

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA

“ANTONIO NARRO”

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS



**ESCALAMIENTO A NIVEL REACTOR PARA LA PRODUCCIÓN DE LIPASAS A
PARTIR DE *Aspergillus niger* GH1**

PRESENTADO POR:

ULISES SOLIS NARANJO

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el grado de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA, MÉXICO

JUNIO DE 2013

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

TESIS

ESCALAMIENTO A NIVEL REACTOR PARA LA PRODUCCIÓN DE LIPASAS A PARTIR DE
Aspergillus niger GH1

POR:

ULISES SOLÍS NARANJO

Que se somete a la consideración del H. Jurado Examinador como Requisito Parcial
para obtener el grado de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

APROBACIÓN DE TESIS:

Dr. Mario Alberto Cruz Hernández
Presidente

MC. Armando Robles Olivo
Vocal

Dra. Ana Verónica Charles Rodríguez
Vocal

Dr. Ruth Elizabeth Belmares Cerda
Vocal

Dr. Ramiro López Trujillo

COORDINADOR DE LA DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA, MÉXICO JUNIO 2013



"UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO"

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

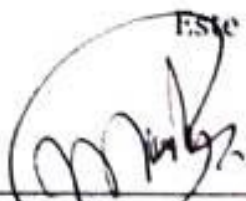
TESIS

ESCALAMIENTO A NIVEL REACTOR PARA LA PRODUCCIÓN DE LIPASAS A PARTIR DE
Aspergillus niger GH1

POR:

ULISES SOLÍS NARANJO

Este trabajo fue dirigido por el siguiente comité:



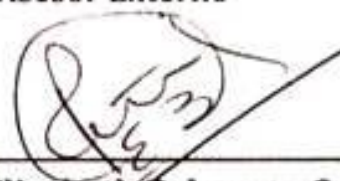
Dr. Mario Alberto Cruz Hernández
Director de Tesis



MC. Armando Robles Olivo
Asesor Externo



Dra. Ana Verónica Charles Rodríguez
Asesor



Dra. Ruth Elizabeth Belmares Cerda
Asesor Externo



Dr. Heliodoro de la Garza Toledo
Asesor

Este trabajo fue financiado y realizado por Grupo kappa de Conocimiento S. A. de C. V., Nanoingredientes Bioactivos S. A. de C. V. y la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro dentro del proyecto "Desarrollo de Productos Alimenticios de Alto Valor Agregado que Permita Prevenir Problemas de Obesidad y Mala Digestión a Partir de la Adición de Lipasas Encapsuladas" con clave ECO-2011-C01-165137.

Fomento de Innovación Tecnológica Secretaria de Economía-CONACYT

BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA, MÉXICO JUNIO 2013

AGRADECIMIENTOS.

Deseo expresar mi extensa gratitud a todas aquellas personas que me han acompañado a lo largo de este trayecto.

Principalmente a mi familia para quienes me son insuficientes las palabras para decirles lo importante que son para mí.

A mis amigos que estuvieron conmigo en cada momento de bueno y malo sin dudar. A todos mis profesores, así como mis asesores y amigos que dirigieron cada etapa de este proyecto y apoyaron de excelente forma a su realización, y a todas las personas que estuvieron cerca de mí durante el trayecto de la carrera.

“Estoy seguro que la buena música la vida alarga”

Yehudi Menuhin

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS.....	I
ÍNDICE DE FIGURAS.....	II
RESUMEN.....	III
CAPÍTULO I	
1.1 Introducción.....	1
1.2 OBJETIVOS.....	4
1.2.1 Objetivo General.....	4
1.2.2 Objetivos Específicos.....	4
1.3 HIPÓTESIS.....	4
1.4 JUSTIFICACION.....	4
CAPÍTULO 2	
REVISIÓN DE LITERATURA	
2.1 Definición de Enzimas.....	6
2.2 Características Generales de las Lipasas.....	7
2.3 Especificidad y Selectividad.....	10
2.4 Actividad Catalítica.....	11
2.5 Reacciones por Intervención de Lipasas.....	13
2.6 Fuentes de Lipasas.....	14
2.7 Diferencias Entre Lipasas y Estereasas.....	16
2.8 Factores que Afectan la Actividad Catalítica de la Lipasa.....	16
2.8.1 Actividad de Agua (a_w).....	17
2.8.2 Agregación Molecular.....	18
2.8.3 Efecto del pH y la Temperatura.....	18
2.9 Aplicaciones Biotecnológicas de las Lipasas.....	19
2.10 Producción de Lipasas. Medios de Cultivo.....	20
2.10.1 Medio Líquido.....	21

2.10.2 Medio Sólido.....	22
2.11 Tipo de Reactores.....	23
2.11.1 Tanque Agitado.....	23
2.11.2 Tubular.....	25
2.11.3 Lecho Fluidizado.....	26
2.12 Optimización de Medios de Cultivo.....	26
2.13 Diseño Experimental. Genichi Taguchi.....	27
2.14 Consideraciones del Proyecto.....	28

CAPÍTULO 3

3.1 MATERIALES Y METODOS.....	30
3.1.1 Conservación a Largo Plazo.....	30
3.1.2 Conservación a Corto Plazo.....	30
3.2 Reconocimiento del Equipo.....	31
3.3 Fermentaciones.....	31
3.4 Optimización de las Condiciones de Fermentación.....	32
3.5 Obtención de Producto Enzimático.....	32
3.6 Análisis de Actividad Enzimática.....	32
3.7 Análisis de Biomasa.....	33

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1 Desarrollo de Fermentaciones. Efecto de la Temperatura en la Producción de lipasas.....	34
4.2 Análisis de la Actividad Enzimática y Optimización de la Condiciones de Fermentación.....	38
4.3 Análisis de Biomasa.....	41

CAPÍTULO 5

5.1. CONCLUSIONES.....	43
------------------------	----

CAPÍTULO 6

6.1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....44

CAPÍTULO 7

7.1. ANEXOS.....51

ÍNDICE DE CUADROS.

Cuadro 1. Principales organismos productores de lipasa.....	15
Cuadro 2. Influencia de la temperatura y la pérdida de medio de cultivo.....	35
Cuadro 3. Parámetros cinéticos: Producto-Biomasa a diferentes temperaturas de fermentación.....	37
Cuadro 4. Diseño experimental Taguchi L8.....	39
Cuadro 5. UE obtenidas por cada experimento.....	39
Cuadro 6. Análisis ANOVA.....	39
Cuadro 7. Modelo de las condiciones óptimas propuesto para la producción de lipasas.....	41
Cuadro 8. Producción de lipasas en modelo desarrollado.....	41
Cuadro 9. Biomasa obtenida en los distintos experimentos.....	41

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Acción típica de las lipasas hidrolizando un triglicérido.....	8
Figura 2. Lipasa de naturaleza anfifílica.....	8
Figura 3. Migración de la lipasa a la interfase.....	8
Figura 4. Esquema de actividad de las enzimas estereosas y lipasas.....	9
Figura 5. Mecanismo propuesto para la hidrólisis de enlaces ésteres por parte de lipasas a partir del mecanismo de reacción de serina proteasas.....	13
Figura 6. Esquema general de la reacción de hidrólisis catalizada por lipasa.....	14
Figura 7. Matriz con siete factores y dos niveles de Taguchi.....	28
Figura 8. Evaporación de medio de cultivo.....	34
Figura 9. Relación producción de Biomasa-Lipasa.....	35
Figura 10. Productividad de lipasas a 30 y 35°C de fermentación.....	37
Figura 11. Influencia de las variables en el diseño experimental.....	40

RESUMEN.

La aplicación de enzimas a distintos sectores industriales está adquiriendo cada vez más auge debido a que su capacidad catalítica ha sido superior a numerosos catalizadores químicos. Estas enzimas se han obtenido de distintas fuentes: plantas animales y microorganismos. Siendo estos últimos los de mayor importancia. Las lipasas son una de las tantas enzimas que son muy demandadas por diferentes industrias, lo que ha llevado a buscar nuevas fuentes de esta que puedan cubrir dicha demanda. En este trabajo se optimizaron las condiciones de una fermentación líquida utilizando *A. niger* a nivel reactor.

En la primera etapa se determinó la temperatura óptima para la producción de lipasas con la cepa proporcionada por el Departamento de Investigación de Alimentos de la Universidad Autónoma de Coahuila (DIA de UAdeC) con un medio específico previamente desarrollado. En segunda instancia se desarrolló un diseño experimental Taguchi L-8 para la optimización de las condiciones de fermentación y los resultados de los experimentos fueron analizados en el software Qualitek-4.

Palabras clave: Lipasas, Reactor, Escalamiento, Fermentación

CAPITULO 1

1.1 Introducción.

Una de las aplicaciones más comunes de la biotecnología es la producción y utilización de enzimas. Las enzimas son sustancias de naturaleza proteica, y como biocatalizadores presentan gran ventaja (mayor especificidad y selectividad) sobre los catalizadores químicos más comunes, además de trabajar en condiciones de reacción cercanas a las que se encuentran en medios fisiológicos. Por el contrario las enzimas presentan una serie de inconvenientes como su elevado costo y su poca estabilidad en medios y condiciones alejadas fisiológicamente a lo habitual. En particular, la dependencia de la actividad de una enzima con factores ambientales tales como temperatura, pH, presión y operaciones como agitación, aireación, etc., es marcada. La presencia de inhibidores que modifican la actividad enzimática, obliga a trabajar habitualmente a concentraciones de sustratos y productos bajos, lo que muchas veces provoca un encarecimiento de la etapa de purificación del producto de interés (Sánchez, 1998).

La aplicación de enzimas se remonta a civilizaciones antiguas. Hoy en día, más de 4000 enzimas son conocidas, de las cuales 200 han tenido un amplio uso comercial. La mayoría de las enzimas industriales son de origen microbiano. Al menos 75 % de todas las enzimas incluyendo lipasas (Dustet y col., 2006). Estas enzimas han sido observadas desde 1901 en *Bacillus prodigiosus*, *B. pyocyaneus* y *B. fluorescens* señala Riviera C. en 2007. Mendoza en 2010, menciona que los microorganismos lipolíticos fueron estudiados por Huss, H., a partir de 1908, quien aisló como causante de la rancidez de la leche a una bacteria a la que denominó *Bactridium lipolyticum*.

Una gran variedad de microorganismos han sido obtenidos de suelos contaminados por residuos industriales, debido a que llegan a ser ambientes que los proveen de fuentes de carbono y nutrimentos asimilables para sus

funciones vitales. Debido a esto se han realizado distintas investigaciones que ayuden a combatir este tipo de daños al medio ambiente.

Entre los microorganismos reconocidos destacan hongos, bacterias y levaduras que forman parte de los organismos productores de lipasas, enzimas cuyo papel ha tenido gran impacto en distintas industrias, ya sea para el control de sus residuos o para la creación de nuevos productos que puedan tener un valor agregado.

El conocimiento de que las lipasas (triacilglicerol hidrolasas EC 3.1.1.3) de origen microbiano son más termoestables que las obtenidas de plantas y animales, ha aumentado el interés en ellas principalmente por su potencial de uso industrial; a lo cual, para satisfacer dicha demanda, se crea la necesidad de buscar más fuentes productoras de enzimas. *Aspergillus sp.*, pertenece a los principales microorganismos bien conocidos como productores de lipasa y sus enzimas están adecuadas para su uso en muchas aplicaciones industriales, principalmente en la industria láctea (Cihangir y col., 2004).

Las lipasas son el tipo de hidrolasas que catalizan la hidrólisis de triglicéridos a glicerol y ácidos grasos libres en una interface aceite-agua. Además, participan en la trans-esterificación de esteres así como su síntesis mostrando propiedades enantioselectivas. La demanda industrial de nuevas fuentes de lipasas con diferentes características catalíticas promueve la obtención de nuevas cepas muy seleccionadas (Treichel y col., 2009).

Sin embargo, las lipasas comerciales disponibles en la actualidad son muy costosas y no son adecuadas para la producción de otros productos de interés como el biodiesel (Dutra, 2007).

Estas enzimas constituyen el grupo más importante de biocatalizadores para las aplicaciones de biotecnología. Un punto importante de las lipasas es la especificidad con la que actúan, además de ayudar a la reducción de muchos residuos, considerando la selección de la enzima correcta del proceso a aplicar (Hansan y col., 2006). Algunos ejemplos de la aplicación industrial de las

lipasas son: aditivos en la formulación de detergentes (Khoo e Ibrahim, 2003), en la industria alimenticia para la elaboración de productos dietéticos con bajo nivel de grasas y colesterol (Coca y col., 2001), en la industria del papel con el objetivo de eliminar la cera de la pulpa del papel (Bailey y Ollis, 1986), en la industria farmacéutica en la obtención de moléculas bioactivas (Peña, 2006), 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).

