



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.
Posgrado en Ciencias Biológicas

**BIOPROSPECCIÓN DE LIPASAS
EXTRACELULARES EN HONGOS OBTENIDOS DE
RESIDUOS AGROINDUSTRIALES**

Tesis que presenta
MIGUEL ANGEL CANSECO PÉREZ

En opción al título de
MAESTRO EN CIENCIAS
(Ciencias Biológicas: Opción Biotecnología)

MÉRIDA, YUCATÁN, MEXICO
ABRIL, 2013





NOMBRE COMPLETO DEL ESTUDIANTE CENTRO DE INVESTIGACION CIENTIFICA DE YUCATAN S.C.

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.
Programa en Ciencias Biológicas

RESIDUOS AGROINDUSTRIALES
EXTRACELULARES EN HONGOS OBTENIDOS DE
BIOPROSECCION DE LIPASAS

MIGUEL ANGEL CANSECO PEREZ
Tesis que presenta

(Ciencias Biológicas: Opción Biotecnología)
MAESTRO EN CIENCIAS
En opción al título de

MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO
ABRIL, 2013



CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO



Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado: Bioprospección de lipasas extracelulares en hongos obtenidos de residuos agroindustriales fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección de la Dra. Blondy Beatriz Canto Canché, dentro de la Opción de Biotecnología perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente,

Dr. Felipe A. Vázquez Flota
Coordinador de Docencia

Centro de Investigación Científica de Yucatán, AC.
Mérida, Yucatán, México a 19 de Abril 2013

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma: _____



Miguel Angel Canseco Pérez

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán, por todas las instalaciones prestadas para llevar a cabo el presente trabajo de tesis.

A Conacyt por la beca otorgada no 375001.

A mi asesora Dra. Blondy Canto Canché por todo su apoyo técnico y sus consejos tanto académicos como personales.

A mis sinodales: Dra. María Marcela Gamboa, Dr. Ignacio Islas Flores, Dr. Felipe Barahona y M. C. Gerardo Rivera, por todos los consejos dados durante el desarrollo de este trabajo.

Al M. C. Miguel Alonso Tzec Sima por todo su apoyo técnico en el laboratorio, por su gran paciencia y enseñanzas durante mi estancia en el equipo de trabajo.

A la Dra. Xenia Mena Espino por su instrucción en las metodologías del cultivo y reactivación de cepas fúngicas, así también por su gran amistad.

Dedicatorias

A mis Padres por enseñarme que el camino más importante en la vida es el conocimiento. A mi Padre por enseñarme a no dejarme vencer por los obstáculos que existen en el camino, siempre te extrañare. A mi Madre por apoyarme en todas mis decisiones y estar a mi lado cuando más la necesito.

A mis Tías Yoli, Paty, Coco, mis primos Argelia, Antonio y mi Hermano José Antonio por preocuparse siempre por mi bienestar y por todo el cariño otorgado.

A todos mis amigos del laboratorio de Biología Molecular de Plátano: Abril, Nuvia, Xenia (Mama She), Erika, Lalo, Muhi, Frank, Mike, Yamily, Roberto e Inés. Por todos los momentos de diversión y compañerismo que pasamos juntos, por hacer sentir al laboratorio como una gran familia.

A mis amigos del cicy: Anahy, Mayra, Nancy, Gloria, Denise, Paco, Fer y Lilia, por todas las anécdotas vividas, por los viajes y por hacerme sentir como en casa.

Al Dr. Germán Carnevali y la Dra. Ivón Ramírez, por la amistad brindada, por compartir ese amor a la naturaleza y todos los consejos otorgados. Infinitas gracias.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	5
CAPÍTULO I: LIPASAS	7
I. Antecedentes	7
II. Hipótesis	21
III. Objetivos	21
IV. Estrategia Experimental	22
V. Referencias	23
CAPÍTULO II: ESCRUTINIO DE LA ACTIVIDAD DE LIPASAS	29
I. Introducción	29
II. Materiales y métodos	32
III. Resultados	33
IV. Discusión	38
V. Referencias	41
CAPÍTULO III: CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD LIPOLÍTICA	43
I. Introducción	43
II. Materiales y métodos	45
III. Resultados	46
IV. Discusión	49
V. Referencias	55
CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN, CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS.	61
I. Discusión y conclusiones generales	61
II. Perspectivas	65
III. Referencias	66

LISTADO DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
U/mL	Unidades/mililitro
Gly	Glicina
Ser	Serina
kDa	KiloDaltons
mL	Mililitros
°C	Grados Celsius
pH	Potencial de Hidrógeno
nm	Nanómetros
cm	Centímetros
cm ²	Centímetros cuadrados
rpm	Revoluciones por minuto.
g	Gramos
μL	Microlitros
μM	Micromolar
G	Gravedades
h	Hora
v/v	Volumen/volumen

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. 1: Reacciones mediadas por lipasas.....	8
Figura 1. 2: Estructura alfa/beta-hidrolasa	17
Figura 1. 3: Modelo estructural de una lipasa	20
Figura 2. 1: Estructura química del tween 80	29
Figura 2. 2: Estructura química del tributirín.....	30
Figura 2. 3: Estructura química del Trioleína.....	30
Figura 2. 4: Variabilidad del desarrollo y fluorescencia en medio rodamina B-aceite de olivo	33
Figura 2. 5: Análisis de imágenes usando el programa Assess 2.0.....	34
Figura 2. 6: Cuantificación del área fluorescente en la cepa <i>Mucor sp</i>	36
Figura 2. 7: Cepas fúngicas seleccionadas en el presente trabajo.....	37
Figura 2. 8: Comparación de dos cepas que producen lipasas	38
Figura 2. 9: Comparación de resultado del presente trabajo y los reportados en la literatura.....	39
Figura 3. 1: Cuantificación de la actividad de lipasas	46
Figura 3. 2: Cuantificación de la actividad de proteasas	47
Figura 3. 3: Cuantificación de proteína total.....	48

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.1: Principales microorganismos descritos en la literatura con potencial para la producción de lipasas	10
Cuadro 1.2: Comparación entre la catálisis enzimática y la catálisis alcalina en la producción de biodiesel	16
Cuadro 1.3: Topología de los sitios de unión de las lipasas	18
Cuadro 2.1: Diferencias entre lipasas y carboxilesterasas	30
Cuadro 2.2: Clasificación de las cepas pertenecientes a la colección de desechos agroindustriales de plátano	34
Cuadro 2.3: Clasificación de cepas fúngicas aisladas de frutas oleaginosas	35
Cuadro 3.1: Métodos analíticos para la determinación de lipasas.....	44
Cuadro 3.2: Cepas fúngicas con actividad lipolítica en fermentación sumergida.....	50
Cuadro 3.3: Actividad específica de lipasa extracelular fúngica.	53

RESUMEN

Las lipasas o triacilglicerol hidrolasas, son un grupo de enzimas con un gran potencial biotecnológico en las industrias de los alimentos, detergentes, farmacéutica y actualmente en la producción de biodiesel. Las lipasas se encuentran dispersas en todas las formas de vida y presentan una gran variabilidad en sus secuencias, tamaños, sustratos, activadores, inhibidores así como en sus especificidades. La bioprospección de estas enzimas podría permitir la identificación de organismos productores, con características viables para su aplicación industrial.

En el presente trabajo se realizó un escrutinio de la actividad de lipasas en dos colecciones de hongos: la primera de 21 cepas aisladas de residuos agroindustriales de plátano y la segunda con siete cepas proveniente de frutos oleaginosos. En ambas colecciones se obtuvieron cepas con un alto perfil de actividad lipolítica mediante su análisis en placa y la cuantificación de halos fluorescentes por medio del programa Asses 2.0.

De las 28 cepas que se analizaron, cinco de ellas se seleccionaron para la cuantificación de la actividad de lipasas producidas por fermentación sumergida, debido a su alto perfil enzimático en placa. Dos cepas pertenecen a los aislados de materiales lignocelulósicos: B13-1 (actividad lipolítica de 205 U/mL), B13-3 (109 U/mL) y tres a la de frutos oleaginosos, siendo las cepas Ab02 y Cnc las de mayor actividad lipolítica (215 U/mL) y la cepa Se02 (21 U/mL), además a dichas cepas se les determinó la actividad de proteasa en las muestras y la actividad específica de dicha enzima

Los resultados obtenidos en las cepas Ab02, Cnc y B13-1, colocan a estos aislados como prospectos para posteriores estudios de optimización y caracterización de la producción de la enzima y su posible aplicación en el desarrollo de procesos industriales.

ABSTRACT

Lipases or triacylglycerol hydrolases, are a group of enzymes with potential biotechnological industries in food, detergents, pharmaceuticals and currently in production of biodiesel. Lipases are scattered in all forms of life and are highly variable in their sequences, sizes, substrates, activators, inhibitors and its specificities. Bioprospecting of these enzymes could allow producers to identify organisms with characteristics viable for industrial application.

In the present work, a scrutiny of the lipase activity of fungi in two collections: the first of 21 strains isolated from banana agro waste and the second with seven strains from oil fruits. Both strains were obtained collections with a high lipolytic activity profile by analyzing plate and quantifying by means of fluorescent halos Asses 2.0 program.

From the 28 strains that were tested, five were selected for the quantification of the activity lipases produced by submerged fermentation, due to its high enzymatic profile plate. Two isolated strains belong to the lignocellulosic material: B13-1 (lipolytic activity of 205 U/mL), B13-3 (109 U/mL) and three to the oleaginous fruits, Ab02 and Cnc strains being the most active lipolytic (215 U/mL) and strain Se02 (21 U/mL), in addition to those strains were determined of protease activity in the samples and the specific activity of the enzyme

The results obtained in strains Ab02, Cnc and B13-1, put these isolated as prospects for future characterization studies and optimization of the production of the enzyme and its possible application in the development of industrial processes.

INTRODUCCIÓN

Las enzimas han sido conocidas y explotadas desde tiempos antiguos. Actualmente se les da una gran variedad de usos; a nivel industrial se utilizan en el procesamiento de alimentos, lácteos, farmacéutica, detergente, textiles, pulpa para la producción de papel, alimentación animal, pieles y cosméticos.

El mercado global de las enzimas en el 2008 fue de \$4.7 billones de dólares y se estima un crecimiento anual de entre el 6.5 y el 10% (Casas-Godoy *et al.*, 2012), sin considerar las enzimas aplicadas en la industria farmacéutica. Mientras que las enzimas están presente en todos los organismos y en diferentes formas, solo alrededor del 25 de ellas han sido explotadas de manera industrial, algunas son: amilasas, proteasas, lipasas, celulasas, glucoamilasas, glucosa isomerasa, quimosina, lactasa, pululanasas, xilanasas, entre otras (CBDMT®, 2008).

Después de las proteasas y las amilasas, las lipasas ocupan el tercer lugar del volumen de ventas que equivale aproximadamente a el billón de dólares; la versatilidad en sus aplicaciones las hacen especialmente atractivas para la aplicación industrial (Ulker *et al.*, 2011)

El enorme potencial de las lipasas surge del hecho de que son capaces de presentar una conformación estable y activa en disolventes orgánicos, no requieren cofactores, exhiben un alto grado de enantio y regioselectividad (Sheikh *et al.*, 2003). Debido a ello, las lipasas son un grupo de enzimas de gran interés científico e industrial que desempeñan una amplia gama de funciones tanto en la industria de los alimentos, detergentes, sector farmacéutico y más recientemente en la producción de biocombustibles como el biodiesel. Por lo tanto es necesario identificar más organismos productores de lipasas, con características que permitan mejorar los bioprocesos, fácil obtención para lograr la disminución del precio de la enzima y poder aplicarlas en procesos más amigables con el ambiente que los actualmente empleados.

CAPÍTULO I: LIPASAS

I. Antecedentes

Las lipasas (triacilglicerol éster hidrolasas EC 3.1.1.1) son un grupo de enzimas serina-hidrolasas que actúan sobre los enlaces éster carboxílicos. Estas enzimas son requeridas no solo para la transferencia de lípidos de un organismo a otro, sino también en la disposición y movilización de los lípidos dentro de la célula y en la función biológicas de la membrana (Villeneuve *et al.*, 2000). A pesar de que son producidas virtualmente por todos los organismos, las lipasas presentan muchas diferencias en tamaño, secuencias, sustrato, activadores, inhibidores y otras propiedades.

Las lipasas catalizan naturalmente la hidrólisis de enlaces éster de tri-, di- y mono glicéridos en ácidos grasos y glicerol, llevándose a cabo en sistemas bifásicos que resultan de la presencia de una fase orgánica inmisible (Casas-Godoy *et al.*, 2012).

