Industries. Braz. Arch. Biol. Technol. v.52 n.1: pp. 207-219.

Rivera-Pérez, C. y García-Carreño, F. (2007). Enzimas Lipolíticas y su Aplicación en la Industria del Aceite. BioTecnología, Vol. 11 No. 2 Págs. 37-45.

Rohit S, Yusuf C, Ullamchand B (2001). Production, purification, characterization and application of lipases. Biotechnol. Adv. 19: 627-662.

Sánchez Ferrer, A. (2008). Recuperación, purificación y caracterización de lipasas producidas por *Candida rugosa*. Aplicación a la resolución de compuestos quirales y diseño del reactor enzimático. Tesis Doctoral, programa de doctorado en biotecnología. Universidad Autónoma de Barcelona.

R. Sharma, Yusuf Chisti, Uttam Chand Banerjee (2001). Production, purification, characterization, and applications of lipases, Pags. 627-662

Saxena RK, Sheroan A, Giri B, Davidson WS (2003) Purification strategies for microbial lipases. J. Microbial Meth. 52: 1-18

Schmid RD. y Verger R. (1998). Lipases: Interfacial Enzymes with Attractive Applications. Angewandte Chemie. Vol 37: 1608-1633.

Van Der Walle N (1927) Ubersynthetischewirkung bakterieller lipasen. Cbl Bakt Parasitenk Inktionskr, 70: 369-73.