Para la producción a escala de un proceso donde el elemento catalítico está constituido por una enzima se debe tener en cuenta la importancia de la definición, el diseño del reactor y la influencia de una gran diversidad de factores estrechamente relacionados con su funcionamiento, como es la presencia de varias fases como sucede cuando hay generación de gas, el uso de solventes orgánicos o en los casos de sustratos o productos insolubles, de igual manera se debe considerar la inactivación térmica de las enzimas, que representa la principal pérdida de capacidad catalítica durante la operación del reactor. La optimización de la operación del biorreactor resulta fundamental para la factibilidad económica del proceso productivo (Huerta, 2004).

El análisis matemático y los modelos de simulación ayudan a entender el comportamiento cuantitativo del sistema biológico y a predecir el desarrollo general del biorreactor. Adicionalmente, estos pueden ayudar en la puesta en marcha y finalización de la operación del reactor, a describir la dinámica y las características de control del mismo o estimar los tiempos requeridos para alcanzar nuevos estados estables cuando se presenta una perturbación (Corredor y Caicedo 2005). En el presente trabajo se optimizaron las condiciones de fermentación en medio líquido para la producción de lipasas utilizando la cepa de *Aspergillus niger* a nivel reactor, partiendo de un medio optimizado en trabajos anteriores.

1.2 OBJETIVOS.

1.2.1 Objetivo General

Evaluar el efecto de la temperatura sobre la producción de lipasas en reactor de tanque agitado y optimizar las condiciones para aumentar la producción de lipasas.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Analizar el efecto de la temperatura sobre la producción de lipasas por *A. niger* GH1 en reactor de tanque agitado.
- Optimizar las condiciones de fermentación en tanque agitado para la producción de lipasas por *A. niger* GH1.
- Evaluar la producción de biomasa durante la producción de lipasas en tanque agitado por *A. niger* GH1.

1.3 HIPÓTESIS.

La producción de lipasas por *Aspergillus niger* GH1 en medio líquido aumentará con el incremento de la temperatura en la fermentación.

1.4 JUSTIFICACION.

La gran demanda que se ha ido incrementando día a día de lipasas, ha obligado a buscar nuevas alternativas para elevar la producción y de igual manera reducir costos, las características de esta enzima ha ayudado a que se le dé un mejor aprovechamiento y aplicación a distintos campos para la generación de nuevos productos o en su defecto, para mejorarlos o, por consiguiente optimizar su producción.

Aspergillus niger GH1 es un hongo que ha mostrado ser una alternativa potencial en diferentes estudios, la mejora en el proceso fermentativo, así

como la extracción de la enzima podría elevar los niveles de productividad de lipasas considerablemente, con lo que se puede satisfacer una mayor demanda.

El potencial de esta enzima puede tener un impacto en el manejo de residuos industriales y el cuidado del medio ambiente, en la obtención de productos con valor agregado o como herramienta para generar nuevas fuentes de energía.

CAPITULO 2

REVISION DE LITERATURA.

2.1 Definición de Enzima.

Las enzimas son proteínas de estructura tridimensional sumamente compleja, son biocatalizadores cuya función es acelerar ciertas reacciones bioquímicas específicas que forman parte del proceso metabólico de las células. Aceleran en el organismo diversas reacciones químicas que en condiciones normales sólo tendrían lugar muy lentamente o no se producirían en absoluto (Bedford, 1991; Bühler y col., 1998).

Para la producción de enzimas se utilizan diversos hongos, bacterias y levaduras; la síntesis de enzimas es esencial para estos microorganismos porque sus funciones vitales se mantienen gracias a las divisiones de sustratos y el metabolismo dependientes de las enzimas. Además, las cepas especialmente seleccionadas o los microorganismos modificados genéticamente pueden producir cantidades de enzimas mucho mayores que en condiciones normales. Ya que muchos organismos se adaptan a condiciones de vida extremas (temperatura, pH, osmolaridad), en la mayoría de los casos las enzimas microbianas son en este sentido más estables que las enzimas vegetales y animales (Carlón, 2007).

Prácticamente todas las reacciones químicas que tienen lugar en los seres vivos están catalizadas por enzimas. La sustancia sobre la que actúa la enzima se llama sustrato. El sustrato se une a una región concreta de la enzima, denominada centro activo (González J. M., 2010). El centro activo comprende:

- Un *sitio de unión*, formado por los aminoácidos que están en contacto directo con el sustrato;

- Un *sitio catalítico*, formado por los aminoácidos directamente implicados en el mecanismo de la reacción. Las enzimas son catalizadores

específicos: cada enzima cataliza un solo tipo de reacción y, casi siempre, utiliza un único sustrato.

Aunque todas las enzimas inicialmente se producen en las células, algunas son excretadas por las paredes de éstas y funcionan en el medio celular; por lo que se pueden reconocer dos tipos de enzimas según el sitio donde actúen: enzimas intracelulares o endoenzimas (dentro de la célula) y extracelulares o exoenzimas (actúan fuera de la célula). Por lo general estas sustancias no afectan el equilibrio de una reacción, sino que simplemente la aceleran hasta alcanzar el equilibrio (Alquicira, 2003).

Las enzimas son clasificadas y codificadas por la NC-IUBMB (Nomenclatura Comité of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology) de acuerdo con la reacción catalizada. La nomenclatura utiliza una abreviación E.C. (Enzyme Comision) seguido de hasta 4 dígitos referentes a la clase y subclase a la que pertenece la enzimas; la lipasa es el nombre genérico para un grupo de enzimas pertenecientes a la clase hidrolasa (E.C. 3.1.X.X) y que actúan sobre ligaciones éster (E.C. 3.1.1.X). Dentro de este grupo, destacan las “verdaderas lipasas” conocidas químicamente como triacilglicerol lipasas (E.C. 3.1.1.3), cuya definición clásica describe a estas enzimas como glicerol éster hidrolasas que actúan sobre ligaciones éster presentes en acilgliceroles, liberando ácidos grasos y glicerol, constituyendo esta enzima lipasa una clase especial de carboxil éster hidrolasas (Mendoza, 2010).

2.2 Características Generales de las Lipasas.

Las lipasas son catalizadores versátiles que se aplican dentro de un amplio rango de bioconversiones tales como hidrólisis, interesterificación, esterificación, alcoholólisis, acidólisis y aminólisis como se muestra en la figura 1;

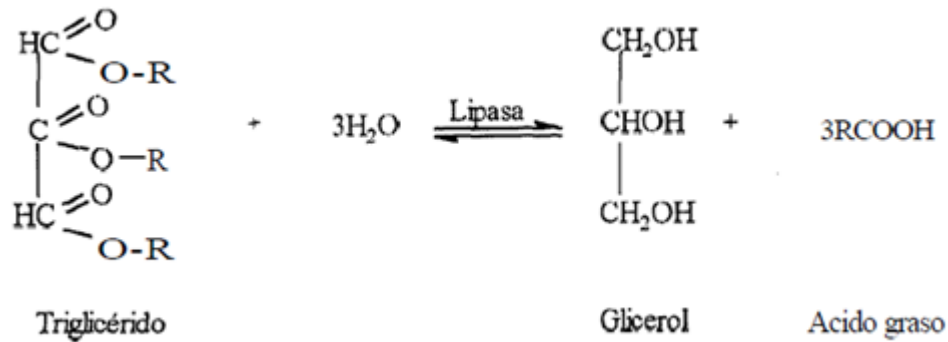


Figura 1. Acción típica de las lipasas hidrolizando un triglicérido.

Son de naturaleza anfifílica es decir, que se caracterizan por la presencia de una parte tanto hidrofílica como hidrofóbica en sus moléculas (figura 2) (Cifuentes y Rojas, 2005); actuando en la naturaleza en una interfase orgánico-acuosa como en la figura 3 (Verger *et al.*, 1990; Jaeger *et al.*, 1994; Cifuentes, 2005) y su modelo cinético normalmente no se ajusta a las cinéticas del tipo Michaelis-Menten siendo generalmente más complejo.



Figura 2. Lipasa de naturaleza anfifílica.

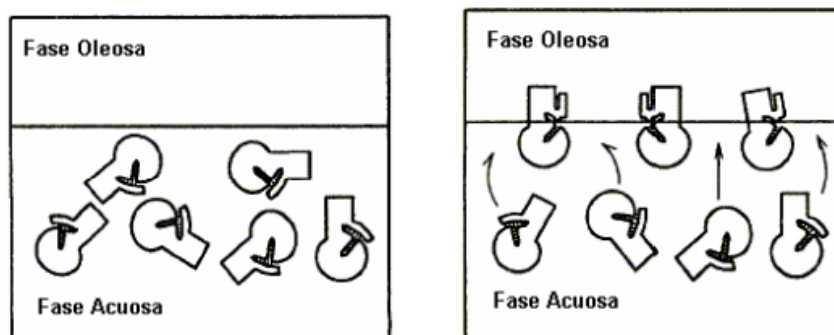


Figura 3. Migración de la lipasa a la interfase.

La característica diferencial de las lipasas con respecto a otras enzimas que también pueden hidrolizar esteres como las esterasas, es la necesidad de una interface orgánico-acuosa para dicha función catalítica. Los sustratos propios de las lipasas son esteres insolubles, necesitando la lipasa de una interface orgánico-acuosa para su activación; esta actividad normalmente se produce en un fenómeno de adsorción inicial sobre dicha fase, al que sigue la reacción propiamente dicha sobre la interface, con la formación de complejo enzima-sustrato y posterior liberación de los productos a la fase acuosa con la posterior regeneración de la enzima (Verger et al., 1990; Jaeger et al., 1994).

En el caso de activación esterásica la situación es completamente diferente puesto que las esterasas catalizan la hidrólisis de esteres solubles, trabajando sin interface y pudiendo describirse su cinética mediante modelos de Michaelis-Menten. En este punto, es necesario señalar que la mayoría de las lipasas también son esterasas, sin embargo, no ocurre lo mismo con las esterasas, que no suelen catalizar reacciones con sustratos insolubles, precisamente por la necesidad de trabajar en la interface. Debido a la baja solubilidad de los sustratos, las lipasas han de ser capaces de interaccionar con la interface de sus agregados. Así, la mayoría se caracterizan por ser activas por interface; en otras palabras, una vez que se adsorben a una interface desarrollan una actividad muy superior en comparación a la fase acuosa, fenómeno conocido como Actividad Interfacial (figura 4) (Alarcón, 2008).

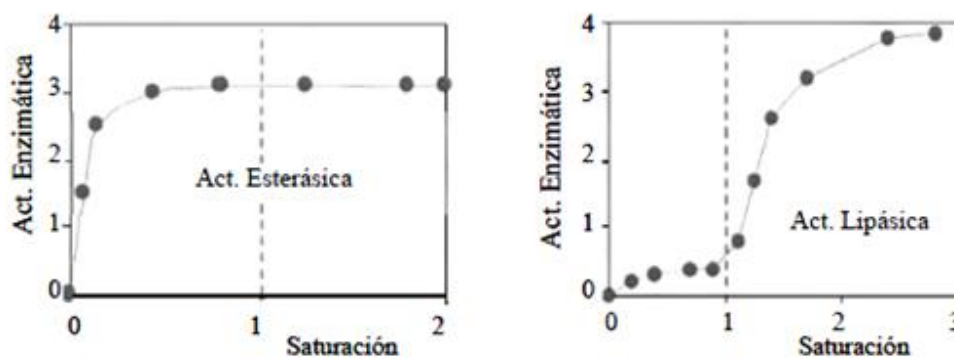


Figura 4. Esquema de actividad de las enzimas estereasas y lipasas.

2.3 Especificidad y Selectividad.

Si bien las lipasas han sido definidas como enzimas específicas para catalizar la separación hidrolítica de los ácidos grasos de cadena larga presentes en los acilglicérols (Snellman y col., 2002), los cuales son sus sustratos naturales, muy pocas lipasas son específicas en sus reacciones. Por este motivo, el término especificidad se ha ido reemplazando en la literatura por el de selectividad, el cual describe mucho mejor el comportamiento reactivo de estas hidrolasas (González y col., 2010). La especificidad de las lipasas está directamente relacionada con el microorganismo productor de las mismas (Sánchez, 1998). Por lo que refiere a las lipasas pueden ser de los tipos:

- **Posicional:** cuando se hidrolizan preferentemente ciertas posiciones del triglicérido, normalmente las posiciones 1 y 3 que son las más accesibles, por ejemplo, pertenecen a este tipo las lipasas producidas por *Yarrowia lipolytica*, *Candida deformans*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus japonicus* y *Rhizopus delemar* (Alarcón, 2008).
- **De ácido graso:** cuando se cataliza la hidrólisis de un determinado tipo de ácido en particular de un triglicérido. Ejemplos de este tipo son las lipasas de *Penicillium cyclopium*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus delemar*, y *Geotrichum candidum* (Alarcón, 2008).
- **Por la clase de lípido** (Bornscheuer et al., 1994; Li et al., 2009).
- **Por su especificidad:** esta puede estar dada por los puntos ya mencionados o por su estereoespecificidad (Mendoza, 2010).