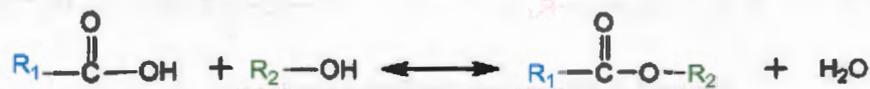
En condiciones termodinámicamente favorables las lipasas también pueden llevar a cabo reacciones de síntesis como son esterificación, en la cual la enzima produce ésteres solubles, y de transesterificación, en la cual el donador del grupo acilo es un éster. La transesterificación puede ser de tres tipos: glicerólisis, alcoholólisis y aminólisis, según sea el receptor un glicerol, un alcohol o una amina (Treichel *et al.*, 2009; Alarcon, 2008; Bancercz y Ginalska, 2007). La figura 1.3. presenta un resumen de las reacciones que pueden realizar las lipasas.

❖ Hidrólisis

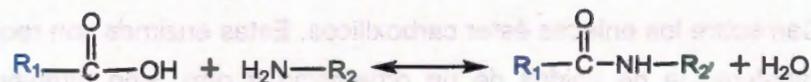


❖ Síntesis

a) Esterificación



b) Amidación

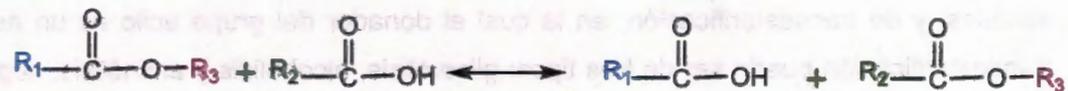


c) Tio-esterificación



• Transesterificación

a) Acidólisis



b) Aminólisis



c) Alcohólisis



d) Interesterificación



Figura 1.1. Reacciones mediadas por lipasas.

Las lipasas muestran diversos grados de especificidad, la cual es usualmente determinada mediante la hidrólisis parcial de triglicéridos sintéticos y la separación y análisis de los productos (Hou, 2005). Basándose en la especificidad del sustrato las lipasas microbianas pueden dividirse en tres grupos:

1) lipasas no específicas, las cuales actúan al azar sobre la molécula del triglicérido y dan como resultado la completa separación del glicerol y los ácidos grasos (Gupta, 2004); ejemplo de estas lipasas son las obtenidas de *Candida cylindraceae*, *Corynebacterium acnes* y *Staphylococcus aureus* (Hou, 2005).

2) lipasas regio específicas, las cuales solo pueden hidrolizar el enlace éster de la posición 1 o 3 en el triglicérido. La estereoespecificidad es determinada por la fuente de la lipasa, por el grupo acilo y también depende de la densidad de los lípidos en la interfase. A medida que incrementa la concentración del sustrato la especificidad puede disminuir debido al impedimento estérico, esto ocurre por ejemplo con las lipasas de *Aspergillus niger*, *Mucor miehei*, *Rhizopus arrhizus* y *Rhizopus delemar* (Kuo y Gardner, 2002). Asahara y colaboradores (1993) reportaron en *Geotrichum* spp. la presencia de una lipasa con afinidad hacia la posición 2 de la cadena de los triglicéridos, pero hasta el momento es el único reporte que describe este tipo de lipasa.

3) Lipasas que liberan solo un tipo particular de ácido graso en alguna posición de la molécula del triglicérido. En las reacciones de esterificación las lipasas muestran una alta selectividad hacia los ácidos grasos de cadena larga y media, en comparación con los de cadena corta (Bhavdish *et al.*, 1985) y se inhiben con ácidos o alcoholes como el ácido acético, etanol y geraniol debido a la acidificación de la interfase microacuosa (Dörmó *et al.*, 2004).

Las lipasas están ampliamente distribuidas en la naturaleza, siendo sintetizadas por plantas, animales y microorganismos. Las lipasas de los microorganismos, principalmente bacterias y hongos, son las más usadas como biocatalizadores en aplicaciones biotecnológicas y bioquímicas. Las lipasas fúngicas provenientes de *Candida rugose*, *Candida antártica*, *Thermomyces lanuginosus* y *Rhizomucor miehei*, y lipasas bacterianas provenientes de *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Pseudomonas mendocina* y *Chromobacterium viscosum* son ejemplos de lipasas de uso

comercial (Jaeger y Reetz, 1998). El peso molecular de las lipasas varía de menos de 20 kDa, como por ejemplo la lipasa de *Bacillus subtilis*, a 60kDa como la de *Geothricum candidum*. Hiol y colaboradores (2000) describieron una lipasa extracelular de *Rhizopus oryzae*, con un peso molecular de 30kDa, y una baja cantidad de carbohidratos asociados a ella, estos últimos cuantificados a través de un tratamiento con endoglucosidasa H. Por otra parte Abbas (2002) caracterizó la lipasa de una cepa de *Mucor* sp. con tamaño de 42 kDa y aproximadamente 5% de su peso en carbohidratos. Jolivet y colaboradores (2007) estudiando a la lipasa codificada por el gen lip2p de *Yarrowia lipolytica* describieron una proteína de 36.2 kDa, con dos posibles sitios de glucosilación en el sitio N113IS y en N134NT. La glucosilación contribuye a la estabilidad de la enzima (Isobe y Nokihara, 1993).

Treichel y colaboradores (2009) han hecho un resumen de los principales microorganismos estudiados en los últimos cinco años para la producción de lipasas (Cuadro 1.2). Dichos autores clasifican los estudios basados en dos tipos de fermentación, la de fase sólida, comúnmente usada para el cultivo de especies de hongos, y la fermentación en fase sumergida más frecuente en bacterias y levaduras. La fermentación en fase sólida es una interesante alternativa para la producción de enzimas, ya que favorece al uso de residuos y subproductos de la agroindustria como fuente de nutrientes y soporte para el desarrollo de los organismos. El uso de estos subproductos como sustratos en la producción de lipasas puede reducir el costo final de las enzimas (Griebeler *et al.*, 2009). Los hongos son un grupo de gran interés para la generación de enzimas lipolíticas debido a su alta capacidad para la secreción de enzimas extracelulares, lo cual facilita su recuperación en el medio (Bancerz y Ginalska, 2007). Además las enzimas fúngicas presentan alta estabilidad térmica y de pH (Saxena *et al.*, 1999; Ghosh *et al.*, 1996).

Cuadro 1.1. Principales microorganismos descritos en la literatura con potencial para la producción de lipasas (Treichel *et al.*, 2009).

Especie	Clase de organismo	Referencia	
		Fermentación sumergida	Fermentación en estado sólido
<i>Acinetobacter radioresistens</i>	Bacteria	+	

<i>Pseudomonas</i> sp.	Bacteria	+	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bacteria	+	+
<i>Staphylococcus caseolyticus</i>	Bacteria	+	
"Biopetro-4"	Bacteria	+	
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Bacteria	+	
<i>Burkholderia cepacia</i>	Bacteria		+
<i>Burkholderia multivorans</i>	Bacteria	+	
<i>Serratia rubidaea</i>	Bacteria	+	
<i>Bacillus</i> sp.	Bacteria	+	
<i>Bacillus coagulans</i>	Bacteria		+
<i>Bacillus subtilis</i>	Bacteria	+	
<i>Aspergillus</i> sp.	Hongos filamentosos		+
<i>Aspergillus carneus</i>	Hongos filamentosos	+	
<i>Aspergillus niger</i>	Hongos filamentosos		+
<i>Colletotichum gloesporioides</i>	Hongos filamentosos	+	
<i>Geotrichum candidum</i>	Hongos filamentosos	+	
<i>Geotrichum</i> sp.	Hongos filamentosos	+	
<i>Penicillium citricum</i>	Hongos filamentosos	+	
<i>Penicillium restrictum</i>	Hongos filamentosos	+	+
<i>Penicillium simplicissimum</i>	Hongos filamentosos		+
<i>Penicillium verrucosum</i>	Hongos filamentosos	+	+
<i>Rhizopus chinensis</i>	Hongos filamentosos	+	+
<i>Rhizopus homothallicus</i>	Hongos filamentosos	+	+
<i>Rhizopus oryzae</i>	Hongos filamentosos	+	
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Levadura	+	
<i>Candida utilis</i>	Levadura	+	
<i>Candida cylindracea</i>	Levadura	+	
<i>Candida rugosa</i>	Levadura	+	+
<i>Candida</i> sp.	Levadura	+	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Levadura	+	
<i>Trichosporon asahii</i>	Levadura	+	
<i>Williopsis californica</i>	Levadura	+	
<i>Yarrowia lipoytica</i>	Levadura	+	+

Los hongos productores de lipasas se encuentran en ambientes muy diversos. Colen y colaboradores (2006) lograron aislar 19 cepas de hongos productores de lipasas a partir de muestras de suelo de la sabana Brasileña; en esa colección una cepa de *Colletotrichum gloeosporioides* presentó la mayor producción de lipasas, alcanzando 27.7 U/mL de actividad bajo condiciones óptimas de cultivo. En otro trabajo Cihangir y Srikaya (2004) obtuvieron aislados de *Aspergillus* sp. de muestras de suelo de diferentes regiones de Turquía; la cepa más lipolítica produjo 17 U/mL de actividad de lipasa. Teng y Xu (2008) reportan una actividad lipolítica de 14 U/mL para una cepa de *Rhizopus chinensis*. Por otra parte Prakash y colaboradores (2008) aislaron especies de basidiomicetes de árboles de diferentes localidades del sudeste de la India, de los cuales 17 presentaron actividad lipolítica, destacando *Abortiporus biennis*, *Pycnoporus coccinus* y *Trametes pubescens*. En otro estudio Gopinath y colaboradores (2005) aislaron hongos de desechos agroindustriales de fábricas de aceites comestibles, donde *Absidia corymbifera*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus terreus*, *Cunninghamella verticillata*, *Curvularia pallescens*, *Fusarium oxysporum*, *Geotrichum candidum*, *Mucor racemosus*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium frequentans*, *Rhizopus stolonifer* y *Trichoderma viridae* presentaron alta actividad lipolítica. Triches y colaboradores (2008) se enfocaron a la búsqueda de lipasas en una colección de hongos previamente establecida, la cual pertenecía a la empresa Embrapa Food Technology. En esa colección la cepa mutante de *Aspergillus niger* 11T53A14 presentó la mayor actividad lipolítica (62.7 U/gds) en fermentación sólida. En un reporte más reciente Rajesh y colaboradores (2010) trabajaron con una cepa de *Trichoderma reesei*, estudiada previamente para la producción de celulasas; estos autores encontraron que esta cepa también presentaba actividad de lipasas.

En estos reportes se observó que la producción de lipasas varía de acuerdo al hongo, a la composición del medio de crecimiento, las condiciones de cultivo, pH, temperatura y el tipo de fuente de carbono y nitrógeno (Treichel *et al.*, 2009).

Un factor que gobierna la actividad catalítica y la estabilidad operacional de las lipasas es su estabilidad térmica, esta es ampliamente variable entre lipasas de diferentes cepas. Bancercz y Ginalska (2007) realizaron experimentos en rangos de 0° a 90°C para determinar la termoestabilidad de una lipasa aislada del basidiomiceto *Bjerkandera adusta*; los resultados mostraron un amplio rango de tolerancia desde temperaturas bajas (0°C) en la cual se conserva la actividad catalítica, a temperaturas medias (60°C), donde

la actividad se empieza a perder. Ginalska y colaboradores (2004) reportan la lipasa de una cepa de *Geotrichum* spp. la cual retiene su actividad catalítica hasta el 50% cuando fue calentada a 70°C durante 45 min, similar a esto las lipasas de *Talaromyces thermophilus* presentaron una pérdida de la actividad enzimática a 90% cuando se incubó la enzima a 55°C, mientras que se observó una disminución drástica hasta el 40% cuando la enzima se incubó a 70°C (Mohamed *et al.*, 2011). La inhibición de la actividad enzimática por acción de la temperatura se va dando de forma gradual; en experimentos en donde se sometieron extractos crudos de lipasas de *Mucor pusillus* a temperaturas de 55 y 58°C durante 10, 24 y 45 min. Estas mostraron una pérdida de la actividad enzimática del 10, 27 y 50% a los 58°C con respecto a la actividad presentada a los 55°C (Somkuti y Babel, 1968).

En cuanto a la temperatura óptima para la actividad de lipasas, Bhavdish y colaboradores (1985) reportaron varios hongos termofílicos productores de lipasas en los que incluyeron a *Humicola lanuginosa* con una temperatura óptima para la actividad lipolítica a 60°C y pH 8, *Mucor pusillus* y *Talaromyces thermophilus* con picos de actividades en los 45°C, mientras que *Thermoascus crustaceus* y *Humicola grisea* var. *Thermoidea* presentan actividad óptima en los 50°C.

Otro factor que controla la actividad enzimática es el pH. Bhavdish y colaboradores (1985) reportó diferentes pH óptimos para las lipasas de *Rhizopus microsporus*, dependiendo del sustrato utilizado. En el caso del aceite de olivo y de la trioleína se presentaron rangos de pH de 4.2-4.8 y 7.6-8.0 respectivamente. Bancercz y Ginalska (2007) reportaron un pH óptimo de 7.0 para las lipasas aisladas de *Bjerkandera adusta* usando aceite de olivo como sustrato. Margensin y colaboradores (2002) reportaron una actividad enzimática máxima en pH de 7-9 para lipasas aisladas en microorganismos obtenidos en dos diferentes muestras de suelos de Australia. Como puede observarse el pH óptimo varía. Cada enzima tiene un pH catalítico óptimo y está dado por las cadenas laterales de aminoácidos que la conforman, pudiendo éstos actuar como ácidos o bases débiles que desarrollan funciones críticas en el sitio activo de la enzima (Alarcón, 2008).