Estas enzimas pueden ser además estereoselectivas, y alcanzan a distinguir entre enantiómeros, frente a sustratos racémicos, o entre grupos enantiotópicos, para triacilglicéridos. Por último, pueden establecerse ciertas combinaciones entre los tipos de selectividades anteriores (González y col., 2010).

2.4 Actividad Catalítica.

Una característica importante de las lipasas es un fenómeno de incremento en la actividad de la enzima cuando actúa en una interfase, en micelas o sustratos que han sido emulsificadores o en sustratos concentrados y que se han recogido bajo el nombre de activación interfacial. Esta característica se ha corroborado con la observación de más de una conformación estable en las estructuras de varias lipasas. En presencia de tales interfases, algunos residuos cercanos a los sitios activos sufren una reestructuración exponiendo estos al medio ambiente de la enzima, y por consiguiente a la presencia de sustratos, lo que aumenta la actividad. En ausencia de tales interfases, estos residuos cercanos esconden el sitio activo de tal forma que actúan como una “tapa” (Orrego, 2010).

Una concentración elevada de glicéridos y otros compuestos orgánicos en agua conduce a fases heterogéneas con la consiguiente formación de una interface. Las lipasas tienen la capacidad de catalizar la hidrólisis del enlace éster en esta interface situada entre una fase lipóide (que constituye el propio sustrato) y una fase acuosa donde la enzima está disuelta. Por tanto, las lipasas son capaces de hidrolizar micelas y emulsiones, a diferencia de las esterasas (carboxil éster hidrolasas, FC 3. 1. 1. 1) que atacan a las moléculas de sustrato completamente solubles en agua (Desnuelle, 1972). Resumiendo, la acción catalítica de las lipasas se divide en dos etapas:

- **Activación interfacial:** en solución acuosa, un segmento helicoidal de la cadena proteica denominado “tapadera” cubre el centro activo de la lipasa. En las lipasas pequeñas como la de *Mucor miehei* una única alfa-hélice forma la tapadera mientras que en las lipasas de gran tamaño como la *C. rugosa* está formada por dos alfa-hélices. En presencia de una interface o en un medio orgánico la tapadera se abre, lo que se ha comprobado recientemente mediante el análisis complejo inhibidor-lipasa de *Mucor miehei*. La apertura de la tapadera provoca un cambio total en la superficie de la entrada al centro activo, de manera que se vuelve más hidrofóbica y se favorece la interacción de enzima con el sustrato (Arroyo, 1995).

- **Hidrólisis del enlace éster del sustrato:** la hidrólisis sucede mediante un mecanismo similar al de las serin-proteasas con los siguientes pasos y mostrados en la figura 5 (Arroyo, 1995):
- I. El sustrato se sitúa en el centro activo de la lipasa de tal manera que el carbono carbonílico toma contacto con el grupo –OH de la serina. El protón del grupo hidroxilo de la serina se transfiere al N_δ de la histidina de la triada catalítica y el O_δ, con carga negativa ataca nucleofílicamente al grupo carbonilo del sustrato con lo que se produce un intercambio tetraédrico (T_d1).
 - II. La carga negativa, en un principio situada en el O_δ de la serina, sufre una translocación hacia el oxígeno del grupo carbonilo, originando un oxianión. Este oxianión encaja en un hueco que forma tras la abertura de la tapadera. En la cutinasa de *Fosfarium solani* y en acetilcolinesterasa de *Torpedo californica*, que carecen de tapadera y en las que no sucede la activación interfacial, también se ha observado este hueco en el centro activo.
 - III. El intermedio tetraédrico se rompe cuando el protón cedido a la histidina se transfiere al oxígeno del alcohol. El alcohol se libera y seguidamente se forma el complejo acil-enzima.
 - IV. Se produce un segundo ataque nucleofílico, esta vez de una sola molécula de agua sobre el carbono carbonílico del complejo acil-enzima. Se forma un nuevo intermedio tetraédrico (T_d2) que, a continuación se rompe, liberando un ácido graso y regenerando el grupo -OH de la serina.

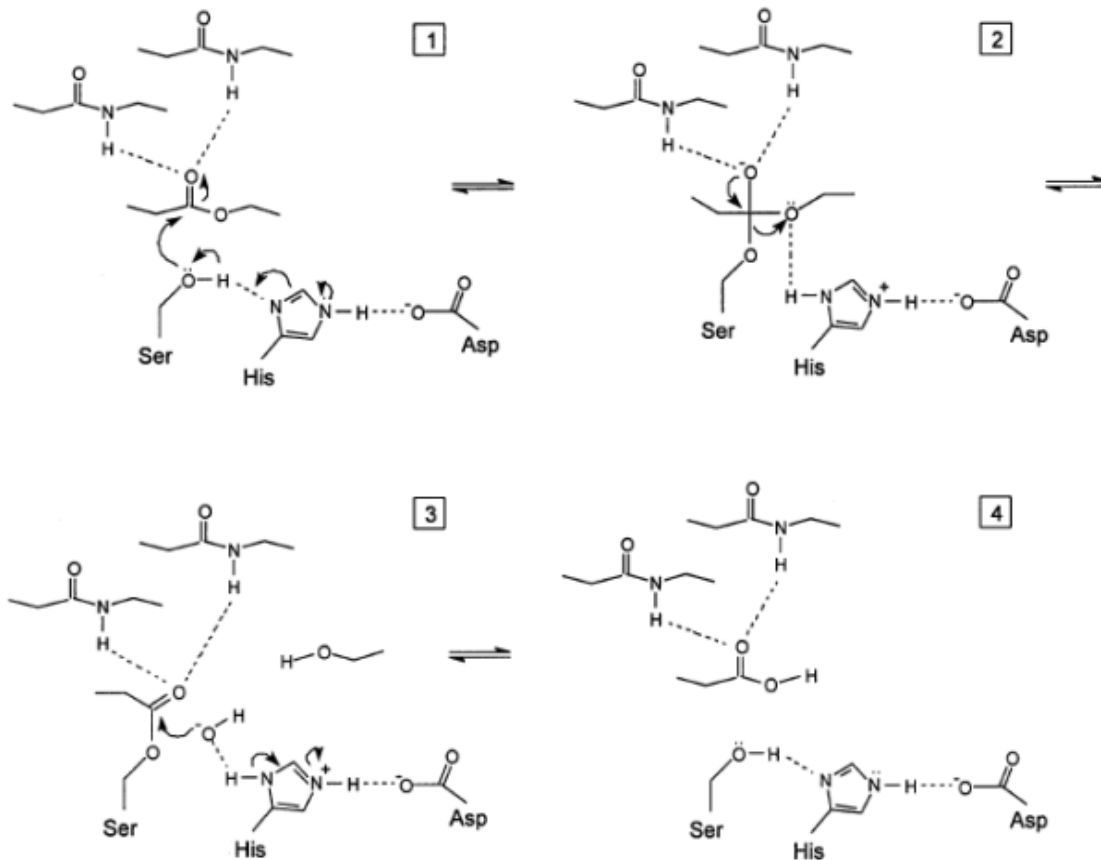


Figura 5. Mecanismo propuesto para la hidrólisis de enlaces ésteres por parte de lipasas a partir del mecanismo de reacción de serina proteasas: 1. Enlazamiento del sustrato al sitio activo de la lipasa en la cavidad del oxianión, 2. Formación del primer intermediario tetraédrico, 3. Ataque del ion OH del agua sobre la acil enzima y liberación de la mitad alcohólica del sustrato, 4. Desacilación del complejo acil enzima para reiniciar el ciclo catalítico (Orrego, 2010).

2.5 Reacciones por Intervención de Lipasas.

Las lipasas pueden llevar acabo distintos tipos de reacción, los cuales se resumen a continuación (Guillén, 2012):

- **Transesterificación.** Es una reacción de síntesis en la cual el acil donador es un éster. Existen dos tipos de transesterificación.
 - *Alcoholólisis.*
 - *Glicerólisis.*

- **Interesterificación.** Es una reacción en la cual se produce un cambio en la composición de ácidos grasos de un éster, ya que el grupo acil se intercambia entre dos esteres.
- **Acidólisis.** Es un tipo de interesterificación en el que el grupo acil se intercambia entre un éster y un ácido graso libre.

Sánchez, J. M. (2007), considera las siguientes reacciones de las lipasas:

- *Hidrólisis* (figura 6).

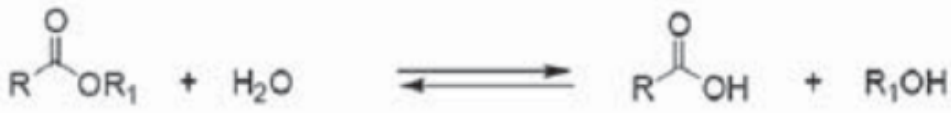


Figura 6. Esquema general de la reacción de hidrólisis catalizada por lipasa.

- *Esterificación.*
- *Aminólisis.*

2.6 Fuentes de Lipasas.

Las primeras fuentes de lipasas fueron obtenidas a partir de las presentes en páncreas de mamíferos, generalmente de cerdos, aunque también de páncreas humano o de caballos. En la actualidad se obtienen vía fermentativa ya sea en medio sólido o sumergido, a partir de una amplia variedad de microorganismos: bacterias, levaduras y hongos (Alarcón, 2008).

Los principales organismos productores de lipasas a nivel industrial se muestran en el Cuadro 1 (Peña, 2006):

Cuadro 1. Principales organismos productores de lipasa.

Origen Fúngico	Origen Bacteriano
<i>Rhizomucor miehei</i>	<i>Chromobacterium viscosum</i>
<i>Penicillium cambertii</i>	<i>Pseudomonas cepacia</i>
<i>Humícola lanuginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Rhizopus oryzae</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>Candida rugosa</i>	<i>Pseudomonas fragi</i>
<i>Candida antártica Lipase A</i>	<i>Bacillus thermocate nulatus</i>
<i>Candida antártica Lipase B</i>	<i>Staphylococcus hyicus</i>
<i>Aspergillus niger</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Geotrichum candidum</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>

El proceso de producción es usualmente aeróbico, y los medios de cultivo similares a los empleados en fermentaciones para producir antibióticos (Madigan y Martinko, 1998).

Las óptimas condiciones de producción de enzimas generalmente difieren de las del crecimiento bacteriano. La temperatura optima de la producción de lipasas es a menudo más baja que la del crecimiento microbiano y esta no es función del crecimiento de células (Peña, 2006).

Las condiciones habituales utilizadas son: temperatura alrededor de los 30°C, pH en zona neutra y condiciones aerobias. Como fuente de carbono se suele utilizar una fuente mixta compuesta por un glúcido y un lípido, actuando este último como inductor para la producción de lipasas. Como fuente de nitrógeno se suele utilizar urea o sales inorgánicas de amonio (Sánchez, 1998), la concentración de estos mismos puede afectar la reactividad de enzima y la relación lipasa extracelular/intracelular (Alarcón, 2008).

Las lipasas microbianas generalmente se encuentran unidas a la membrana externa de las células por interacciones iónicas; este fenómeno provoca inhibición de la producción de lipasas. No obstante, en presencia de cationes como el magnesio, las lipasas adsorbidas a la pared celular de los microorganismos pueden ser liberadas al medio extracelular, incrementando así los niveles de enzima obtenidos en el medio de cultivo (Crueger y col., 1993).

2.7 Diferencias Entre Lipasas y Esterasas.

El problema de la diferenciación entre lipasas (E.C 3.1.1.3) y esterases (E.C.3.1.1.1) ha sido investigado por varios autores y aun existen controversias. Se han definido las lipasas a partir de su característica cinética: la propiedad de activación en presencia de sustratos insolubles en agua y emulsionados, o sea, en presencia de una interfase lípido/agua (Gomes, 2004).

Un punto importante para explicar la diferencia entre lipasas y esterases es por esa especificidad preferencial de sustrato de las dos enzimas. Los sustratos naturales para las lipasas son los aceites y grasas conteniendo triacilglicerol constituidos de ácidos grasos de cadena larga, o sea, uniones éster triples, mientras las esterases actúan sobre uniones éster únicas, liberando ácidos grasos de baja masa molar; además, se debe enfatizar que la mayoría de las lipasas pueden hidrolizar los sustratos de esterases, en cambio, las esterases no hidrolizan los sustratos de las lipasas (Mendoza, 2010).

2.8 Factores que Afectan la Actividad Catalítica de las Lipasas.

Debido a los grandes cambios conformacionales que sufren las lipasas, y el gran número de fuerzas que se implican en el mantenimiento de la estructura de las diferentes conformaciones, el sitio activo de la lipasa puede ser alterado, modificando así las propiedades catalíticas de estas. En la actualidad, la “ingeniería conformacional” se ha establecido como una herramienta versátil para modificar las propiedades de las lipasas (Tarazona, 2011).

Además, en la composición del medio de cultivo para la producción de enzimas existen otros factores fisicoquímicos como temperatura, pH, oxígeno disuelto en medio, etc.; estas enzimas también requieren de un inductor para propiciar la producción de lipasas como puede ser aceite, triglicéridos, ácidos grasos, ésteres hidrosolubles, sales biliares o glicerol (Gupta et al. 2004; Sharma et al. 2001). Las fuentes de carbono por medio de lípidos han sido reportadas como las óptimas para las producciones más altas de lipasas. De igual manera se deben considerar las necesidades de nitrógeno y micronutrientes para la optimización del sistema. Estas necesidades pueden ser satisfechas por diferentes fuentes como pueden ser azúcar, aceites, componentes peptonados, extractos de malta o levadura, incluso residuos industriales que contienen los nutrientes necesarios para el desarrollo del microorganismo (Treichel y col., 2009).

La actividad catalítica de las enzimas en medio orgánico depende en gran medida de que estos disolventes mantengan la estructura proteica, que viene condicionada por una multitud de puentes de hidrógeno que se forman entre la proteína y el medio que la rodea. De hecho, las enzimas presentan su actividad óptima para una conformación definida que vendrá determinada por un conjunto de interacción tipo puente de hidrógeno, iónicas, covalentes e hidrofóbicas (Lehninger y col., 2001).

Para preservar la conformación ya mencionada, es necesaria la presencia de lo que se denomina capa de hidratación, cuya pérdida supone normalmente un fuerte descenso en la actividad catalítica (Alarcón, 2008)

2.8.1 Actividad de Agua (a_w)

Las enzimas necesitan conservar la capa de hidratación para realizar su actividad catalítica, sin embargo, la cantidad de agua necesaria dependerá de cada caso y de igual manera, tendrá suma importancia el disolvente utilizado y sus características (Alarcón, 2008); la respuesta de las enzimas a un incremento en la actividad del agua varía considerablemente de unas a otras. Así, como hay lipasas que expresan su máxima actividad a valores tan bajos como 0.0001, mientras que

otras requieren valores más altos. Si comparamos la a_w a la que las enzimas expresan el 10% de su máxima actividad en el caso de las glicosidasas se sitúa entre el 0.5-0.8 mientras que en las lipasas sería entre 0 y 0.2; por otra parte, cuando las moléculas de agua interactúan con una enzima, es natural que puedan producirse cambios conformacionales que podrían afectar la selectividad de una enzima aunque es difícil generalizar los efectos, siendo que el agua se considera el mejor disolvente para trabajar con una enzima, algunos ejemplos de las interacciones pueden ser la hidrólisis de enlaces peptídicos en la enzima, reacciones de deamidación de los aminoácidos de cadenas laterales y destrucción de enlaces cistina (Sánchez, 2012).

2.8.2 Agregación Molecular

Dado el carácter hidrofóbico de la zona de contacto lipídico cercana al centro activo, no es descartable su interacción con otras sustancias de su misma naturaleza presentes en el medio, incluyendo las zonas hidrofóbicas de otras moléculas de enzima. Estas interacciones conducirían a la formación de agregados con baja o ninguna actividad catalítica, debido al bloqueo de los centros activos por las propias moléculas enzimáticas. El fenómeno de agregación en soluciones acuosas ha sido demostrado experimentalmente por varios grupos de investigadores, los que obtuvieron un rápido descenso de la actividad enzimática al aumentar la concentración de enzima (González, 2010).

2.8.3 Efecto del pH y la Temperatura.

El pH ejerce un efecto de ionización sobre las enzimas, y con ello inactivación enzimática, que a diferencia de la desnaturalización térmica es un proceso reversible, mediante cambios de tampón que nos modifique el pH (Alarcón, 2008). Las condiciones óptimas de pH dependen, entre otros factores, del sustrato (Berner y Hammond, 1970) y del tampón empleado. El pH óptimo para las lipasas se encuentra generalmente en el intervalo entre 7.0 y 9.0, cuando la actividad enzimática se ensaya frente a sus sustratos específicos, como el aceite de oliva, la

tributirina, otros triacilglicéridos pequeños y la trioleína. No obstante, para algunas lipasas, el pH óptimo se encuentra en la región acidia. Así mismo, se han encontrado lipasas con la mayor actividad a valores de pH más alcalinos (González et al., 2010). También puede suceder que se obtenga más de un valor de pH óptimo, manteniendo invariables las demás condiciones del ensayo (Kiyotani et al., 1983).

La temperatura óptima para una enzima depende, entre otros factores, del sustrato con el que se trabaje, ya que los ligandos ejercen un efecto protector frente a la desnaturalización térmica, la temperatura óptima para las lipasas puede encontrarse en el intervalo entre 35 y 50 °C, aunque existen lipasas termoestables que exhiben valores de temperatura óptima superiores a 50 °C. El medio en el que se encuentre la enzima también influye en el valor de temperatura óptima. De este modo, las lipasas presentes en preparados crudos, con altas concentraciones de otras proteínas contaminantes distintas de las proteasas, serán más estables y exhibirán valores aparentes de temperatura óptima superiores (González et al., 2010) ya que, un exceso de temperatura puede provocar un fenómeno llamado desnaturalización (atacando los puentes de hidrógeno principalmente) en la enzimas, provocando la pérdida de su estructura tridimensional y como consecuencia la pérdida de la función catalítica (Alarcón, 2008).

2.9 Aplicación Biotecnológica de las Lipasas.

El interés por el enorme potencial biotecnológico de lipasas microbianas es debido a que los factores de que estas son estables en solventes orgánicos, no requieren cofactores, poseen una amplia especificidad de sustrato y muestra una elevada enantioselectividad (Jaeger and Reetz, 1998).

Los campos de aplicación de lipasas tienen buenas perspectivas en la industria alimentaria, tal es así como en la industria de la panificación el uso de lipasas 1,3-especifica, tienen un excelente efecto acondicionador de masa, facilitando su uso en maquinas convencionales, además, aumenta el volumen del pan, mejora la

textura de la miga y confiere también un color mas blanco, en esta aplicación, las lipasas degradan los lípidos del trigo, modificando su interacción con el gluten, permitiendo que el gluten obtenga una red más fuerte y elástica (Mendoza, 2010).

También en la producción de salchichas fermentadas, la aplicación de *Rhizomucor miehei* presenta aspectos económicos positivos ya que permite la disminución del tiempo de maduración manteniendo características analíticas y sensoriales (Pandey et al., 1990).

De igual manera las lipasas han sido aplicadas para la degradación biológica, y remoción de carga lipolítica de efluentes industriales generados en frigoríficos, mataderos, industrias lácteas y alimentarias en general (Gandhi, 1997). En este contexto, los procesos alternativos que facilitan la recuperación o disminución de grasa de efluentes son de extremo interés para la industria (Mendoza, 2010).

Una de las mayores aplicaciones de las lipasas es en el uso de detergentes; en la industria del papel para eliminar la resina de la pulpa producida; además, de un gran número de aplicaciones hidrolíticas adicionales de las lipasas microbianas han sido descritas, incluido el desarrollo de sabores de productos cotidianos (quesos, mantequillas, margarinas, bebidas alcohólicas, leche sabor chocolate y algunos dulces) logrados por hidrólisis selectiva de triglicéridos de grasa para la obtención de ácidos grasos libres (Jaeger and Reetz, 1998), así como la síntesis de antitumorales, antioxidantes y compuestos fluororgánicos y, también, en la construcción de biosensores y producción de biodiesel (Hasan et al., 2006).

2.10 Producción de Lipasas. Medios de Cultivo.

Una gran variedad de microorganismos secretan lipasas durante su crecimiento en residuos orgánicos y agroindustriales, ya que éstos contienen una abundante fuente de nutrimentos que sirve como medio de cultivo para que los microorganismos sean capaces de producir estas enzimas (Diez y col., 2012).

Los medios de cultivo pueden definirse como un conjunto de elementos o sustancias que en concentraciones adecuadas y con condiciones físico-químicas

óptimas garantizan a un microorganismo, célula, o a un grupo de ellos, los nutrimentos necesarios para su conservación, crecimiento y desarrollo (Morales, 2006).

2.10.1 Medio Líquido.

El cultivo de hongos filamentosos en medio líquido es muy recomendado, dado que no solo permite una fácil cuantificación del material obtenido a lo largo del cultivo, sino también el estudio de las principales características fisiológicas del hongo. En especial por tratarse de un sistema homogéneo que facilita el intercambio gaseoso y evita la autólisis prematura de la célula, asegurando de esta forma un buen crecimiento celular. Estas enzimas extracelulares, presentes en cantidades suficientes por los hongos en el cultivo líquido pueden ser detectadas y caracterizadas fácilmente por electroforesis (Flores y col., 2005).

Corresponden a los también denominados caldos. No contienen agar y su composición además suele tener una fuente de carbono, sales minerales y, en algunas ocasiones, según las características del medio, factores de crecimiento, vitaminas, peptonas, etc. Son muy importantes para la realización de múltiples pruebas bioquímicas, como también para la realización de inóculos. Algunos medios líquidos son utilizados en tubos lo que permite visualizar colonias pero tienen muchas aplicaciones, por ejemplo, pruebas bioquímicas que permiten la determinación del indol, la reducción de nitratos a nitritos, la fermentación de la glucosa, lactosa u otro tipo de azúcar, etc. (Morales, 2006).

En los últimos años algunas de las pruebas en medio líquido para la obtención de lipasas ha tenido un mayor auge, autores como Burket y col. (2004), realizó diferentes fermentaciones en medio líquido para probar distintas fuentes de carbono y obtener una mayor actividad enzimática llegando hasta 17 U/mL, así mismo, Kaushik y col. (2006) probó con distintas fuentes de carbono, modificando la agitación y tiempo de fermentación obteniendo 12.7 IU/mL. Zhao y col. (2008) realizó un escalamiento a nivel planta piloto (800 L) logrando obtener actividad

enzimática de 14,000 IU/mL, lo que indica ser una técnica prometedora para la producción de lipasas a escala.

2.10.2 Medio Sólido.

La fermentación en medio sólido (FMS) se define como el cultivo de microorganismos en soportes sólidos húmedos, ya sea en soportes inertes o en sustratos insolubles que además pueden ser utilizados como fuente de carbono y energía (Carrillo, 2011). La fermentación se lleva a cabo en ausencia o casi ausencia de agua libre; aunque, el sustrato debe poseer suficiente humedad para soportar el crecimiento y metabolismo del microorganismo. Esto se acerca al ambiente natural al cual los microorganismos están adaptados (Pandey y col., 2003). La FMS es relativamente resistente a la contaminación bacteriana, puesto que el crecimiento bacteriano está limitado por la baja actividad de agua, así que rara vez ocurre la contaminación en un medio sólido (Lenis, 2011).

Entre las aplicaciones de la FMS se encuentra la producción de metabolitos secundarios, aflatoxinas, enzimas, cultivo de hongos, entre otras. Se pueden distinguir dos tipos de sistemas en FMS dependiendo de la naturaleza de la fase sólida utilizada. El primer sistema y más comúnmente utilizado involucra el cultivo en un material natural; a este sistema se le denomina “cultivo en sustratos naturales”. El segundo sistema, que no es tan frecuentemente utilizado, involucra el cultivo en soportes inertes impregnados con un medio líquido, sirviendo como punto de anclaje para el microorganismo. Algunos ejemplos de este tipo de soporte son: agrolita, espuma de poliuretano, bagazo de caña y vermiculita. Existen ventajas del uso de soportes inertes impregnados con un medio líquido sobre los soportes-sustratos. La primera sería que al emplear soportes inertes la recuperación del producto es menos complicada al contener menos impurezas. Al emplear un medio químicamente definido, los efectos de ciertos componentes del medio en la fisiología y cinéticas de crecimiento del microorganismo y en la producción de metabolitos, enzimas y esporas, pueden ser estudiados a detalle. También se puede mejorar la consistencia en los proceso ya que medios

químicamente definidos apoyan la reproducibilidad de los procesos (Carrillo, 2011).