La habilidad de las lipasas para llevar a cabo transformaciones químicas altamente específicas ha aumentado su utilización en aplicaciones industriales (Hala *et al.*, 2010; Rajesh *et al.*, 2010; Aravindan *et al.*, 2007; Sharman *et al.*, 2001). Siendo las principales industrias en las cuales las lipasas son empleadas:

La industria alimentaria: En el procesamiento de alimentos las lipasas se utilizan para la modificación y descomposición de biomateriales. Un gran número de lipasas son utilizadas para mejorar el sabor en los productos lácteos, así como en el procesamiento de carnes, vegetales, frutas, alimentos horneados y cervezas (Singh y Mukhopdhyay, 2011).

Fórmula para infantes: El desarrollo de fórmulas lácteas para infantes, con tendencia a imitar lo más posible a la leche materna. El principal triglicérido presente en la leche humana se encuentra insaturado en la posición *sn*-1 y 3, y saturado en la posición *sn*-2. El ácido palmítico representa 20-40% del total de ácidos grasos, con un tercio localizado en la posición *sn*-2. La posición del ácido palmítico en el glicerol es importante; durante la digestión la lipasa pancreática en los infantes hidroliza específicamente en las posiciones *sn*-1 y 3, produciendo un monoglicerol con el ácido palmítico en la posición *sn*-2 y que se absorbe mejor que el ácido palmítico libre (Houde *et al.*, 2004). Lodders Croklaan produce Betapol, un producto sustituto de las grasas de la leche humana; este sustituto es producido mediante el uso de una lipasa específica de las posiciones 1 y 3 (Xu, 2000), que al tratar la tripalmitina con ácidos grasos insaturados resulta en el triglicérido deseado para la fórmula láctea.

Mantequilla de cacao: Es una mezcla de aceites y grasas basados en triglicéridos que poseen como mayores componentes ácido palmítico, ácido esteárico y ácido oleico. La Mantequilla de cacao es una grasa con un alto valor comercial usado por la industria de la confitería, principalmente del chocolate (Houde *et al.*, 2004; Xu, 2000). En 1976, Unilever generó una patente donde describen la metodología para la reacción de hidrólisis y síntesis para la producción de un sustituto de mantequilla de cacao, usando una lipasa de *R. miehei*, la cual lleva a cabo una transesterificación, remplazando el ácido palmítico con esteárico para dar el triglicérido (Aravindan *et al.*, 2007).

Industria de los detergentes: actualmente el uso de las lipasas en la industria de los detergentes representa una de las aplicaciones más significativas de estas enzimas. Las lipasas pueden reducir el daño ambiental generado por los detergentes y disminuir el consumo energético en el lavado al funcionar a temperaturas ambientales. En 1994, Novo Nordisk introdujo la primera lipasa comercial, Lipolase, la cual era originada por el hongo

Thermomyces lanuginosus y que ha sido clonada en *Aspergillus oryzae* (Singh y Mukhopdhyay, 2011). La función de las lipasas usadas en los detergentes es remover las manchas de grasas, incluyendo grasas fritas, aceites, mantequillas, sopas, sebos, lápiz labial, entre otros.

Industria Farmacéutica: La habilidad de las lipasas para resolver mezclas racemicas para la síntesis de un solo enantiómero es usada para la producción de fármacos. La lipasa inmovilizada de *P. cepacia* es usada en disolventes orgánicos para la acilación selectiva de un alcohol, intermediario clave en la síntesis del Taxol, fármaco usado en el tratamiento contra el cáncer de ovario (Houde, 2004). Las lipasas también son usadas para la síntesis de lactol, un intermediario clave para la síntesis de un agente cardiovascular usado en el tratamiento de la trombosis (Hou, 2005).

Desgrasado de pieles: En la industria de la peletería el procesamiento para la remoción de proteínas y lípidos asociados al cuero y los pelos es uno de los pasos más relevantes en la producción de pieles de calidad (Gandhi, 1997). En este sentido las lipasas representan un método ecológico idóneo para la remoción de las grasas. Para cueros bovinos, las lipasas permiten reemplazar completamente los tenso activos, mientras que para las pieles de oveja, las cuales contienen arriba del 40% de grasa, el uso de disolventes es muy común y estos pueden también ser reemplazado con la aplicación de lipasas y surfactantes (Hasan *et al.*, 2005).

Agroquímicos: Las lipasas también son usadas en la producción de compuestos enantioméricamente puros, i.e. (S)-indanofan un novedoso herbicida usado en contra de gramíneas en arrozales, es sintetizado mediante una combinación de resoluciones enzimáticas catalizadas por lipasas y técnicas de inversión químicas (Jaeger y Eggert, 2002).

Biocombustibles: El biodiesel es un combustible renovable y biodegradable, el cual es derivado de aceites vegetales, grasas animales o aceites de origen microbiano a través de microemulsificación, pirólisis o transesterificación. La transesterificación, también llamada alcoholisis, es la reacción más usada para la producción de biodiesel; en ella los triglicéridos contenidos en las grasas o aceites reaccionan con alcohol en presencia de un

catalizador que puede ser hidróxido de sodio, de potasio o metóxido de sodio. El uso de estos catalizadores puede ser sustituido por la aplicación de las lipasas para llevar a cabo la reacción química.

En comparación con la transesterificación química, la enzimática se realiza en condiciones más amigables (20-50°C) y tienen rangos de rendimientos de hasta 97%; los subsecuentes pasos de separación y purificación del biodiesel son más fáciles que en la catálisis alcalina y se facilita la recuperación de los subproductos (Calabró *et al.*, 2010; Shimada *et al.*, 1999; Nelson *et al.*, 1996). La desventaja de la transesterificación enzimática es que su costo es elevado, pero esto podría reducirse si el proceso de producción de las enzimas se realizara a gran escala. El Cuadro 1.3 presenta un resumen de la comparación de la producción de biodiesel enzimático y la catálisis alcalina, también conocida como catálisis química.

Cuadro 1.2. Comparación de diferentes parámetros durante la catálisis enzimática y la catálisis alcalina en la producción de biodiesel (Robles-Medina *et al.*, 2009; Shah *et al.*, 2003).

Condiciones	Catálisis alcalina (química)	Biocatálisis
Temperatura de reacción	60-70°C	30-40°C
Presencia de ácidos grasos libres en la materia prima	Produce saponificación	Son transformados en biodiesel
Presencia de agua en el aceite inicial	Impacta en la catálisis por la formación de jabón	No perjudica
Impacto ambiental	Medio. Se generan efluentes alcalinos y salinos	Bajo, no necesita tratamiento de aguas residuales
Recuperación del glicerol	Difícil	Alta
Purificación de los ésteres de metilo	Lavados repetidos	No requiere
Costos de producción de la catálisis	Barato	Relativamente caro

La amplia gama de características presentes en las lipasas radica en su variabilidad a nivel molecular y bioquímico, para el 2005 se habían reportado alrededor de 2000 secuencias no redundantes, las cuales han sido agrupadas en 16 superfamilias y 39

subfamilias homólogas. (Pleiss, 2009). La similitud entre las secuencias se limita a regiones cortas localizadas cerca del sitio activo y un núcleo estructural conocido como α/β plegado (fig. 1.1) (Belhaj-Ben *et al.*, 2012, Villeneuve *et al.*, 2000). Esta conformación consiste en estructuras β -plegadas empaquetadas entre dos capas anfífilas α hélice (Pleiss *et al.*, 1998). Se han encontrado variaciones dentro de esta estructura, que básicamente consisten en diferencias en la cantidad de α -hélices, láminas β , tamaño de los bucles y la arquitectura en el sitio de unión del sustrato que conforman a la enzima.

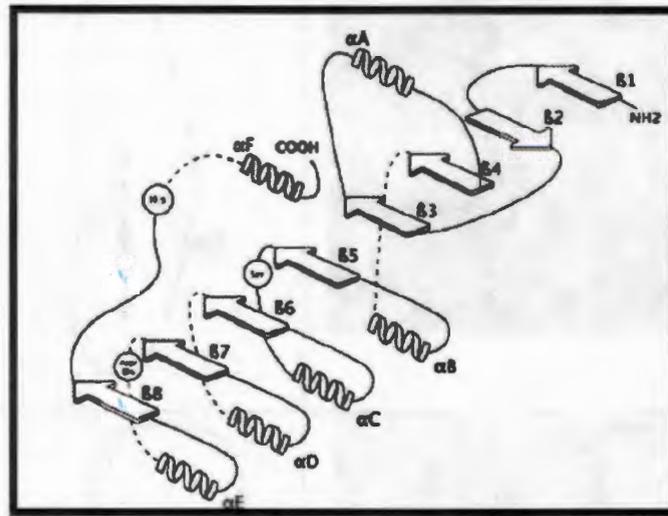
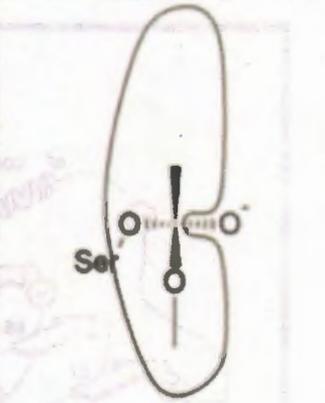
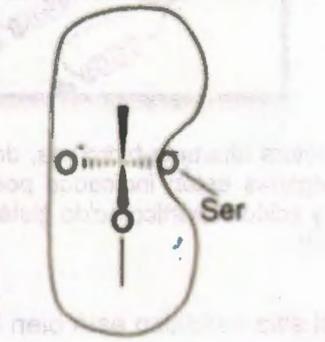


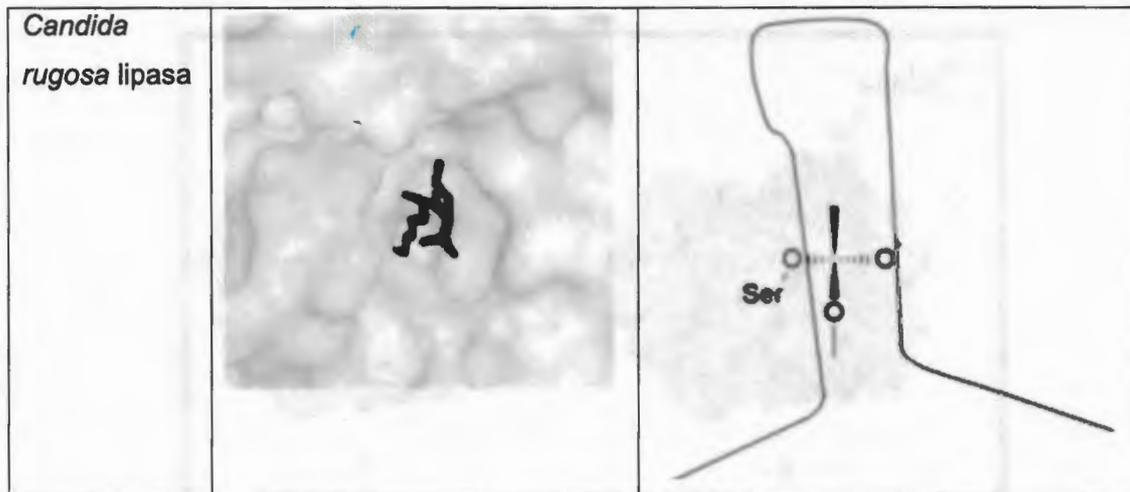
Figura 1.2. Estructura alfa/beta-hidrolasa, donde las α hélices están representadas por espirales, las láminas β -plegadas están indicados por flechas y en círculos se muestran los residuos de Histidina, Serina y ácido aspártico/ácido glutámico importante para la catálisis de la enzima (Casas-Godoy *et al.*, 2012).

Por otra parte el sitio catalítico está bien conservado y formado por tres aminoácidos: Ser-His-Asp (Sandana y Takeuchi, 2008; Saxena *et al.*, 2003; Bornscheuer, 2002; Jaeger y Reetz, 1998), usualmente el residuo de serina aparece embebido en un pentapéptido conservado (Gly-X-Ser-X-Gly) constituido por dos residuos de glicina conservados y dos aminoácidos cualquiera, formando una estructura característica denominado arco nucleofílico (Fickers *et al.*, 2011). Solo en algunos casos como es la lipasa de *Geotrichum candidum* el residuo de ácido aspártico (Asp) en la triada catalítica está sustituida por un residuo de ácido glutámico (Glu), lo cual genera cierta especificidad de hidrólisis por ácidos grasos con insaturaciones *cis* (Sandana y Takeuchi, 2008).