Una desventaja del uso de soportes inertes frente a los naturales es el costo. Aunque para productos de alto valor agregado como son las enzimas, se pueden emplear soportes inertes ya que el costo de este solo representa una fracción de los costos generales de producción (Ooijkaas y col. 2000). Sin embargo, la producción a escala industrial no ha sido del todo desarrollada, los bajos contenidos de humedad generan limitaciones para la transferencia de masa y calor produciendo ambientes heterogéneos y sobrecalentamiento con deficiente suministro de oxígeno indica Cavalcanti y col. (2005), misma quien obtuvo 26.4 U/g a partir de *Penicillium simplicissimum*.

Uno de los soportes inertes empleados en la FMS es la agrolita. Este tipo de soporte ha sido empleado en la producción de lipasa por cepas de *Rhizopus sp.* (Carrillo, 2011).

2.11 Tipo de Reactores.

2.11.1 Tanque Agitado.

Puede ser *discontinuo*, *fed-batch* (*alimentado en discontinuo*) y *continuo* (Cunill, et al., 2010).

- *Discontinuo*: es el más tradicional y el más ampliamente utilizado a escala industrial. El tiempo de operación necesario puede ir desde horas a varias semanas dependiendo de la conversión y de las condiciones de operación. Durante la operación ha de evitarse la contaminación, mantener la agitación, y controlar pH y temperatura. Operan con baja densidad celular, sobre todo en el periodo inicial, y debe evitarse la alimentación de concentraciones elevadas de substrato para evitar inhibiciones por éste o por el producto. Se emplea mayoritariamente en la industria alimentaria, farmacéutica y biotecnológica, en general, ya que en ellos es fácil alcanzar y mantener condiciones asépticas durante la operación. Este hecho es importante a la hora de mantener en procesos en los que se emplean

medios muy ricos en nutrientes. Ejemplos típicos son la producción de ácido acético, de vitamina C y C12, levadura de panificación, penicilina y digestión anaerobia de fangos (microorganismos producidos en los tratamientos continuos de aguas residuales).

En general las variables de diseño son:

- Dimensiones del reactor
 - Tiempo de operación
 - Concentraciones iniciales
 - Volumen de masa microbiana por unidad de volumen de reactor
 - Potencia y aeración
 - Superficie de transferencia de calor
- *Fed-batch*: el substrato se alimenta en cargas sucesivas y no se retira producto alguno, variando así el volumen de reacción. Variando la velocidad y concentración del alimento se controla o altera la concentración de uno o más nutrientes o substrato en el medio de cultivo. Con ello se aumenta la productividad global. Esta estrategia se aplica en la producción de levadura de pan y de antibióticos.
- *Continuo*: este reactor tanque agitado continuo recibe también el nombre de quimiostato. Este reactor no es básicamente diferente al discontinuo, excepto en los dispositivos que permiten la entrada y salida de un caudal. Sin embargo, este tipo opera en estado estacionario, lo que implica condiciones uniformes no sólo desde el punto de vista geométrico, sino también respecto al tiempo. El control de las variables de operación es mucho más fácil, pero los valores de las variables no pueden ser cualesquiera. Si el caudal es demasiado elevado puede suceder que la producción de microorganismos sea inferior al número de los que son arrastrados por la corriente de salida y, en consecuencia, si la situación persiste llega a suceder que no queda ningún microorganismo en el interior

del reactor. Se dice que han sido lavados (wash-out) del fermentador. La situación se puede paliar añadiendo en la alimentación microorganismos similares a los del reactor. La fuente natural de estos microorganismos es evidentemente la corriente de salida. Así, se pasa el efluente por un sedimentador o por una centrifuga, y se separa una solución concentrada de microorganismos que en buena parte se recicla al reactor. Con este procedimiento no solo se evita el lavado de células, sino que también se aumenta la producción al aumentar el tiempo de permanencia de los microorganismos en el reactor. En la industria es frecuente el uso de una serie de tanques agitados con el fin de aumentar la productividad o para poder variar las condiciones ambientales en cada etapa.

2.11.2 Tubular.

Hay que destacar para este biorreactor que no es factible la operación cuando se alimenta un medio estéril, dado que se trata de un proceso autocatalítico. Este inconveniente se solventa con una recirculación o con microorganismos inmovilizados. Según la disposición de los microorganismos se dividen en (Cunill, et al., 2010):

- *De flóculos en suspensión:* un floculo es un agregado de microorganismos con un tamaño un orden de magnitud superior al del microorganismo. El mecanismo que controla dicho tamaño no está muy bien conocido pero puede actuar sobre él la agitación y los agentes floculantes como el cloruro de aluminio y el de calcio. El hecho de ser seres vivos le confiere una no rigidez, densidad y crecimiento, una posible compactación, densidades parecidas a las de la fase fluida, y los consecuentes bajos caudales hacen que la operación en lecho fijo no sea viable. La operación viable conlleva arrastre de microorganismos y consecuentemente una necesaria alimentación de los mismos.

- *De película*: los microorganismos se disponen en forma de película que crece sobre la superficie de un relleno inerte. El grosor de la película se controla retirando el exceso de producción microbiana normalmente por métodos mecánicos. No presenta problemas de arrastres. Es muy usado en el tratamiento de aguas residuales y recibe el nombre de filtro percolador o de goteo. Es un lecho de inerte sobre el que se forma la película microbiana y en el que el líquido circula en flujo descendente por gravedad mientras que el oxígeno suele hacerlo en ascendente. Su altura varía entre 2 y 15 metros. El control del grosor de la película lo realizan los propios organismos ya que al aumentar se crean problemas de difusión para el oxígeno con lo que los microorganismos no pueden metabolizar el sustrato, pierden adherencia y acaban desprendiéndose.

2.11.3 Lecho Fluidizado.

Cualitativamente se puede representar suponiendo que el líquido circula en flujo en pistón y la masa microbiana permanece flotando en el medio en condiciones estacionarias. Como las diferencias de densidad entre flóculos y líquido son bajas los caudales utilizados son bajos. Un ejemplo típico es la torre de fermentación destinada a la producción de cerveza (Iborra, et al., 2010)

2.12 Optimización de Medios de Cultivo.

El desarrollo inicial de un medio químicamente definido normalmente comienza con la selección más o menos arbitraria de una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, sales inorgánicas, elementos traza y factores de crecimiento. El mayor factor para la expresión de la actividad lipasa siempre se ha reportado como la fuente de carbono, ya que las lipasas son enzimas inducibles. Estas enzimas son generalmente producidas en la presencia de lípidos tales como aceites u otros inductores, como triglicéridos, ácidos grasos, esteres hidrolizables, surfactantes (Tweens, sales biliares, etc.) y glicerol. Aunque este medio podría dar buenos

resultados, después de la formulación inicial del medio es común establecer los nutrimentos apropiados y óptimas concentraciones de estos (Carrillo, 2011).

Usualmente esto es determinado mediante el proceso de optimización que involucra el método de una variable a la vez, OVAT por sus siglas en inglés (one-variable-at-a-time), variando un factor mientras se mantienen los otros factores a un nivel constante. Es una técnica sencilla aunque se requiere de mucho tiempo y trabajo y además descuida la interacción entre variables y no garantiza alcanzar el punto óptimo (Babu et al., 2007).

El diseño estadístico que involucra la variación simultánea de varios factores es útil en la identificación de los nutrimentos importantes y en la interacción entre dos o más nutrimentos. Este tipo de diseños se emplean en la metodología de superficie de respuesta (MSR). La MSR es la estrategia experimental y de análisis que permite resolver el problema de encontrar las condiciones de operación óptimas de un proceso, es decir, aquellas que dan por resultado “valores óptimos” de una o varias características de calidad del producto (Carrillo, 2011).

2.13 Diseño Experimental. Genichi Taguchi.

El diseño de experimentos es una técnica estadística poderosa para determinar el ajuste óptimo de los factores que afectan un proceso, para mejorar su funcionamiento, reducir su variabilidad y mejorar la manufactura de productos. Taguchi muestra como el diseño de experimentos estadísticos puede ayudar a los ingenieros a diseñar y manufacturar (Báez, 2010). El poder de los métodos Taguchi es que integra técnicas estadísticas dentro de la ingeniería de procesos, por lo que según Li et al., (2005), son ampliamente utilizados para lograr ciertos objetivos en la media de la variable de respuesta mientras simultáneamente se minimiza la varianza.

Taguchi desarrolló una aproximación al diseño de experimentos con el objetivo de reducir los costos emanados de la experimentación, esta aproximación es más práctica que teórica y se interesa más por la productividad y los costos de producción que por las reglas estadísticas (Montes de Oca, 2009).

Para el estudio de los factores que afectan a un producto o proceso, Taguchi se basa en un conjunto pequeño de matrices del diseño. Estas matrices definen diseños ortogonales. En la metodología Taguchi se reduce el número de filas de la matriz del diseño mediante identificación de factores principales y de factores de interacción. Esto permite una mayor viabilidad del estudio de tratamientos. Por ejemplo, para el diseño 2^7 (7 factores con dos niveles) Taguchi considera la siguiente matriz (figura 7) (Ruiz., 2004):

$$\begin{bmatrix} 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 \\ 1 & 1 & 1 & 2 & 2 & 2 & 2 \\ 1 & 2 & 2 & 1 & 1 & 2 & 2 \\ 1 & 2 & 2 & 2 & 2 & 1 & 1 \\ 2 & 1 & 2 & 1 & 2 & 1 & 2 \\ 2 & 1 & 2 & 2 & 1 & 2 & 1 \\ 2 & 2 & 1 & 1 & 2 & 2 & 1 \\ 2 & 2 & 1 & 2 & 1 & 1 & 2 \end{bmatrix}$$

Figura 7. Matriz con siete factores y dos niveles de Taguchi.

Con un conjunto relativamente pequeño de diseños, Taguchi proporciona un catalogo reducido de modelos que permiten abordar un número relativamente alto de experimentos en ingeniería. Taguchi considera los siguientes diseños ortogonales fraccionarios con dos niveles: L_4 , L_8 , L_{12} , L_{16} , L_{32} y L_{64} . En general, un diseño L_N está definido mediante una matriz del diseño con N filas y permite considerar hasta N-1 factores (Ruiz, 2004).

2.14 Consideraciones del Proyecto.

Las investigaciones científicas y más aun sustentadas por el sector privado tiene como una necesidad la conservación de cepas que mantengan sus características (genéticas y morfológicas) propias del tipo de microorganismos que son de su interés, para lo cual se ha puesto atención en distintos métodos para dicho fin siendo considerados métodos por cepas liofilizadas, congelación con nitrógeno

líquido y agua destilada estéril por mencionar algunos, este último puede llegar a ser el más utilizado debido a que es un método simple, económico y seguro llegando a conservar el hongo por largos periodos, además de evitar el crecimiento de ácaros y el pleoformismo (Bueno y col. 1998; Rico y col., 2004).

Durante este estudio se conservó la cepa *A. niger* GH1, lo que evitó que pudiera ser alterada por un agente químico o microbiológico.

Al iniciar un escalamiento para la producción de enzimas se debe tomar en cuenta ciertos puntos que garanticen la viabilidad de la producción, como primer punto es la selección del microorganismo que muestre características de adaptabilidad, medio de cultivo económico, requerimientos nutricionales simples, alta producción de enzima, estabilidad, etc. Ya que existen variedad de microorganismos que bien pueden ser hongos, bacterias o de procedencia por levaduras productores de lipasas con muy buenos rendimientos como *Candida rugosa*, *Candida antártica*, *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas alcaligenes*, *A. niger*, *A. sp.*, *Rhizopus homothallicus*, algunos *Penicillium*, etc.; otro punto importante es la selección de un biorreactor adecuado a las necesidades de producción y para el desarrollo del experimento; el tercer paso es la selección y desarrollo de modelos matemáticos como herramienta para el escalamiento del proceso y; finalmente el análisis económico (rentabilidad) del procesos (Treichel y col., 2009; Potumarthi y col., 2008).

CAPITULO 3

3.1 MATERIALES Y METODOS

El desarrollo de este trabajo se realizó en las instalaciones de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro en conjunto con las empresas Grupo Kappa del Conocimiento S. C. y Nanoingredientes Bioactivos S. A. de C. V.; ubicadas en la ciudad de Saltillo, Coahuila, México.

La cepa fue obtenida de la Colección de Cepas del Departamento de Investigación de Alimentos de la Universidad Autónoma de Coahuila (DIA de la UAdeC). Se realizó una siembra para conservación del hongo para evitar alguna contaminación o la pérdida de la cepa.

3.1.1 Conservación a Largo plazo.

Se prepararon 20 mL de agar PDA en un matraz y se esterilizaron con el material necesario para sembrar el hongo. Una muestra de la cepa fue tomada con el sacabocados a flama de mechero y con ayuda de un asa estéril se inoculo en el centro del matraz con PDA. Se incubo durante 48-72 horas a 30 °C monitoreando el crecimiento.

Una vez que hubo suficiente crecimiento se preparó una solución de leche descremada y glicerol al 10 % la cual fue esterilizada. La solución fue vertida sobre el matraz (20 mL) con el hongo y con ayuda de un magneto estéril fue homogenizada la muestra en una plancha de calentamiento sin utilizar calor durante 5-10 minutos; en un área estéril utilizando la micropipeta se llenaron suficientes tubos Eppendorf y puestos a congelación. *Anexo A.*

3.1.2 Conservación a corto plazo.

En un área estéril se llenaron los tubos Eppendorf con 600 – 1000 μ L de agua destilada estéril y, a partir de la caja petrí con la cepa proporcionada se tomo con el sacabocados y el asa entre 4 y 5 muestras colocándolas dentro del tubo. Esto

permitió conservar a temperatura ambiente el hongo y, así mismo, facilitar su utilización en cuanto se requirió inocular. *Anexo A.*

3.2 Reconocimiento del equipo.

Previo a iniciarse una primera fermentación, se realizó una revisión y caracterización del nuevo equipo y su funcionamiento, el cual fue un reactor equipado New Brunswick Scientific BIOFLO 115 de 2 L.

Se ensambló y los sensores a utilizar fueron calibrados de acuerdo a las recomendaciones descritas en el manual del equipo para verificar el correcto funcionamiento del mismo, las pruebas se realizaron en agua destilada para verificar el funcionamiento. *Anexo B.*

3.3 Fermentaciones.

El medio de cultivo optimizado en trabajos anteriores contaba con las siguientes características (peso en g) para un volumen de 20 mL:

- FeSO₄ 0.0005
- MgSO₄ 0.015
- K₂HPO₄ 0.05
- NaNO₃ 0.04
- KCl 0.01
- Aceite de oliva extra virgen al 1% en volumen
- Inoculo 1×10^7 esporas/mL

La fermentación se llevó a cabo en un reactor equipado New Brunswick BioFlo/CelliGen 115 de 2 L de capacidad. El volumen utilizado de medio de cultivo fue de 1.5 L, a la cual se le inoculó una cantidad de esporas 75×10^7 (cantidad correspondiente al volumen de escalamiento). La primera fermentación se realizó durante 168 h bajo las siguientes condiciones para la evaluación de los trabajos realizados a nivel laboratorio y observar el comportamiento en reactor.

- pH 7.0

- Aireación 1 VVM
- Agitación 150 rpm
- Temperatura 30 °C

Antes de inocular se aplica la técnica de Gassing Out para la calibración del sensor de oxígeno. *Anexo C.*

Posteriormente se realizaron fermentaciones con la variable de temperatura considerando 20, 30 y 35 °C. Manteniendo los demás parámetros constantes durante estos experimentos. Estas fermentaciones tuvieron un tiempo de hasta 216 h tomando muestras cada 24 h.

3.4 Optimización de las Condiciones de Fermentación.

Para la siguiente etapa experimental se evaluaron las siguientes variables para la optimización a nivel reactor utilizando un diseño experimental de Taguchi L8:

- Agitación 150, 200 y 300 (rpm)
- Aireación 0.5, 1.0 y 1.5 (VVM)

3.5 Obtención de Producto Enzimático

Las muestras obtenidas fueron filtradas al vacío utilizando filtros de 0.45 μ m; el líquido obtenido se consideró como producto enzimático y fue conservado a 0 °C para su posterior análisis.

3.6 Análisis de Actividad Enzimática

El análisis de actividad enzimática fue realizado con base en la técnica de p-NPP reportada por Bastida et al. (1998), que radica en la medición del incremento de absorbancia a 348 nm producida por la liberación de p-nitrofenol en la hidrólisis de 0.4 mM pNPP a pH 7.0 y 25 °C, se considero 37 °C para el desarrollo de esta técnica, así como la adición de 0.016 mL de extracto enzimático a 0.160 mL de sustrato. Una UE (Unidad Enzimática) es considerada como la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar 1 μ mol de p-NPP por minuto bajo las condiciones descritas anteriormente.

3.7 Análisis de Biomasa

La medición de biomasa se realizó por la medición de peso seco. Previamente se hizo un lavado de las muestras utilizando alcohol-cetona al 30%. Las muestras fueron secadas a 80 °C durante 30 h.

CAPITULO 4

Resultados y Discusiones.

4.1 Desarrollo de Fermentación. Efecto de la Temperatura en la Producción de Lipasas.

Para analizar el desarrollo del proceso fermentativo se realizó una fermentación preliminar bajo las siguientes condiciones: pH 7.0, agitación 150 rpm, aireación 1 VVM y una temperatura de 30 °C por un periodo de 216 h para evaluar el tiempo óptimo de fermentación. Durante este experimento preliminar se observó una pérdida de medio de cultivo de hasta un 55 % aproximadamente (figura 8), atribuida a una rápida salida del aire húmedo causando su evaporación. Por esta razón, se decidió analizar más temperaturas a este nivel para reducir tal pérdida, así como implementar un condensador que ayude a la recuperación del volumen.



Figura 8. Evaporación de medio de cultivo.

Para las próximas fermentaciones se consideraron las temperaturas de 20, 25, 30 y 35 °C manteniendo constantes las condiciones restantes. Se observaron los siguientes resultados (cuadro 2) en cuanto a pérdida del medio:

Cuadro 2. Influencia de la temperatura y la pérdida de medio de cultivo.

Temperatura de Fermentación (C°)	Pérdida de Medio (%)
20	4
25	12
30	16.5
35	18

Se observó una pérdida de medio a las distintas temperaturas. En este trabajo se consideraron las dos temperaturas de fermentación con mayor actividad enzimática para la optimización de las condiciones.

También podemos observar que la temperatura óptima de producción de lipasas con *A. niger* es mayor a la de producción de biomasa (figura 9). Tal y como señala Peña (2006): la producción de enzimas a menudo difiere de la producción de biomasa sin estar en función de esta, lo que es notable en esta situación, posiblemente debido al estrés al que somete el hongo, forzándolo a producir mayor cantidad de enzimas para obtener mayor cantidad de nutrimentos a partir del sustrato y así logre adaptarse o protegerse con mayor rapidez a las condiciones del medio.

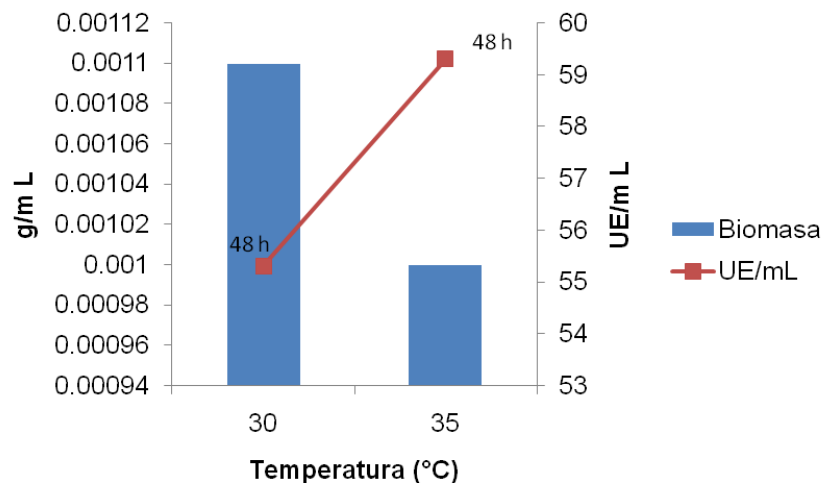


Figura 9. Relación producción de Biomasa-Lipasa

La determinación de la temperatura óptima para reducir la cantidad de evaporación fue en base a la cantidad de enzima producida y la producción de biomasa como segundo aspecto en un tiempo mínimo.

En el análisis a distintas temperaturas, la fermentación a 30 °C desarrolló la mayor cantidad de biomasa aunque la mayor actividad enzimática se produjo a los 35 °C en un mismo tiempo de fermentación (cuadro 3), así, autores como Camacho y col. (2009) utilizando otros microorganismos donde igualmente encontraron que un aumento en la temperatura (50 °C) favorece la producción de lipasas mientras que el crecimiento óptimo lo encuentran a 42.5 °C utilizando una arquea halófila; Córdova y col. (2003) dicen que el crecimiento fúngico y la biosíntesis de lipasas responden de manera diferente al incremento de temperatura utilizando *Rhizopus microsporus*. Posiblemente ante una mayor temperatura y considerando las condiciones de agitación en el reactor, sea más difícil para el hongo formar micelio tendiendo a secretar mayor cantidad de enzimas para la obtención de energía a partir del sustrato y sus funciones metabólicas no sean afectadas y, por consiguiente la obtención de una baja densidad de biomasa.

Otra posible respuesta a con respecto a la baja producción de biomasa puede ser la baja disponibilidad de O₂ en el medio. Nordelta (2005), dice que altas temperaturas, baja presión atmosférica y la salinidad en el agua retiene menos oxígeno, considerando esto, la producción de biomasa podría ser afectada por este déficit de O₂, por otra parte, el aumento de la temperatura favorece la síntesis de lipasas como ya se ha mencionado anteriormente.

Salihu et al. (2012) recopilaron las temperaturas óptimas de producción de lipasas de diferentes microorganismos siendo entre 25 y 40 °C, entre los que cabe destacar *Aspergillus sp.*, *Rhizopus homothallicus*, *Burkholderia multivorans*.

Cuadro 3. Parámetros cinéticos: Producto-Biomasa a diferentes temperaturas de fermentación.

Fermentación (°C)	Tiempo	Biomasa	UE/mL	$Y_{P/X}$	q_p	Γ
30	168	0.0092	-	-	-	-
	216	-	59.31	1054.64	31.43	0.29
35	120	0.0050	-	-	-	-
	144	-	-	11878.12	381.90	1.91
	168	-	75.34	-	-	-

Los valores máximos obtenidos de productividad (q_p) fueron a 35°C en un tiempo de 144 h con 70.53 UE/mL, así como el mejor rendimiento de producto por gramo de biomasa ($Y_{P/X}$) (pH 7.0, 1 VVM, 150rpm). Resultados muy similares reporto Potumarthi et al., (2008), con 72 U/mL después de 96 h en condiciones de 2 VVM, 200 rpm, pH 7.0 y a 25 ± 2 °C utilizando *R. mucigilana*.

Durante las fermentaciones la mayor productividad de lipasas se presentó a las 216 y 144 h a 30 y 35 °C respectivamente (figura 10). El que la productividad se presente en los puntos que indiquen muerte celular puede ser atribuido a que la evaporación del medio provoca concentración las lipasas y otros productos obteniendo mayor actividad enzimática por mL.

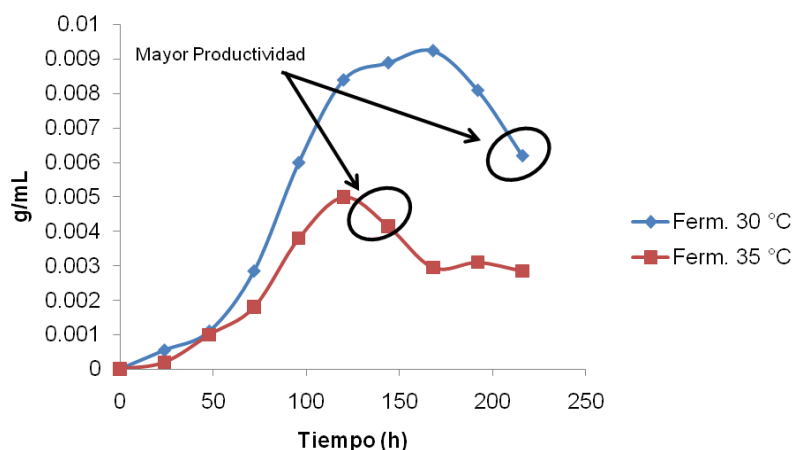


Figura 10. Productividad de lipasas a 30 y 35°C de fermentación.

Aunque también cabe mencionar que la fermentación a 30 °C mostró datos muy interesantes a las 48 h, una biomasa de 0.0011 g/mL y una actividad enzimática de 55.31 UE/mL. Después de este periodo de tiempo, los experimentos tuvieron distintos comportamientos respecto a la producción de biomasa y enzimas. Lo que muestra el grado en que la temperatura afecta la disponibilidad de los nutrientes y por consiguiente a la velocidad síntesis de enzima y biomasa.