El sitio activo de las lipasas difiere en su forma, tamaño, profundidad del bolsillo y características fisicoquímicas de sus aminoácidos (Casas-Godoy *et al.*, 2012). Pleiss y colaboradores (1998) clasificaron las lipasas en tres grupos, de acuerdo a la geometría de su sitio catalítico.

Cuadro 1.3. Topología de los sitios de unión de las lipasas

Fuente	Vista superior	
<p><i>Rhizomucor miehei</i> lipasa</p>		
<p><i>Candida antarctica</i> lipasa B</p>		



El sitio catalítico se encuentra cubierto en su mayor parte por una o dos pequeñas estructuras α -hélice unidas al cuerpo de la enzima por una estructura con elementos flexibles denominado "solapa" (Casas-Godoy *et al.*, 2007; Houde *et al.*, 2004; Murayama *et al.*, 2000; Villeneuve *et al.*, 2000). La solapa protege el sitio activo de disolventes y es desplazada durante la interacción con la interfase sustrato/agua (fig. 1.2). La actividad catalítica depende del estado de agregación del sustrato (Pandey *et al.*, 1999). Las lipasas exhiben baja actividad con sustratos solubles en agua, y mucha mayor actividad con sustratos que forman micelas cuando exceden los límites de solubilidad; esto se denomina activación interfacial, y le permite a la enzima alcanzar su conformación activa con el centro catalítico accesible para el sustrato (Lotti y Alberghina, 2007). Esta activación interfacial resulta en un cambio conformacional en la superficie de la enzima que entra en contacto con el sustrato insoluble (Villeneuve *et al.*, 2000).

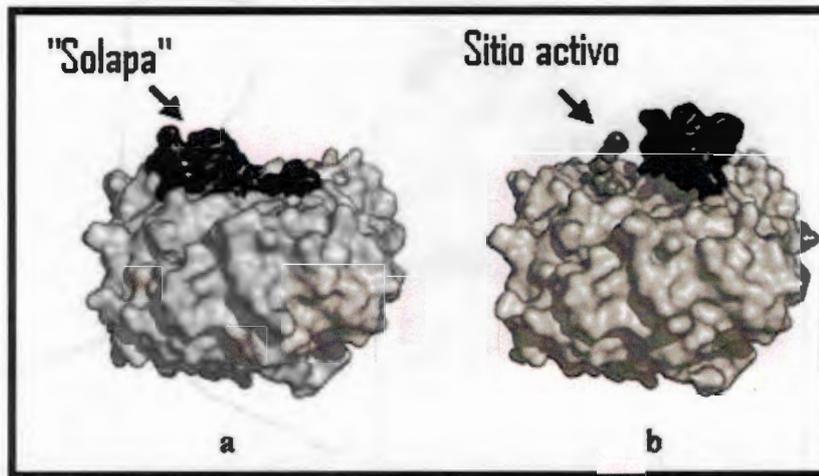


Figura 1.3. Modelo estructural de una lipasa representando sus estados conformacionales. Conformación cerrada con la "solapa", representada en la figura en negro (a), y conformación abierta (b) donde el sitio activo es accesible al sustrato, el cual está representado en gris.

La lipólisis ocurrida en las interfases sustrato/agua no puede ser descrita por el modelo de Michaelis-Menten, el cual es válido únicamente para biocatálisis en fases homogéneas, en la cual el sustrato y la enzima son solubles. Se ha propuesto un modelo simple para describir la cinética de lipólisis en la interfase y consiste en dos pasos sucesivos equivalentes. En la primera fase de equilibrio, ocurre una adsorción reversible entre la enzima y la interfase, mientras que en la segunda fase, la enzima adsorbida se une al sustrato, resultando en la formación de un complejo enzima-sustrato. Posterior a este equilibrio la ecuación es equivalente a la predicha en el modelo de Michaelis-Menten (Houde, 2004).

Con base en todo lo anterior, en este trabajo se tiene el interés de seleccionar hongos del tipo filamentoso que secreten lipasas, esto con el fin de considerar en un futuro mediato posibles aplicaciones biotecnológicas.

II. Hipótesis

Si la capacidad de producción de las lipasas se encuentra distribuida en todos los organismos y los hongos son uno de los principales productores de estas enzimas, es posible seleccionar hongos aislados de residuos agroindustriales que tengan la capacidad de producir altas cantidades de lipasas.

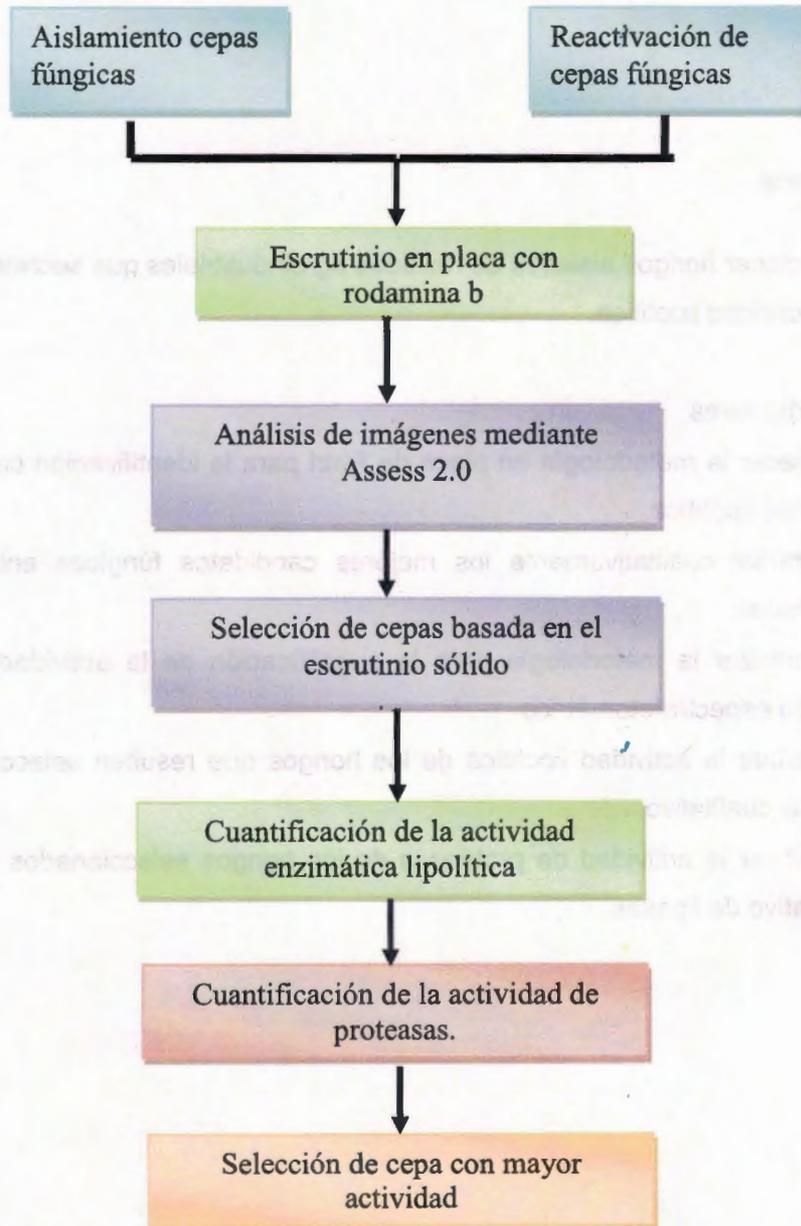
III. Objetivos

Objetivo general

- Seleccionar hongos aislados de residuos agroindustriales que secreten enzimas con actividad lipolítica.

Objetivos Particulares

- Establecer la metodología en placa de Petri para la identificación cualitativa de la actividad lipolítica.
- Determinar cualitativamente los mejores candidatos fúngicos entre las cepas estudiadas
- Estandarizar la metodología para la cuantificación de la actividad lipolítica por método espectrofotométrico
- Cuantificar la actividad lipolítica de los hongos que resulten seleccionados en el análisis cualitativo.
- Cuantificar la actividad de proteasas de los hongos seleccionados en el análisis cualitativo de lipasas.

IV. Estrategia Experimental

V. Referencias

- Abbas. H., A. Hiol, V. Deyris y L. Comeau (2002). Isolation and characterization of an extracellular lipase from *Mucor* sp. strain isolated from palm fruit. *Enzyme and Microbial Technology*, 31, 968-975.
- Alarcón, M. (2008). Producción de la lipasa LIP2 de *Candida rugosa* en el sistema *Pichia pastoris*: caracterización y aplicación en reacciones de síntesis. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Barcelona. España. 15-16 p.
- Aravindan, R., P. Anbumathi y T Viruthagiri (2007). Lipase applications in food industry. *Indian Journal of Biotechnology*, 6, 141-158.
- Asahara, T., M. Matori, M Ikemoto y Y. Ota (1993). Production of two types of lipases with opposite positional specificity by *Geotrichum* sp FO 401B. *Biosci Biotechnol Biochem* 57:390-394
- Bancerz, R. y G. Ginalska (2007). A novel thermostable lipase from Basidiomycetes *Bjerkandera adusta* R59: characterisation and esterification studies. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 34, 553-560.
- Bhavdish, N. J., N Sanja y S Chouhan (1985). Enzymes from thermophilic fungi: Proteases and lipases. *Proceedings of the Indian Academy of Science*, 94, 175-196.
- Belhaj-Ben, I., F. Frikha, I. Maalej-Achouri, A. Gargouri y H. Belghith (2012). Gene cloning and molecular characterization of the *Talaromyces thermophilus* lipase catalyzed efficient hydrolysis and synthesis of esters. *Gene*, 494:112-118.
- Bornscheuer, U. T. (2002). Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiology Reviews*, 26, 73-81.
- Calabrò, V., E. Ricca, M. De Paola, S. Curcio y G. Lorio (2010). Kinetics of enzymatic trans-esterification of glycerides for biodiesel production. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 33, 701-710.
- Casas-Godoy, L., S. Duquesne, F. Bordes, G. Sandoval y A. Marty (2012). Lipases: An Overview, en: *Lipases and Phospholipases, Methods and Protocols*. Sandoval, G. (ed.). Humana Press. New York. pp. 3-30.
- CBDMT®-Market and Business Intelligence, 2008. CBDM.T®, The market and business intelligence company reviews the enzyme market [Online] Disponible en: <http://www.cbddmt.com>

- Cihangir, N. y E. Sarikaya (2004). Investigation of lipase production by a new isolate of *Aspergillus* sp.. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 20, 193-197.
- Colen, G., R. Goncalves, T. Moraes-Santos (2006). Isolation and screening of alkaline lipase-producing fungi from Brazilian savanna soil. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 22, 881-885.
- Dörmo, N., K. Bèlafì-Bakò, L. Bartha, U. Ehrenstein y L. Gubicza (2004). Manufacture of an environmental-safe biolubricant from fuel oil by enzymatic esterification in solvent-free system. Biochemical Engineering Journal, 21, 229-234.
- Fickers, P., A. Marty y J. M. Nicaud (2011). The lipases from *Yarrowia lipolytica*: Genetics, production, regulation, biochemical characterization and biotechnological applications. Biotechnology Advances, 29: 632-644.
- Gandhi, N. N. (1997). Application of lipase. Journal of the American Oil Chemists' Society, 74 (6), 621-634.
- Ginalska, G., R. Bancercz, T. Kornillowicz-Kowalska (2004). A thermostable lipase produced by a newly isolated *Geotrichum*-like strain, R59. Journal of industrial microbiology and biotechnology. 31: 177-182.
- Griebeler, N, A. E. Polloni, D. Remonato, F. Arbter y R. Vardanega (2009). Isolation and screening of lipase-producing fungi with hydrolytic activity. Food Bioprocess Technology, 4, 578-586.
- Ghosh, P. K., R.K. Saxena, R. Gupta, R. P. Yadav y S. Davidson (1996). Microbial lipases: production and applications. Science Progress, 79(2), 119-157.
- Gopinath, S. C. B., P. Anbu y A. Hilda (2005). Extracellular enzymatic activity profiles in fungi isolated from oil-rich environments. Mycoscience, 46, 119-126.
- Gupta., N. Gupta y R. Rati (2004). Bacterial lipases: an overview of production, and purification and chemical properties. Applied Microbiology and Biotechnology, 64, 763-792.
- Hala, H. M., A.A El-Mahalawy, H. A. El-Menofy y S. A. Donia (2010). Production, optimization and partial purification of lipase from *Fusarium oxysporum*. Journal of Applied Sciences in Environmental Sanitation, 5(1), 39-53.
- Hasan, F., A. A. Shah y A. Hameed (2006). Industrial applications of microbial lipases. Enzyme and Microbial Technology, 39, 235-251.