La modificación de las condiciones ha mostrado tener grandes repercusiones sobre la producción tanto enzimática como en biomasa, en este estudio se pudo reducir la evaporación de medio de cultivo, aumentar la producción de enzimas aunque la biomasa tuvo un descenso de acuerdo a las condiciones de mejor productividad determinadas. Estudios como el de Brozzoli et al. (2009) evaluaron la producción de lipasas de *C. cylindracea* modificando los valores de pH teniendo un incremento de 1.8 a 18.7 UE/mL. Esto corrobora que se puede aumentar la productividad de un proceso a fin de obtener mayor producto si se analiza la influencia de cada variable posible.

Lin et al. (2006), utilizaron *Antrodia cinnamomea* analizando la influencia de diferentes condiciones de cultivo obteniendo una máxima actividad de 54 U/mL hasta los 17 días. En esta etapa se logró un incremento de la actividad enzimática de 27.36 a 70.53 UE/mL en un tiempo de 144h.

4.2 Análisis de la Actividad Enzimática y Optimización de las Condiciones de Fermentación.

Una vez reducida la evaporación del medio de cultivo se inició la etapa de optimización de las condiciones de la fermentación para poder efectuar el escalamiento para la producción de lipasas.

En esta etapa se aplicó un diseño experimental de Taguchi L-8. El Cuadro 4 muestra la forma que se distribuyeron los experimentos.

Cuadro 4. Diseño experimental Taguchi.

Datos Experimentales			
Experimento	Agitación (rpm)	Oxígeno (VVM)	Tiempo (h)
1	200	0.05	48
2	200	0.05	48
3	200	1.5	72
4	200	1.5	72
5	300	0.5	72
6	300	0.5	72
7	300	1.5	48
8	300	1.5	48

La actividad enzimática realizada de los distintos experimentos fueron analizados con el software *Qualitek-4*. Cuadro 5.

Cuadro 5. UE obtenidas por cada experimento.

Datos Experimentales				
Experimento	Agitación (rpm)	Oxígeno (VVM)	Tiempo (h)	UE/mL
1	200	0.05	48	45.69
2	200	0.05	48	28.85
3	200	1.5	72	60.11
4	200	1.5	72	56.51
5	300	0.5	72	57.71
6	300	0.5	72	56.51
7	300	1.5	48	62.52
8	300	1.5	48	62.52

El análisis ANOVA se realizó utilizando el software *Qualitek-4*. Cuadro 6.

Cuadro 6. Análisis ANOVA.

Columna	Factor	DOF (f)	Suma de Cuadrados (S)	Varianza (V)	F - Ratio (F)	Suma Neta (S')	Porcentaje P (%)
1	Agitación	1	289.322	289.322	7.776	252.115	27.695
2	Oxígeno	1	349.932	349.932	9.405	312.726	34.353
3	Tiempo	1	122.225	122.225	3.285	85.018	9.339
	Otro Error	4	148.825	37.206			28.613
Total:		7	910.306				100.00%

De acuerdo al diseño TaguchiL-8, podemos observar como el Oxígeno es la variable de mayor importancia seguida por la agitación y por último el tiempo de proceso (figura 11). Sokolovska et al. (1998) usando *C. cylindracea* CBS 6330 con una saturación de oxígeno por encima del 20% favoreció la producción de lipasas.

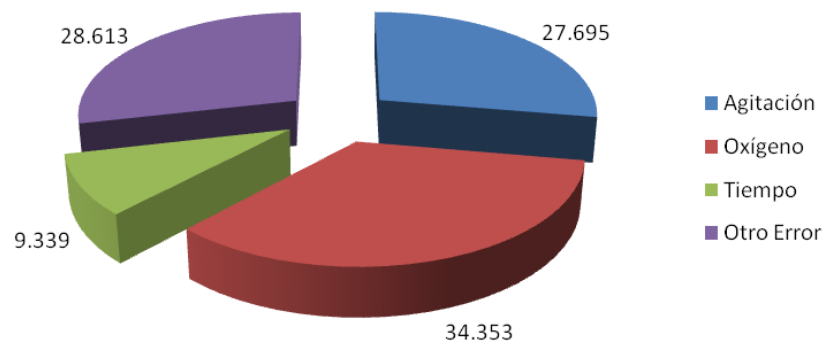


Figura 11. Influencia de las variables en el diseño experimental.

El modelo obtenido (cuadro 7) muestra una producción esperada de hasta 70 UE/mL en un periodo de 72 h, en la literatura se mencionan rendimientos similares o incluso menores en mayor tiempo de fermentación, tal es el caso de Kim and Hou (2006) con *C. cylindracea* NRRL Y-17506 que obtuvieron 23.7 U/mL a 179.5 h, o como ya mencionado, Potumarthi et al. (2008) con 72 U/mL a 96 h.

Sin embargo la cantidad de enzima obtenida en el modelo propuesto fue de 31.41 UE/mL (cuadro 8), aunque fue bajo estas condiciones donde se obtuvo la mayor cantidad de biomasa, así como un consumo del 16.6 % del medio de cultivo. Este último, tal vez provocado por el aumento en el flujo de aireación. La agitación ayudo a una mayor heterogeneidad del medio, lo que pudo contribuir a la disponibilidad de los nutrimentos para el hongo causando el aumento de biomasa (0.010 g/mL) y la poca producción de enzimas.

Cuadro 7. Modelo de las condiciones óptimas propuesto para la producción de lipasas.

Columna	Factor	Nivel de descripción	Nivel	Contribución
1	Agitación	300	2	6.013
2	Oxígeno	1.5	2	6.613
3	Tiempo	72	2	3.908
Contribución total de todos los factores				16.533
Promedio general de rendimiento				53.801
Resultado esperado a óptimas condiciones				70.335

Cuadro 8. Producción de lipasas en modelo desarrollado.

UE/mL	Promedio UE/mL	Desviación Estándar
31.49989058	31.41973819	0.069414009
31.37966199		
31.37966199		

4.3 Análisis de Biomasa.

En los experimentos 1 y 3 (cuadro 9) podemos observar el mayor crecimiento de biomasa probablemente debido a que un bajo suministro de O₂ y una agitación superior a las 200 rpm generan burbujas más pequeñas, facilitando la disponibilidad del oxígeno al hongo, de acuerdo con Galindo (2007), un tamaño menor de las burbujas de oxígeno tienen un área mayor disponible para la transferencia de masa, además de ayudar a obtener una mejor dispersión de las fases aumentando la eficiencia del proceso.

Cuadro 9. Biomasa obtenida en los distintos experimentos.

Experimento	Análisis de Biomasa (g/mL)			
	Peso 1	Peso 2	Peso Neto	Promedio
1	0.0761	0.0792	0.0031	0.0171
	0.0760	0.1071	0.0311	
2	0.0761	0.0810	0.0049	0.0048
	0.0811	0.0858	0.0047	
3	0.0767	0.0925	0.0158	0.0157
	0.0777	0.0932	0.0155	
4	0.0814	0.0857	0.0043	0.0038
	0.0821	0.0854	0.0033	

Potumarthi y col. (2008), dice que la cantidad de biomasa obtenida también puede deberse a que una mayor agitación causa mayor cizallamiento sobre las células resultando en una menor concentración de biomasa; hecho que pudo afectar los resultados en los experimentos.

CAPITULO 5

Conclusiones.

La biomasa y de lipasas difieren en su temperatura óptima de producción, siendo 30 y 35 °C respectivamente.

La producción de lipasas no es dependiente en su totalidad de la cantidad de biomasa presente.

La evaporación del medio de cultivo se ve influenciada por el incremento de temperatura (≥ 35 °C) y la aireación (≥ 1.5 VVM).

Se logró un incremento de la actividad enzimática de 27.36 a 70.53 UE/mL en un tiempo de 144h de fermentación modificando la temperatura (aumento a 35°C). Siendo esta la mejor productividad obtenida en la primera etapa experimental.

Las condiciones de la mejor producción obtenida en la segunda etapa experimental fueron: 300 rpm, 1.5 VVM, 35 °C a un pH de 7.0 con lo que se consiguió 60.51 UE/mL en un tiempo óptimo de fermentación de 48 h.

El modelo propuesto fue ineficiente debido a que se obtuvieron 30.41 UE/mL.

CAPITULO 6

Revisión Bibliográfica.

Alarcón M.; Producción de la Lipasa LIP2 de *Candida rugosa* en el Sistema *Pichia pastoris*: Caracterización y Aplicación en Reacciones de Síntesis. Doctorado. Departamento de Ingeniería Química. Universidad Autónoma de Barcelona, 2008.

Alquicira L.; Determinación de la Especificidad de Proteasas Fúngicas en la Hidrólisis de Proteína; Especialista en Biotecnología. Universidad Metropolitana, 2003.

Arroyo, M.; Síntesis de Ácidos 2-ARIL-Propiónicos Homoquirales Mediante Esterificación Enantioselectiva Catalizada por Lipasas Inmovilizadas. Doctorado. Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica, Facultad de Farmacia. Universidad Complutense, 1995.

Babu I. S. y Rao G. H.; 2007. Lipase production by *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589 in solid state fermentation using mixed substrate. *Research Journal of Microbiology* 2(5): 469-474.

Baez, Y.; 2010. Aplicación de Seis Sigma y los Métodos Taguchi para el Incremento de la Resistencia a la Prueba de Jalón de un Diodo Emisor de Luz. *J. Informacion Tecnologica*. Vol 21 (1), 63-76.

Bailey, J. E. y Ollis, D. F.; 1986. *Applied Enzyme catalysis. Biochemical Engineering Fundamentals*. McGraw-Hill. 2ª Ed. 157-227.

Bedford, M.; Restricciones digestivas de los ingredientes alimentarios y oportunidades teóricas para la suplementación con enzimas. Memorias del seminario sobre el empleo de enzimas en la nutrición animal. Trouw Ibérica. Madrid, España. Abril, 1991.

Berner, D. L., Hammond, E. G. 1970. Phylogeny of lipase specificity. *Lipids*. 5 (6): 558-62.

Bornscheuer, U., Reif, O. W., Lausch, R., Freitag, R., Scheper, T., Kolisis, F. N., Bueno, L. & Gallardo, R.; 1998. Preservación de Hongos filamentosos en agua destilada estéril. *Iberoamericana Micología*; 15: 166-168

Brozzoli V, Crognale S, Sampedro I, Federici F, D'Annibale A, Petruccioli, M., (2009). Assessment of olive-mill wastewater as a growth medium for lipase production by *Candida cylindracea* in bench-top reactor. *Bioresour. Technol.* 100:3395-3402.

Bühler, M., Limper, J., Müller, A., Schwarz, G., Simon, O., Sommer, M., y Spring, W. 1998. Las enzimas en la nutrición animal. Ed. AWT. Bonn, Alemania.

Burkert, J. F. M., Maugeri, F., & Rodrigues, M. I.; 2004. Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design. *Bioresource Technology*, 91,77–84.

Camacho RM y col.; 2009. Efecto del pH, la temperatura y la concentración de NaCl, sobre el crecimiento y la producción de esterasa y lipasa en la arquea halófila *Haloarcula marismortui*. Memoria de Congreso. XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería.

Carlón G.; El Uso de Enzimas en la Alimentación de las Aves. MVZ. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, 2007.

Carrillo, G.; Producción de Lipasas por *Yarrowia lipolytica* en Fermentación en Medio Sólido. Universidad Autónoma Metropolitana. Tesis: Maestría en Biotecnología, 2011.

Cavalcanti, E. A. C., Gutarra, M. L. E., Freire, D. M. G., Castilho, L. R., & Sant'Anna, G. L.; 2005. Lipase production by solid- state fermentation in fixed-bed bioreactors. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48,79–84.

Cifuentes, A. D. and Rojas, D. M.; Inmovilización de Lipasa de *Candida rugosa* en Soporte de Quitosano. Grado de Tesis: Ingeniero Químico. Facultad de Ingeniería y Arquitectura. Universidad Nacional de Colombia Sede Manizales, 2005.

Cihangir, N., Sarikaya, E; 2004. Investigation of lipase production by a new isolate of *Aspergillus* sp. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 20:193–197

Coca, J. y Dustet, J.; 2006. Expression and characterization of lipase produced by *Mucor griseocyanus*. *Biotecnología Aplicada*, 23:224-228

Coca, J., Hernández, O., Berrio, R. y Martínez, S.; 2001. Producción y Caracterización de las Lipasas de *Aspergillus niger* y *A. fumigatus*. *Biotecnología Aplicada*. 18:216-220.

J. Córdova, J. Rodríguez, J. Nungaray, O. González; Efecto de la temperatura en el crecimiento y la producción de lipasas de *Rhizopus microsporus* por fermentación en medio sólido. Memoria de Congreso. X Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Puerto Vallarta, Jalisco. 8-12 de septiembre, 2003.

Corredor, D., Caicedo, L. A.; 2005. Modelos Matemáticos para Reactores Biológicos de Lecho Empacado (PBR): Una Revisión de Bibliografía. R. Ingeniería e Investigación. Volumen 25, No. 3.

Crueger, W. and Crueger, A., 1993. Biotecnología: Manual de Microbiología Industrial. Editorial Acribia, S. A.; 413.

Cunill, F., Iborra, M., Tejero, J.; Ampliación de Reactores Químicos. Apuntes. Universidad de Barcelona; 2010.

Desnuelle, P., 1972. The Enzymes. Boyer, P. D.; Academic Press, New York, pp. 575-616.

Diez, A., Emilio, A., Sandoval, C., Margarita L.; 2012. Producción Biotecnológica de Lipasas Microbianas, una Alternativa Sostenible para la utilización de Residuos Agroindustriales. Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal. Vitae. Volumen 19, No. 3.

Dutra, J., Tersi, S., Bevilaqua, J. V., Domaso, M., Couri, S., Langone, M. A., Senna, L.; 2007. Lipase Production in Solid-State Fermentation Monitoring Biomass Growth of *Aspergillus niger* Using Digital Image Processing. Appl Biochem Biotechnol; 147: 63-75

Flores, M. C., Lopez, J. C., Valencia, A.; 2005. α -Amylase activity from the entomopathogenic fungus *Beauveria hatishiarza* growing in liquid medium. Revista Colombiana de Entomología. Volumen 31, No. 2.

Galindo, E.; Dispersiones Multifásicas en Fermentadores: Entendiendo Fenómenos que Ocurren en Tres Dimensiones y a Alta Velocidad. AI México. Especialidad de Ingeniería Química, 2007.

Gandhi, N. N., 1997. Applications of Lipase. Jaocs, Journal of the American Oil Chemists' Society; Vol. 74, No. 6, pp 621-634.

Gomes, V. M.; Producción y Purificación de una Lipasa de *Bacillus magisterium* y su Aplicación en Biocatálisis en Solventes Orgánicos. Tesis de Doctorado. Universidad Federal de Parana, Curitiba, 2004.

González, J. M.; Enzimas. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad del País Vasco, 2010.

González, J., Moreno, V., Del Monte, A.; 2010. Las Lipasas: Enzimas con Potencial para el Desarrollo de Biocatalizadores Inmovilizados por Adsorción Interfacial. Revistas Colombiana de Biotecnología. Vol. 12 no. 1.

Guillén, M.; Caracterización, Inmovilización y Aplicación en Biocatálisis de la Lipasa de *Rhizopus oryzae* Expresada en *Pichia pastoris*. Tesis Doctoral. Escuela de Ingeniería. Departamento de Ingeniería Química. Universidad Autónoma de Barcelona, 2012.

Hansan, F, Aamer, A., Hameed, A., 2006. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology* 39:235–251

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

Huerta, S., 2004. Reactores Enzimáticos. Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, 323pp.

Jaeger, K.E., Ransac, S., Dijkstra, B.W., Colson, C., Van Heuvel, M. and Misset, O.; 1994. Bacterial Lipases. *FEMS Microbiol. Rev* 15: 29-63.

Kaushik, R., Saran, S., Isar, J., & Saxena, R. K.; 2006. Statistical optimization of medium components and growth conditions by response surface methodology to enhance lipase production by *Aspergillus carneus*. *Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic*,

Kazlauskas R.; 1994. Elucidating structure mechanism relationship in lipases. Prospects for predicting and engineering catalytic properties. *Trends Biotechnol*; 12: 464–72.

Khoo ML, Ibrahim CO (2003). Development of alkaline lipase for the formulation of detergent. *Nat. Biol. Conference*. 14th–16th December Ipoh, Malaysia.

Kim, B. S. and Hou, C. T., 2006. Production of lipase by high cell density fed-batch culture of *Candida cylindracea*. *Bioprocess and biosystems engineering*. Vol. 29, 59-64

Kiyotani, K., Tasaka, H., Tsukiyama, F., Matsuo, Y. 1983. Lipase activity of guinea pig peritoneal macrophages and mycobacterial lipase inhibitor. *Hiroshima J Med Sci* 32 (3): 267-71.

Lehninger, A.L., Nelson, D., Cox, M. *Principios de Bioquímica* 3ª ed. Ediciones Omega (2001), 1264 p.

Lenis, M.; Estudio Comparativ del Proceso de Obtención de un Aditivo Enzimático Mediante Fermentaciones Microbianas Solida y Sumergida de Afrechillo de Trigo. Universidad de Carabobo. Tesis Maestría: Ingeniería de Procesos, 2011.

Li, N., Zeng, Q. M., Zong, M. H. 2009. Substrate specificity of lipase from *Burkholderia cepacia* in the synthesis of 3-arylaliphatic acid esters of floxuridine. *Journal Biotechnol* 142 (3-4): 267-70.

Li, Y.Q., S. Cui, X.Y. Ruan y D.J. Zhang; 2005. Application of Six Sigma Robust Optimization in Sheet Metal Forming. *American Institute of Physics: A*, 819-824.

Lin, E. S., Wang, C. C., & Sung, S. C. (2006). Cultivating conditions influence lipase production by the edible basidiomycete *Antrodia cinnamomea* in submerged culture. *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 98–102.

Madigan, M. and Martinko, J.; *Biología de los Microorganismos*. Octava Edición. Prentice may, 1998

Mendoza, L.I.; *Aislamiento y Selección de Hongos Lipolíticos a Partir de Aceites Vegetales de Desecho (Provenientes de Frituras) Utilizados en la Elaboración de Biodiesel*. Biólogo con Mención en Microbiología y Parasitología. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 2010.

Menge, U. 1994. Lipase of *Pseudomonas cepacia* for biotechnological purposes: purification, crystallization and characterization. *Biochim Biophys Acta* 1201: 55-60.

Montero, J.M., 2007. *Biotecnología Blanca e Industria Farmacéutica*. An. Real Academia Nacional Farmacéutica 73: 501 – 535.

Montes de Oca, C.; 2009. *Ingeniería Bioquímica*. Clase de Aseguramiento de Calidad. Consultado: 26 de abril de 2013. www.cjcool88.blogspot.mx

Morales, R. A.; *Medios de Cultivo para el Desarrollo de Inóculos de Hongos de Pudrición Blanca Aplicables en Biopulpaje KRAFT*. Facultad de Ciencias Forestales. Universidad de Chile. Memoria: Título de Profesional de Ingeniero en Maderas, 2006.

Ooijkaas L.P., Weber F.J., Buitelaar R.M. Tramper J. y Rinzema A. (2000). Defined media and inert supports: their potential as solid-state fermentation production systems. *Trends in Biotechnology* 18(8): 356-360

Orrego CE; *Estudio de la Influencia del Medio en la Reacción de Transesterificación de Aceites con Etanol Catalizada por Lipasa de *Candida rugosa**. Maestría en Ingeniería Química. Facultad de Ingeniería y Arquitectura. Universidad Nacional de Colombia, 2010.

Pandey A. (2003). Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering J.* 13(2-3): 81-84.

Pandey, A.; Benjamin, S.; Soccol, C.R.; Nigam, P.; Krieger, N., Soccol V.T., 1999. The Realm of Microbial Lipases in Biotechnology. *Biotechnol Appl. Biochem*, Vol. 29, p 119-131.

Peña, J.; Aprovechamiento de Aceites Residuales del Proceso de Fritura como Sustrato para el Desarrollo de Microorganismos Productores de Lipasas. Ingeniero. Facultad de Ingeniería. Universidad de la Sabana, 2006.

Potumarthi, R., Subhakar, C., Vanajakshi, J., Jetty, A.; 2008. Effect of aeration and agitation regimes on lipase production by newly isolated *Rhodotorula mucilaginosa* – MTCC 8737 in stirred tank reactor using molasses as sole production medium. *Appl Biochem Biotechnol* 151: 700-710

Rico, M., Piattoni, C. V., González, C., Monela, R., Latorre, M. G., Laura, M. C.; 2004. Viabilidad de cepas fúngicas conservadas mediante diferentes métodos. *FAB C B*; 8: 163-172

Riviera, C., 2007. Enzimas Lipolíticas y su Aplicación en la Industria del Aceite. *BioTecnología*. Volumen 11, No. 2.

Ruiz, M. D.; 2004. Desarrollo de la Metodología de Taguchi. Facultad de Ciencias. Universidad de Granada. www.ugr.es

Salihu, A. and Alam, Z.;2012. Production and Applications of Microbial Lipases: A Review. *Scientific Research and Essays*. Vol. 7(30), pp. 2667-2677

Sánchez A.; Recuperación, Purificación y Caracterización de Lipasas Producidas por *Candida rugosa*. Aplicación a la Resolución de Compuestos Quirales y Diseño del Reactor Enzimático. Doctorado. Departamento de Ingeniería Química. Universidad Autónoma de Barcelona, 1998.

Sánchez, J. M.; Biocatálisis Aplicada a la Obtención de Fármacos y Productos de Alto Valor Añadido. Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia. 2012; Cap. V, pp. 155-193.

Sánchez, J. M.; 2007. Biotecnología Blanca e Industria Farmacéutica. *An. Real Academia Nacional de Farmacia*. 73: 501-535.

Senna, L.; 2007. Lipase production in Solid-State Fermentation monitoring biomass growth of *Aspergillus niger* using digital image processing. *Appl Biochem Biotechnol* (2008); 147: 63-75

Snellman, E. A., Sullivan, E. R., Colwell, R. R. 2002. Purification and properties of the extracellular lipase, LipA, of *Acinetobacter* sp. RAG-1. *Eur J Biochem* 269: 5771-9.

Sokolovska et al. (1998) I, Albasi C, Riba J, Bales V (1998). Production of extracellular lipase by *Candida cylindracea* CBS 6330. *Bioprocess Eng.* 19:179-186.

Tarazona, L. C.; Evaluación de la Enantioselectividad de Derivados Modificados de Lipasas de *Candida rugosa* y *Alcaligenes* sp. en la Resolución Cinética de (R/S)-Mandelato de Metilo. Tesis de Grado: Químico. Facultad de Ciencias. Universidad Industrial de Santander, 2011.

Treichel, H., De Oliveira, D., Mazutti, M. A., Di Luccio, M., Oliveira, J. V.; 2009. A review on microbial lipases production. *Food Bioprocess Technol* 3: 182-196.

Verger, R., Riviere, C., Moreau, H., Gargouri, Y., Rogalska, E., Nury, S., Moulin, A., Ferrato, F., Ransac, S., Carriere, F., Cudrey, M. and Tretout, T.; 1990. Enzyme Kinetics of Lypolysis. In "Lipases: Structure, Mechanism and Genetic Engineering". *Gbf Monographs*, 16: 105-116.

Zhao, W., Wang, J., Deng, R., & Wang, X. (2008). Scale-up fermentation of recombinant *Candida rugosa* lipase expressed in *Pichia pastoris* using the GAP promoter. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 35, 189–195.

CAPITULO 7

ANEXOS.

ANEXO "A"

CONSERVACION DE *A. niger*. LARGO Y CORTO PLAZO.

Largo plazo.



Corto plazo.



ANEXO "B"

RECONOCIMIENTO DEL EQUIPO.



Fermentador/reactor New BrunswickScientific BIOFLO 115.



Verificación de ensamblado



Verificación de conexiones



Revisión de entradas y salidas

Control Name	SP	Setpoint	Out%	Mode	Units	Ctrl
Agit	50	50	14.8	Auto	RPM	None
Temp	23.7	35.0	0.0	Off	DegC	None
pH	7.03	7.00	0.0	Off	pH	None
DO	100.2	0.0	-100.0	Off	%DO	None

Reconocimiento del funcionamiento



Verificación del funcionamiento

ANEXO “C”

Técnica Gassing Out.

Metodología

Este procedimiento sirve para la estimación de K_{LA} que consiste en la eliminación del O_2 utilizando un gas inerte, una vez que la concentración de oxígeno (C_L) disuelto es igual a cero, se inicia la aireación de nuevo y se toman lecturas a distintos tiempos utilizando la siguiente ecuación:

$$\ln \left[1 - \frac{C(t)}{C_g^*} \right] = k_L a$$

Donde:

C_g^* = la concentración de saturación de oxígeno en el tiempo t

C = es la concentración de oxígeno disuelto en el seno del líquido

$k_L a$ = se refiere al coeficiente de transferencia de oxígeno

t = tiempo

La ecuación que describe la velocidad de transferencia de oxígeno es:

$$\frac{dC_{O_2}}{dt} = k_L a (C_{O_2}^* - C_{O_2})$$

Esta se integra y se expresa en su forma lineal para encontrar el $k_L a$ mediante regresión lineal por mínimos cuadrados.