- Hiol, A., M. D.Jonzo, N.Rugani, D. Druet, L. Sarda y L.C. Comeau (2000). Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit. *Enzyme and Microbial Technology*, 26, 421-430.
- Hou, C. T. (2005). Industrial Uses of lipases, en: *Lipid Biotechnology*. Kuo, T. M. y H.W. Gardner (eds.). Taylor & Francis e-Library. New York, pp 435-445.
- Houde, A., A. Kademi y D. Leblanc (2004). Lipases and their industrial applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 118, 155-170.
- Isobe, K. y K. Nohara (1993). Primary structure determination of mono- and diacylglycerol lipase from *Penicillium camembertii*. *Federation of European Biochemical Societies*, 320(2), 101-106.
- Jaeger, K. E. y T. Eggert (2002). Lipases for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 13, 390-397.
- Jaeger, K. E. y M. T. Reetz (1998). Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *TIBTECH*, 16, 396-403.
- Jolivet, P., F. Bordes, F. Fudalej, M. Cancino, C. Vignaud, V. Dossat, C. Burghofer, A. Marty, T. Chardot y J.M. Nicaud (2007). Analysis of *Yarrowia lipolytica* extracellular lipase Lip2p glycosylation. *FEMS Yeast Research*, 7, 1317-1327.
- Lotti, M. y L. Alberghina (2007). Lipases: Molecular structure and function, en: *Industrial Enzymes*. Polaina, J. y A.P. Maccabe (eds). Pp 263-281.
- Margensin, R., G. Feller, M. Hämmerle, U. Stegner y F. Schinner (2002). A colorimetric method for the determination of lipase activity in soil. *Biotechnology Letters*, 24, 27-33.
- Maruyama, T., M. Nakajima, S. Ichikawa, H. Nabetani, S. Furusaki y M. Seki (2000). Oil-water interfacial activation of lipase for interesterification of triglyceride and fatty acid. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 77(11), 1121-1227.
- Mohamed, S. A., H. M. Abdel-Mageed, S. A. Tayel, M. A. El-Nabrawi y A. S. Fahmy (2011). Characterization of *Mucor racemosus* lipase with potential application for the treatment of cellulite. *Process Biochemistry*. 46:642-648.
- Nelson, L. A., T. A. Foglia y W. N. Marmer (1996). Lipase-catalyzed production of biodiesel. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 73(8), 1191-1195.

-
- Pandey, A., S. Benjamin, C. R. Soccol, P. Nigam, N. Krieger y V. T. Soccol (1999). The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 29, 119-131.
- Prakash. M. J., A. Suryam, V. Lakshmi pathi y M. A. Singara (2009). Extracellular hydrolytic enzyme profiles of certain South Indian basidiomycetes. *African Journal Biotechnology*, 8(3), 354-360.
- Pleiss, J., M. Fischer y R. D. Schmid (1998). Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site. *Chemistry and Physics of Lipids*, 93, 67-80.
- Pleiss, J. (2009). The lipase Engineerin database [Online] Disponible en: <http://www.led.uni-stuttgart.de/> [Acceso 16 de mayo 2012].
- Rajesh, E. M., R. Arthe, R. Rajendran, C. Balakumar, N. Pradeepa y S. Anitha (2010). Investigation of lipase production by *Trichoderma reesei* and optimization of production parameters. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 9(7), 1177-1189.
- Robles-Medina, A., P. A. González-Moreno, L. Esteban-Cerdán y E. Molina-Grima (2009). Biocatalysis: Towards ever greener biodiesel production. *Biotechnology Advances*, 27, 398-408.
- Sandana, J. G. y S. Takeuchi (2008). Understanding Structural Features of Microbial Lipases-An overview. *Analytical Chemistry Insights*, 2, 9-19.
- Saxena, R.K., A. Sheoran, B. Giri y W.S. Davidson (2003). Purification strategies for microbial lipases. *Journal of microbiological Methods*, 25, 1-18.
- Sharma, R., Y. Chisti y U. C. Banerjee (2001). Production, purification, characterization and applications of lipases. *Biotechnology Advances*, 19, 627-662.
- Shah, S., S. Sharman y M. N. Gupta (2003). Enzymatic transesterification for biodiesel production. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, 40, 392-399.
- Sheik. N., H. B. Zen, O. B. Tein, Y. M. Halifa, N. Saari y F. A. Bakar (2003). Screening and identification of extracellular lipase-producing thermophilic bacteria from a Malaysian hot spring. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 19(9), 961-968.
- Shimada, Y., Y. Wantanbe, T. Samukawa, A. Sugihara, H. Noda, H. Fukuda y Y. Tominaga (1999). Conversion of Vegetable Oil to Biodiesel using Immobilized

- Candida antarctica* Lipase. Journal of the American Oil Chemists' Society, 76(7), 789-793.
- Singh, A. K. y M. Mukhopadhyay (2012) Overview of fungal lipase: A Review. Applied Biochemistry and Biotechnology, 166(2), 486-520.
- Somkuti, G. A. y F.J. Babel (1958). Lipase activity of *Mucor pusillus*. Applied Microbiology, 16 (4), 617-619.
- Treichel, H., D. Oliveira, M.A. Mazutti, M. Di Luccio y J. Oliveira (2010). A review on microbial lipases production. Food Bioprocess Technology, 3, 182-196.
- Triches, M. C., M. A. Passianoto, S. Cordeiro, D. M. Guimarães, R. C. Araujo y S. Couri (2008). Utilization of agroindustrial residues for lipase production by solid-state fermentation. Brazilian Journal of Microbiology, 39, 676-681.
- Teng, Y, Y. Xu y D. Wang (2009). Changes in morphology of *Rhizopus chinensis* in submerged fermentation and their effect on production of mycelium-bound lipase. Bioprocess and Biosystems Engineering, 32, 397-405.
- Ülker, S., A. Özel, A. Colak y S. Alpay (2011). Isolation, production, and characterization of an extracellular lipase from *Trichoderma harzianum* isolated from soil. Turkey Journal Biology, 35, 543-550.
- Villeneuve, P., J. M. Muderhwa, J. Graille y M. J. Haas (2000). Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 9, 113-148.
- Xu. X. (2000). Production of specific-structured triacylglycerols by lipase-catalyzed reactions: a review. European Journal of Lipid Science and Technology. 287-303.

Journal of the American Oil Chemists' Society, 78(7), 1311-1318.

10. K. H. Johnson, *Journal of Food Science*, 48(2), 188-192 (1987).

11. A. Y. K. Patel, *Journal of Applied Microbiology*, 65(1), 1-8 (1988).

12. J. C. Clavel, M. A. Meunier, M. Di Lucco, and J. O. Garcia, *Journal of Food Science*, 59(1), 1-6 (1994).

13. M. A. Meunier, J. C. Clavel, M. Di Lucco, and J. O. Garcia, *Journal of Food Science*, 60(1), 1-6 (1995).

14. J. O. Garcia, M. A. Meunier, M. Di Lucco, and J. C. Clavel, *Journal of Food Science*, 61(1), 1-6 (1996).

15. J. O. Garcia, M. A. Meunier, M. Di Lucco, and J. C. Clavel, *Journal of Food Science*, 62(1), 1-6 (1997).

16. J. O. Garcia, M. A. Meunier, M. Di Lucco, and J. C. Clavel, *Journal of Food Science*, 63(1), 1-6 (1998).

17. J. O. Garcia, M. A. Meunier, M. Di Lucco, and J. C. Clavel, *Journal of Food Science*, 64(1), 1-6 (1999).

18. J. O. Garcia, M. A. Meunier, M. Di Lucco, and J. C. Clavel, *Journal of Food Science*, 65(1), 1-6 (2000).

19. J. O. Garcia, M. A. Meunier, M. Di Lucco, and J. C. Clavel, *Journal of Food Science*, 66(1), 1-6 (2001).

20. J. O. Garcia, M. A. Meunier, M. Di Lucco, and J. C. Clavel, *Journal of Food Science*, 67(1), 1-6 (2002).

21. J. O. Garcia, M. A. Meunier, M. Di Lucco, and J. C. Clavel, *Journal of Food Science*, 68(1), 1-6 (2003).

22. J. O. Garcia, M. A. Meunier, M. Di Lucco, and J. C. Clavel, *Journal of Food Science*, 69(1), 1-6 (2004).

23. J. O. Garcia, M. A. Meunier, M. Di Lucco, and J. C. Clavel, *Journal of Food Science*, 70(1), 1-6 (2005).

24. J. O. Garcia, M. A. Meunier, M. Di Lucco, and J. C. Clavel, *Journal of Food Science*, 71(1), 1-6 (2006).

25. J. O. Garcia, M. A. Meunier, M. Di Lucco, and J. C. Clavel, *Journal of Food Science*, 72(1), 1-6 (2007).

26. J. O. Garcia, M. A. Meunier, M. Di Lucco, and J. C. Clavel, *Journal of Food Science*, 73(1), 1-6 (2008).

27. J. O. Garcia, M. A. Meunier, M. Di Lucco, and J. C. Clavel, *Journal of Food Science*, 74(1), 1-6 (2009).

28. J. O. Garcia, M. A. Meunier, M. Di Lucco, and J. C. Clavel, *Journal of Food Science*, 75(1), 1-6 (2010).

29. J. O. Garcia, M. A. Meunier, M. Di Lucco, and J. C. Clavel, *Journal of Food Science*, 76(1), 1-6 (2011).

30. J. O. Garcia, M. A. Meunier, M. Di Lucco, and J. C. Clavel, *Journal of Food Science*, 77(1), 1-6 (2012).

31. J. O. Garcia, M. A. Meunier, M. Di Lucco, and J. C. Clavel, *Journal of Food Science*, 78(1), 1-6 (2013).

32. J. O. Garcia, M. A. Meunier, M. Di Lucco, and J. C. Clavel, *Journal of Food Science*, 79(1), 1-6 (2014).

33. J. O. Garcia, M. A. Meunier, M. Di Lucco, and J. C. Clavel, *Journal of Food Science*, 80(1), 1-6 (2015).

34. J. O. Garcia, M. A. Meunier, M. Di Lucco, and J. C. Clavel, *Journal of Food Science*, 81(1), 1-6 (2016).

35. J. O. Garcia, M. A. Meunier, M. Di Lucco, and J. C. Clavel, *Journal of Food Science*, 82(1), 1-6 (2017).

36. J. O. Garcia, M. A. Meunier, M. Di Lucco, and J. C. Clavel, *Journal of Food Science*, 83(1), 1-6 (2018).

37. J. O. Garcia, M. A. Meunier, M. Di Lucco, and J. C. Clavel, *Journal of Food Science*, 84(1), 1-6 (2019).

38. J. O. Garcia, M. A. Meunier, M. Di Lucco, and J. C. Clavel, *Journal of Food Science*, 85(1), 1-6 (2020).

39. J. O. Garcia, M. A. Meunier, M. Di Lucco, and J. C. Clavel, *Journal of Food Science*, 86(1), 1-6 (2021).

40. J. O. Garcia, M. A. Meunier, M. Di Lucco, and J. C. Clavel, *Journal of Food Science*, 87(1), 1-6 (2022).

CAPÍTULO II: ESCRUTINIO DE LA ACTIVIDAD DE LIPASAS

I. Introducción.

Los microorganismos capaces de producir lipasas en abundancia pueden ser encontrados en una gran variedad de hábitats, incluyendo suelos, composta y aguas termales. También es posible encontrarlos en desperdicios de aceites vegetales y productos de la industria láctea, semillas, frutos oleaginosos y alimentos deteriorados (Griebeler *et al.*, 2009; Sorokin *et al.*, 2008; Sharma *et al.*, 2001). El escrutinio de microorganismos puede permitir detectar cepas que produzcan lipasas con estabilidad a diferentes temperaturas y rangos de pH, especificidad a ciertos ácidos grasos y enantioselectividad.

El éxito o el fracaso en los escrutinios de los microorganismos depende de una selección primaria (Colen *et al.*, 2006). Se han usado muchos métodos para el escrutinio de microorganismos con producción de lipasas extracelulares basados en el uso de medios sólidos con inductores tales como aceites vegetales, triglicéridos, tensoactivos y colorantes (Griebeler *et al.*, 2009). Samad y colaboradores (1989) desarrollaron un método de escrutinio primario utilizando diferentes sustratos artificiales como surfactantes, tributirina y trioleína, más la adición de colorantes en el medio para determinar la actividad lipolítica por medio de la intensificación del color alrededor de la colonia o micelio. Sin embargo alguno de estos sustratos pueden no ser adecuados para la detección de lipasas (Griebeler *et al.*, 2009). Los sustratos que son fácilmente dispersos en el medio por agitación como la tributirina; debido a su relativo bajo peso molecular lo que facilita su solubilidad en agua o los surfactantes (fig. 2.1) son también sustratos para otras enzimas denominadas estererasas.

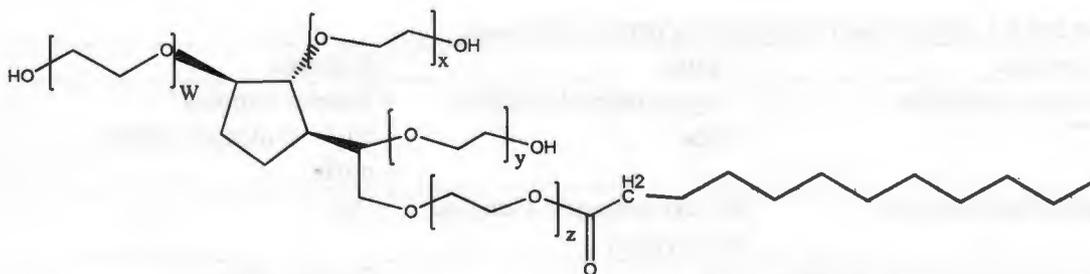


Figura 2.1. Estructura química del Tween 80

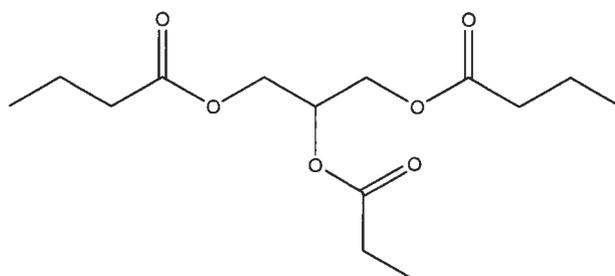


Figura 2.2. Estructura química de la tributirina

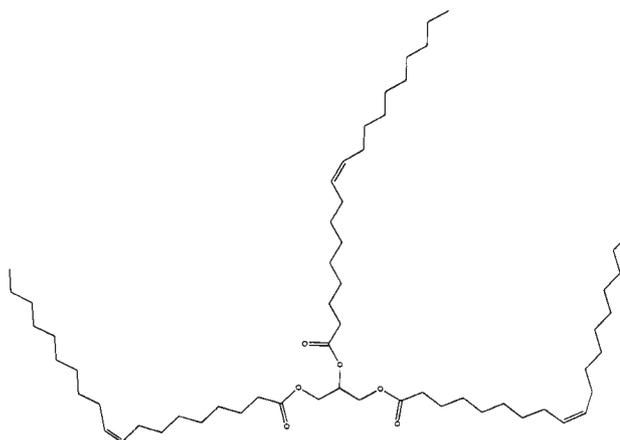


Figura 2.3. Estructura química de la Trioleína

Ambas enzimas catalizan la hidrólisis y síntesis de enlaces tipo éster. Las esterasas hidrolizan ésteres de ácidos carboxílicos de cadena corta, tales como butirato de metilo, butirato de etilo y triacetina, mientras que las lipasas prefieren acilglicéridos de cadena larga (mayor de diez átomos de carbono).

Cuadro 2.1. Diferencias entre lipasas y carboxilesterasas

Propiedad	Lipasa	Esterasa
Sustrato preferido	Triglicéridos de cadena larga	Ésteres simples, triglicéridos de cadena corta
Actividad interfacial	Si (exceptuando <i>Candida antártica</i>)	No
Hidrofobicidad del sustrato	Alta	De alta a baja
Enantioselectividad	Usualmente elevada	De alta a baja
Estabilidad en disolventes	Alta	Alta a baja

Por otra parte el trioleína es un sustrato ideal para las lipasas, debido a que está conformada por ácidos grasos de cadena larga (18:1), no hidrolizables por acción de esterasas; este ácido graso se encuentra en un 70% en el aceite de olivo (Jensen., 1983). Para la detección de la actividad de lipasas este inductor puede ser acompañado por colorantes que faciliten la identificación de halos de degradación, tales como Nile Blue o Victoria Blue. Sin embargo estos colorantes responden a cualquier cambio de pH en el medio y pueden generar inhibición del crecimiento de los microorganismos. Otra opción es el uso de Rodamina B, la cual es insensible a los cambios de pH y permite el reislamiento de los organismos debido a que no induce inhibición del crecimiento o cambios en la fisiología del microorganismo (Kouker y Jaeger, 1987). En este método de detección el sustrato se hidroliza causando la formación de halos fluorescentes de color naranja, visibles bajo irradiación UV (Beisson *et al.*, 2000; Thomson *et al.*, 1999).

II. Materiales y métodos.

Material Biológico

Se trabajó con dos colecciones de hongos, la primera fue aislada por Castillo-Ávila (2010) para la producción de enzimas lignocelulolíticas y una segunda colección aislada de frutos oleaginosos.

Mantenimiento de cepas

Las cepas seleccionadas (Cuadro 2.2 y 2.3) se cultivaron en cajas Petri conteniendo medio Papa/Dextrosa/Agar (PDA) y se incubaron a temperatura ambiente.

Escrutinio de lipasas

El escrutinio se llevó a cabo con base en la metodología de Kouker y Jaeger (1987). El medio se esterilizó en autoclave y se enfrió a una temperatura menor de 60°C. Posteriormente se le adicionó aceite de olivo al 3% (v/v) y 1% de Rodamina B, se homogenizó y el medio se vació en cajas Petri de 5 cm de diámetro. Las placas se inocularon con 1 cm² de micelio cultivado previamente durante 3 días sobre PDA. Los ensayos se realizaron por triplicado y se monitorearon sobre un transiluminador de luz UV a 360 nm. El monitoreo se realizó durante 48 horas, tomándole fotografía a las cepas cada 12 horas.

Selección de Cepas

Para la selección de las cepas se usó el software Assess 2.0. Para la cuantificación se usó el panel de umbral clásico; para la selección del fondo se usó el plano de color RGB, en la opción B y con un intervalo de 34 – 244, mientras que para la selección del área de la fluorescencia se usó la opción “lesión” (que enfoca la señal de interés) en el plano de color HSI opción “H”, tomando dos mediciones: la primera medición con un intervalo de 64-101 (valores predeterminados por el equipo) y una segunda medición con el límite superior definido y el límite inferior variable para cada cepa, con el fin de evitar discriminar áreas con muy baja fluorescencia.

Se generó un índice de referencia, resultado de la multiplicación del área fluorescente y el límite inferior de la barra de umbral (relacionada al área fluorescente respectiva): mientras mayor sea el número de este producto, mayor es la intensidad de fluorescencia observada.

III. Resultados

Se evaluó un total de 29 cepas, de las cuales 21 pertenecen a la colección aislada de desechos agroindustriales de plátano y ocho a los desechos de frutos ricos en grasas. En el medio con Rodamina B se observó que las cepas presentaron distintos grados de desarrollo y variedad en la fluorescencia (fig. 2.4).

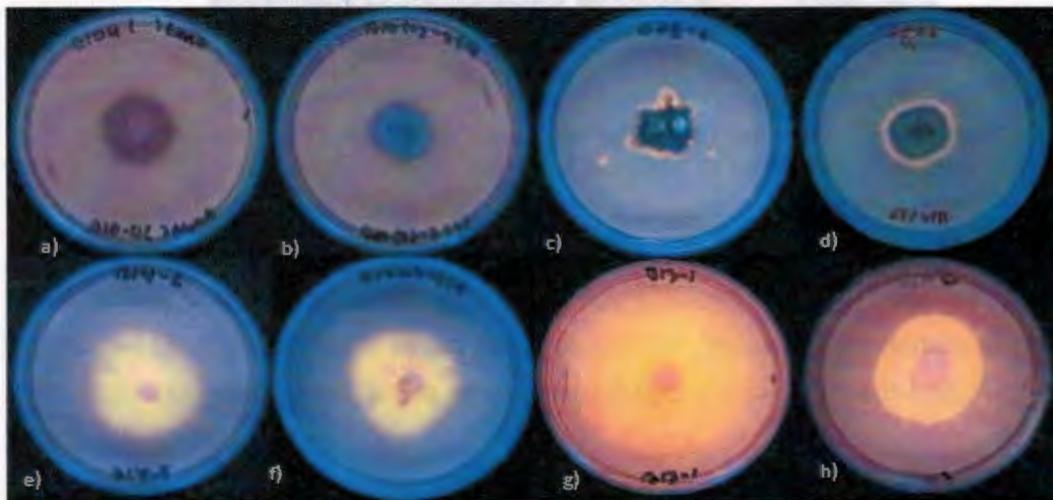


Figura 2.4. Variabilidad del desarrollo y fluorescencia en medio Rodamina B-aceite de olivo de las cepas evaluadas. Dónde: a, b, c, e, f, g son cepas aisladas de materiales lignocelulósicos y d y h pertenecen a residuos oleaginosos.

Las cepas se clasificaron en 4 grupos con base a la apreciación visual de la intensidad de la fluorescencia y el tamaño del área fluorescente. La fluorescencia fue cuantificada a partir del análisis de imágenes de las cepas a las 48 horas de cultivo, mediante el programa Assess 2.0, el cual estima el porcentaje del área de la fluorescencia en relación con el área total de las placas. Para esto las imágenes de las cepas se homogenizaron en tamaño (6*6 cm) y se les colocó una cuadrícula con intervalos correspondiente a 0.5 cm (fig 2.5a). Se consideró el área total de la placa la cual correspondía a 28,27 cm² y mediante el programa se obtuvo un área ocupada por la fluorescencia la cual se reporta en la tabla 2.2.

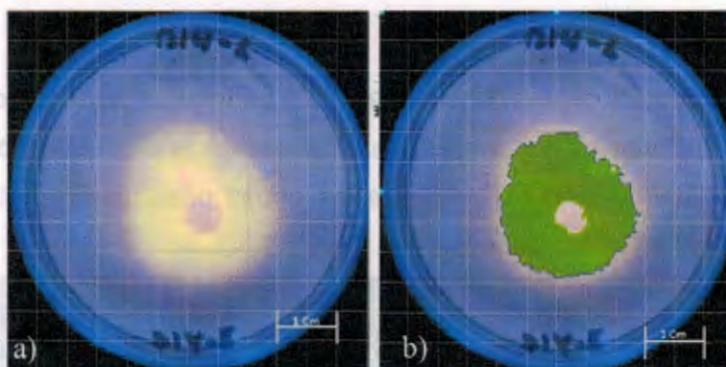


Figura 2.5. Análisis de imágenes usando el programa Assess 2.0. a) Cepa a las 48 h de incubación, b) área de fluorescencia cuantificada en verde.

En la colección de cepas aisladas de residuos agroindustriales, de plátano el 23 % [A04-5, B08-6, B09-6, CO6-3(3), B10-4(+)-2(1) y B19-01-3(3)] presentaron halos pequeños de fluorescencia menores a los 2 cm². Mientras que las cepas B09-5, B09- 8, B11-4, B11-5, B11-7, B13-4, B14-6, B17(+)-4(3) y C09-3 presentaron áreas de fluorescencia entre los 2 y 4 cm².

Por otra parte las cepas B07(+)-1(3), B09-4, B10-4(B1)Emmb y B10(+)-2(4) no presentaron fluorescencia, pero si desarrollo en la placa. Las cepas que presentaron mayor área de fluorescencia, fueron las cepas B13-1 y B13-3, con áreas entre los 15 y 16 cm², así mismo estas fueron las mejores visualmente en cuanto a intensidad (cuadro 2.2).

Cuadro 2.2. Clasificación de las cepas pertenecientes a la colección de desechos agroindustriales de plátano, de acuerdo a su actividad de lipasas.

Cepa	Intensidad de Fluorescencia	Área de Fluorescencia con intervalo definido de 64-101 (cm ²)	Área de fluorescencia (intervalo inferior variable)	“Índice de actividad de lipasa” (Producto del área fluorescente por el límite inferior del umbral de detección)
A04-5	+	1.05	1.77	65.65
A06-6	+	0.016	0.59	18.27
B07(+)-1(3)N	-	0	0	0
B08-6	+	0.08	0.467	3.27
B09-4	-	0	0	0
B09-5	++	3.16	5.198	237.41
B09-8	++	2..46	3.6	122.35

B10-4(b1)Emmb	-	0	0	0
B10(+)-2(4)	-	0	0	0
B10-4(1)-2(1)	-	0	0	0
B11-6	++	4	5.55	190.56
B11-7	++	4.2	6.02	246.76
B13-1	+++	16.09	18.56	1018.96
B13-3	+++	15.85	16.98	1018.96
B13-4	++	1.4	3.65	38.97
B14-6	++	3.76	3.65	25.57
B17(+)-4(3)	++	3.27	4.5	117.19
B19-01-3(3)	+	1	2.02	57.80
C01-3	+	0.3	0.734	39-64
C06-1(3)	+	1.7	4.7	119.79
C09-3	++	2.71	3.6	179.34

La intensidad de la fluorescencia fue estimada visualmente: a) Cepas con nula fluorescencia (-), b) Cepas con baja fluorescencia (+), c) Cepas con fluorescencia media (++), d) Cepas con alta fluorescencia (+++)

El 75% de los hongos aislados de frutos oleaginosos (cuadro 2.3) presentaron actividad. Las cepas Caf2, Cbp y Se02 presentaron áreas de fluorescencia menor a los 4 cm²; las dos cepas con mayor fluorescencia fueron Cav1 con 7.1 cm², Cnc con 5.24 cm² y Ab02 con 4.12 cm².

Cuadro 2.3. Clasificación de cepas fúngicas aisladas de frutas oleaginosas, de acuerdo a su actividad de lipasas

Cepa	Intensidad de Fluorescencia	Área de Fluorescencia con intervalo definido de 64-101 (cm ²)	Área de fluorescencia (intervalo inferior variable)	“Índice de actividad de lipasa” (Producto del área fluorescente por el límite inferior del umbral de detección)
Ab02	+++	4.12	4.71	273.71
Caf2	++	2.96	3.32	189.60
Cbp	++	3.11	5.08	264.3
Cnc	+++	5.24	7.3	383.53
Cbf	-	0	0	0
Cv01	-	0	0	0
Se02	+	0.04	0.47	14.73

La intensidad de la fluorescencia fue estimada visualmente: a) Cepas con nula fluorescencia (-), b) Cepas con baja fluorescencia (+), c) Cepas con fluorescencia media (++), d) Cepas con alta fluorescencia (+++)

Para validar la cuantificación usando este programa se analizó una imagen del trabajo publicado por Savitha y colaboradores (2007). En ese trabajo presentan una cepa de *Mucor* sp. con un halo fluorescente de 2.2 cm de diámetro (fig. 2.6a). La sombra fluorescente fue seleccionada en el programa y se refirió al área total de la caja, dando un diámetro de señal de 2.22 cm, similar al reportado en el estudio.

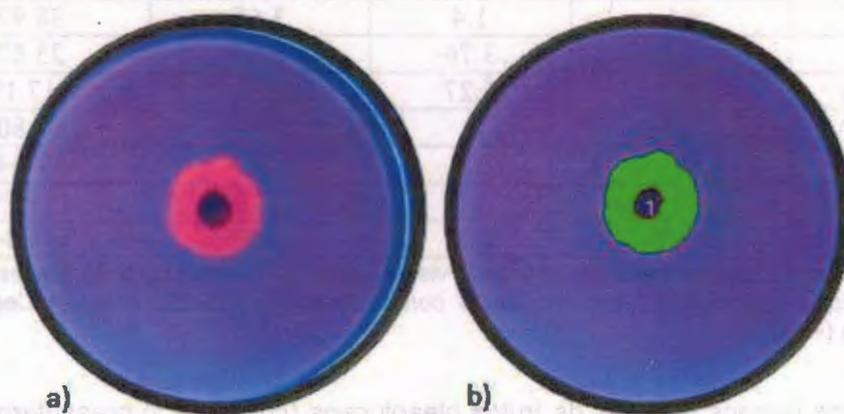


Figura 2.6. Cuantificación del área fluorescente en la cepa *Mucor* sp.. Savitha y colaboradores (2007): a) Cepa de *Mucor* sp. con diámetro de fluorescencia de 2.2 cm, b) En verde, área fluorescente cuantificada mediante el programa Assess 2.0.

De las 29 cepas de hongos estudiadas se seleccionaron cinco (figura 2.7) para la cuantificación espectrofotométrica de la actividad de lipasas. Estas cepas fueron seleccionadas con base en su rápido crecimiento (área con intervalo definido) y fuerte fluorescencia observada (índice de actividad de lipasa) en el método de detección primaria. También se consideró la cepa SE02 (figura 2.7a) debido a que fue la única que presentó un halo bien definido no asociado al tejido micelial.

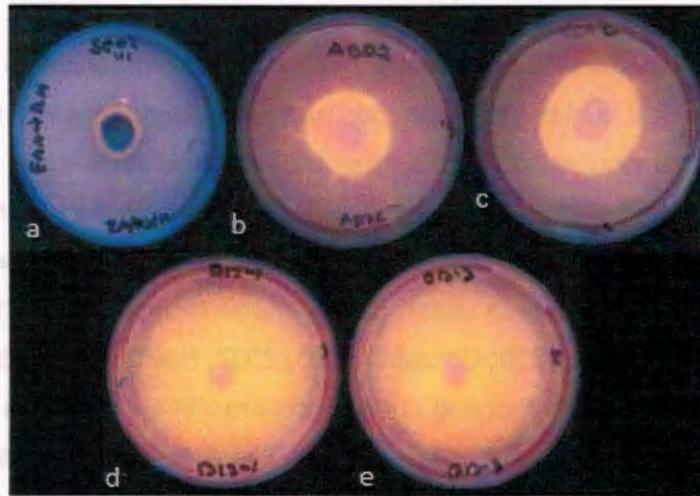


Figura 2.7. Cepas fúngicas seleccionadas en el presente trabajo mediante el método de escrutinio usando Rodamina B. Mencionadas de izquierda a derecha y de arriba hacia abajo: a) Se02, b) Ab02, c) Cnc, d) B13-1, e) B13-3.



IV. Discusión

Se han reportado distintos métodos para la identificación de organismos con actividad de lipasas, dentro de los cuales destacan por su versatilidad aquellos realizados sobre medios sólidos (Thomson *et al.*, 1999). Uno de estos métodos es el desarrollado por Kouker y Jaeger (1987) el cual incorpora el uso de sustancias fluorogénicas como es el caso de la Rodamina B, que indica la actividad lipolítica en presencia de luz ultravioleta. Este método ha sido ampliamente usado (Winayanuwattikun *et al.*, 2011; Jayaprakash y Ebenezer; 2010; Hala *et al.*, 2010; Carissimi *et al.*, 2007; Savitha *et al.*, 2007; Thomson *et al.*, 1999). Sin embargo, se ha reportado que la preparación del medio es difícil, por lo que es conveniente comparar los resultados obtenidos con datos previamente publicados. En el escrutinio sobre medio sólido-Rodamina B en solo un caso se observó un halo de fluorescencia bien definido (Fig 2.8b). En la mayoría de las cepas, la fluorescencia se observó asociada al área ocupada por el micelio (como ejemplo la Fig. 2.8c). Carissimi y colaboradores (2007) comparan los métodos de detección de lipasas con Rodamina B y el que usa Tween como sustrato para determinar la actividad de lipasa de *Sporothrix schenckii*. Estos autores reportan que la actividad lipolítica varía entre los medios usados; encontraron que diez de sus cepas evaluadas con Rodamina B presentaron una alta actividad lipolítica, indicada por la fluorescencia alrededor de la colonia (Fig.2.9g), mientras que en los medios con Tween, solo seis cepas presentaron halos de degradación

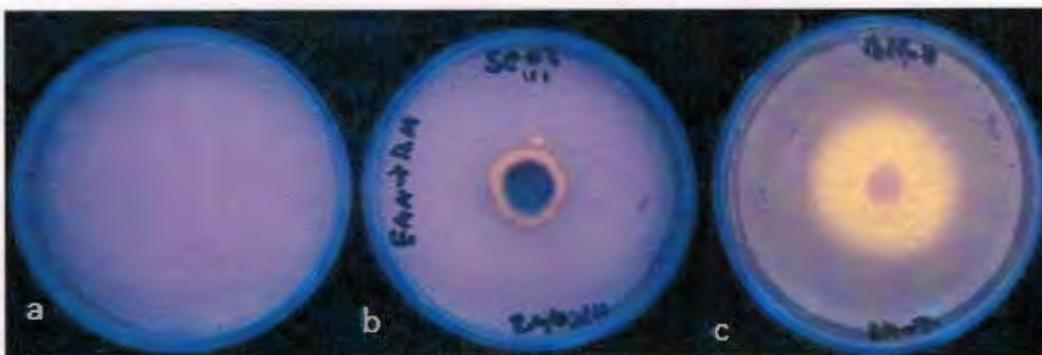


Figura 2.8. Comparación de dos cepas que producen lipasas: a) Caja con medio de Rodamina B sin inóculo, b) Cepa SE02, con presencia de halo fluorescente alrededor del micelio, c) Cepa B11-8, con fluorescencia asociada al micelio.

En la figura 2.9 se observa una comparación entre tres cepas evaluadas en el presente trabajo y las observaciones reportadas en cinco cepas evaluadas en la literatura, en

donde se puede observar la presencia de fluorescencia con distintos tamaños y tonalidades. Cabe hacer notar que la mayoría de las lipasas en esos estudios se observaron asociadas al micelio del hongo, mientras que en la caracterización los autores reportan lipasas extracelulares. La asociación de la actividad con el tejido puede apreciarse claramente en la cepa de *Fusarium solani* (fig. 2.9b) reportada por Winayanuwattikun y colaboradores (2011), la cual presenta cierta similitud a las imágenes observadas en las cepas B17(3)-1(3) y B09-8 evaluadas en este estudio. En el resultado de Hala y colaboradores (2010) se puede observar un patrón semejante al obtenido con la cepa B13-4. La similitud en los resultados obtenidos en el escrutinio en placa en el presente trabajo y los reportados en otros trabajos sugieren que los resultados aquí obtenidos son correctos y apoyan también la funcionalidad del método usado.

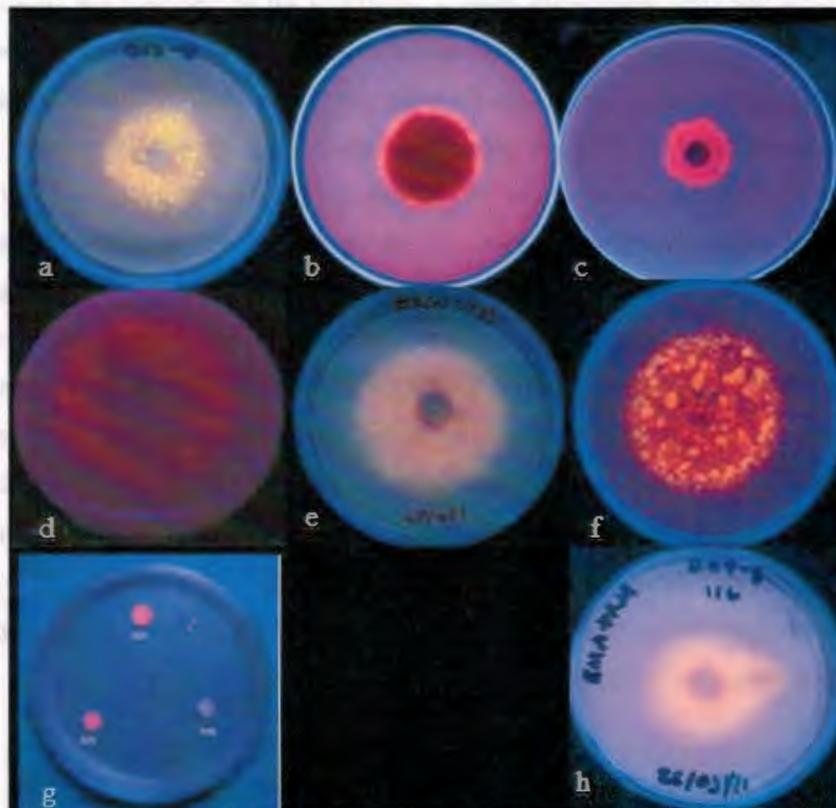


Figura 2.9. Comparación de resultado del presente trabajo y los reportados en la literatura. En donde a) B13-4, e) B17(+)-1(3) y h) B09-8 son cepas evaluadas en el estudio y b) *F. solani* (tomado de: Winayanuwattikun *et al.*, 2011), c) *Mucor* spp. (tomado de: Savitha *et al.*, 2007); d) *A. japonicus* (tomado de: Jayaprakash y Ebenzer, 2010); f) *F. oxysporum* (Tomado de: Hala *et al.*, 2010) y g) *Sporothrix schenckii* (tomado de: Carissimi *et al.*, 2007).

El proceso de selección de las cepas suele ser ambiguo. La clasificación de la actividad en placa está dada en la mayoría de los reportes de manera visual y arbitraria. Rajeswari y colaboradores (2011) realizaron un escrutinio de la actividad de lipasas en una colección de 40 hongos perteneciente a la Universidad de Karpagan, en donde 28 de ellos presentaron actividad en placa y los clasifican en cuatro grupos: +++ muy bueno, ++ bueno, + promedio y – sin fluorescencia. De entre ellos se seleccionaron la cepa de *Penicillium chrysogenum*, la cual presentó la máxima zona de crecimiento con fluorescencia. De la misma manera Savitha y colaboradores (2007) reportaron el escrutinio de 32 aislados; tres cepas de *Aspergillus* sp. y una de *Mucor* sp. presentaron zonas fluorescentes a 350 nm. siendo la cepa de *Mucor* sp. la de mayor zona de fluorescencia (fig. 2.6a). La aplicación de programas informáticos para el análisis de imágenes podría ser una alternativa menos arbitraria en el proceso de selección de las cepas productoras de lipasas, en complemento a las metodologías basadas en placa con Rodamina B, es decir, seguir un criterio de selección basado en la cuantificación del área de fluorescencia. Assess 2.0 es un programa informático diseñado para el análisis de imágenes y la cuantificación de daño por enfermedades en plantas, el cual puede ser aplicado para la cuantificación de áreas en otras imágenes, siempre que sea posible separar el área de interés del trasfondo (Lamarì, 2008). El Assess 2.0 permite cuantificar el área de la fluorescencia en las distintas cepas, además la similitud en el diámetro reportada por Savitha y colaboradores (2007) y el obtenido mediante el análisis de la imagen por Assess 2.0 durante la estandarización del método apoya que este podría ser un método menos arbitrario para la selección de cepas lipolíticas. El resultado con el Assess 2.0 es congruente con la selección visual. La evaluación de la actividad combinando el método de la Rodamina B y el análisis de imágenes mediante el Assess 2.0, permitiría realizar evaluaciones menos arbitrarias y la selección de las cepas puedan ser más comparativas entre distintos trabajos.

V. Referencias.

- Beisson, F., A. Tiss, C. Rivière y R. Verger (2000). Methods for lipase detection and assay: a critical review. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 133-153.
- Castillo-Avila, G. M (2010). Aislamiento de hongos lignocelulolíticos a partir de residuos agroindustriales de plátano. Tesis de Maestría, Centro de Investigación Científica de Yucatán.
- Carissimi, M., C. D. Ottonelli, T. Furtado, V. A. Corbellini y M. L. Scroferneker (2007). Comparison of lipolytic activity of *Sporothrix schenckii* strains utilizing olive oil -rhodamine b and tween 80. *TECNO-LÓGICA*, 11(1), 33-36.
- Colen, G., R. Goncalves, T. Moraes-Santos (2006). Isolation and screening of alkaline lipase-producing fungi from Brazilian savanna soil. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 22, 881-885.
- Griebeler, N, A. E. Polloni, D. Remonato, F. Arbter y R. Vardanega (2009). Isolation and screening of lipase-producing fungi with hydrolytic activity. *Food Bioprocess Technology*, 4, 578-586.
- Hala, H. M., A.A El-Mahalawy, H. A. El-Menofy y S. A. Donia (2010). Production, optimization and partial purification of lipase from *Fusarium oxysporum*. *Journal of Applied Sciences in Environmental Sanitation*, 5(1), 39-53
- Hasan, F., A. A. Shah y A. Hameed (2009). Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. *Biotechnology advances*, 27, 782 -798.
- Jayaprakash, A., P. Ebenzer (2010) Investigation on extracellular lipase by *Aspergillus japonicus* isolated from the paper nest of *Ropalidia marginata*. *Indian Journal of Science and Technology*, 3(2), 113-127.
- Jensen, R. G. (1983) Detection and determination of lipase (Acylglycerol Hydrolase) activity from various sources. *Lipids*, 18(9), 650-657.
- Kouker, G. y K. E. Jaeger (1987). Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. *Applied and Environmental Microbiology*, 53 (1), 211-213.
- Rajeswari, T., M. Palaniswamy, S. Rose, M. Shyni y B. Padmapriya (2011). Biosynthesis of novel alkaline lipase production from *Penicillium chrysogenum* suitable for detergent formulation. *Research journal of pharmaceutical, biological chemical sciences*, 2(3), 128-141.

- Samad, M. Y., C. N. A. Razak, A. B. Salleh, W. M. Zin, K. Ampon y M. Basri (1989). A plate assay for primary screening of lipase activity. *Journal of microbiological methods*, 9, 51-56.
- Savitha, J. S. Srividya, R. Jagat, P. Payal, S. Priyanki, G. W. Rashmi, K. T. Roshini y Y. M. Shantala. Identification of potential fungal strain(s) for the production of inducible, extracellular and alkalophilic lipase. *African Journal of Biotechnology*, 6(5), 564-568.
- Sharma, R., Y. Chisti y U. C. Banerjee (2001). Production, purification, characterization and applications of lipases. *Biotechnology Advances*, 19, 627-662.
- Sorokin, D. Y. y B. E. Jones (2009). Improved Method for direct Screening of true lipase -producing microorganisms with particular emphasis on alkaline conditions. *Microbiology*, 78, 125-130.
- Thomson, C. A., P. J. Delaquis y G. Mazza (1999). Detection and measurement of microbial lipase activity: a review. *Critical reviews in food Science and Nutrition*, 39(2), 165-187.
- Winayanuwattikun, P., C. Kaewpiboon, K. Piriyaannon, W. Chulalaksananukul, T. Yongvanich y J. Svasti (2011). *African Journal of Biotechnology*, 10(9), 1666-1673.

CAPÍTULO III: CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD LIPOLÍTICA

I. Introducción

El siguiente paso después de la selección primaria de las cepas productoras de lipasas, se cuantifica la producción de la enzima en los organismos seleccionados; esto se hace a través de técnicas que se basan en la estimación de la liberación de ácidos grasos.

Uno de los métodos más usados para la cuantificación de la actividad lipolítica es el ensayo por titulación, el cual requiere equipo básico (Thomson *et al.*, 1999). Este método consiste en la titulación del ácido liberado por la lipasa (Hasan *et al.*, 2009), es altamente sensible, ya que permite cuantificar hasta 1 μmol de ácido graso liberado. Las limitantes de este método incluye que requiere emulsiones estables, un absoluto control del pH durante la hidrólisis y el manejo de pHs superiores a 7, ya que por debajo de este valor los ácidos grasos no se ionizan en su totalidad y es imposible llevar a cabo la cuantificación (Guptan *et al.*, 2003). Otra desventaja es que el método requiere largos períodos de tiempo, lo cual lo hace inadecuado para escrutinios de la actividad lipolítica a gran escala (Hou y Johnston, 1992).

Existen otros ensayos que mediante espectrofotometría miden la liberación y formación de complejos coloridos. Dentro de estos métodos se encuentran los que cuantifican el complejo formado por los ácidos grasos liberados y el cobre proveniente de sales cúpricas; el complejo absorbe la luz en el rango visible, dando un color azul (Pinsirodom *et al.*, 2001).

Otro método colorimétrico ampliamente usado es el que utiliza sustratos sintéticos como los *p*-nitrofenoles, que al hidrolizarse generan un producto colorido; el más usado es el derivado del ácido palmítico. La hidrólisis del sustrato por las lipasas libera *p*-nitrofenol y su concentración puede ser cuantificada por espectrofotometría. Este tipo de metodología permite monitorear continuamente la actividad enzimática (Thomson *et al.*, 1999). La mayor limitación de este ensayo es que la reacción enzimática no puede llevarse a cabo en pH ácido debido a la baja absorbancia del *p*-nitrofenol en esa condición. En el cuadro 3.1 se enlistan los principales métodos de cuantificación de la actividad de lipasas, así como las ventajas y desventajas de cada uno.

Cuadro 3.1. Métodos analíticos para la determinación de lipasas (Gupta *et al.*, 2003; Schmid y Verger, 1998).

MÉTODOS Ensayo y sustrato	Compuesto cuantificado	PRINCIPIO	LIMITANTES
Titulación			
Grasas y aceites, triacilglicerol, ésteres de meitlo.	Ácidos grasos	Neutralización de la reacción directamente por indicadores de pH	La adición de emulsificadores generalmente modifica las condiciones de reacción. No aplicable a pH ácidos
Espectrofotométricos			
Ácidos grasos conjugados con β-Naftol	β -Naftol	Estimación del β -Naftol por unión con Fast Blue BB	Los ésteres no son estables a pH extremos
Esteres de p-Nitrofenilp	p-Nitrofenol	Generación de color (p-Nitrofenol) cuantificado a 410 nm	Método conveniente. Usado durante procesos de purificación
Ensayos fluorescentes			
Triglicéridos con grupos alquilo sustituidos por grupos fluorescentes	Grupos prenil libres fluorescentes	El cambio en la longitud de onda de la fluorescencia debido a la hidrólisis de los triacilglicéridos	Ensayo rápido, pero el costo del sustrato limita su uso

En el presente trabajo se seleccionó un método espectrofotométrico usando un éster de *p*-nitrofenilo, debido a que es sencillo y es uno de los más populares en la literatura (Ülker *et al.*, 2011; Supakdamrongkul *et al.*, 2010; Hlavsová *et al.*, 2009; Messias *et al.*, 2009, Rapp y Backhaus, 1992).

La cuantificación de la actividad lipolítica se llevó a cabo en cultivos sumergidos de los hongos seleccionados previamente.

II. Materiales y métodos

Fermentación en medio líquido

La fermentación en líquido se realizó en matraces de 250 mL con un volumen total de 125 mL de medio de fermentación. La metodología se basó en la descrita por Saad y colaboradores (2004). El medio se esterilizó y se le adicionó 1% de aceite de olivo como fuente de carbono. El medio se homogenizó por agitación para disminuir el tamaño de las micelas de grasa y se inoculó con 2 cilindros (5 mm de diámetro en ϕ/u) de micelio provenientes de un cultivo en PDA de tres días. El inóculo fue macerado en agua destilada estéril previo a su adición al medio. Los cultivos líquidos se incubaron a 30°C y agitación constante de 180 rpm. Para evaluar la actividad de lipasa los cultivos se muestrearon cada 24 horas.

Cuantificación de la actividad de lipasa

La cuantificación de la actividad enzimática se realizó en alícuotas recuperadas de los medios de cultivo; las alícuotas fueron centrifugadas a 15,000 G a 4°C durante 15 min. El sobrenadante libre de células se consideró como extracto crudo.

La determinación de la actividad enzimática se basó en el seguimiento de la liberación de *p*-nitrofenol a partir de palmitato de *p*-nitrofenilo. Para el ensayo, 1.2 mL del amortiguador conteniendo el palmitato de *p*-nitrofenilo se precalentó a 37°C y se le adicionaron 50 μ l de extracto crudo. Después de 15 min de incubación a 37°C se midió la absorbancia a 410 nm. Como blanco se utilizó la "reacción" sin extracto enzimático. Una unidad enzimática de lipasa corresponde a 1 μ M de *p*-nitrofenol liberado por minuto (Petersen y Daniel, 2006; Dalmau *et al.*, 2000, Papaparaskevas *et al.*, 1992, Rivera-Muñoz *et al.*, 1991).

Cuantificación de la actividad proteolítica

Para la cuantificación de la actividad proteolítica se empleó 1 mL de extracto crudo al cual se le adicionó 2 mL de solución de caseína al 2% en amortiguador 0.2 M de fosfato de sodio a pH 8.0. Las muestras se incubaron durante 30 minutos a 40°C y la reacción se detuvo mediante la adición de 4 mL de ácido tricloroacético al 10%. Las muestras se centrifugaron a 12000 rpm, durante 7 minutos a 4°C. La cantidad de tirosina liberada se cuantificó por el método de Lowry (1951), midiendo la densidad óptica a 650 nm.

III. Resultados

Para el establecimiento de la metodología de cuantificación de actividad de las lipasas se utilizó el ácido tricloroacético (TCA) como método de paro de la reacción, y la adición de NaOH 8 M para neutralizar posteriormente el pH, debido a que la absorbancia del *p*-nitrofenol disminuye a pH ácido. Se aplicó TCA al 5% después de la reacción y se incubó en hielo por 5 minutos; posterior a esto a cada una de las muestras se adicionaron 65µL de NaOH 8 M para restablecer el pH.

En la cuantificación se observó mucha variación en las lecturas. Por lo tanto se tomó la decisión de no incluir el paso de "paro de la reacción" sino únicamente centrifugar las muestras y llevar a cabo la lectura a un tiempo estrictamente fijo. De esta manera ya fue posible cuantificar la actividad de las lipasas.

En el ensayo para establecer el método de cuantificación se trabajó con las cepas Ab02, B13-1, B13-3 y CnC ya que presentaron una mayor área de fluorescencia y la cepa SE02, la cual presentó un halo alrededor de la colonia. La cuantificación de la actividad enzimática se llevó a cabo del primero al octavo día de cultivo (Fig. 3.1).

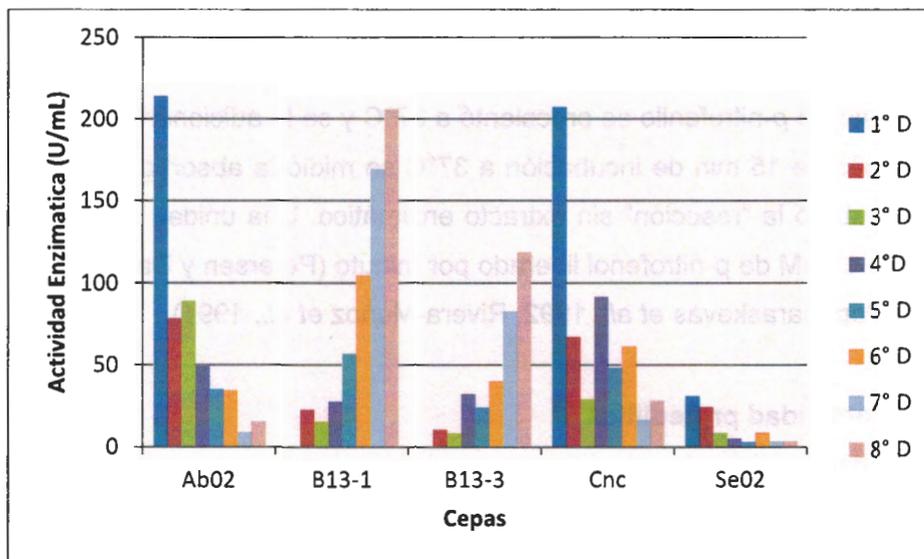


Figura 3.1. Cuantificación de la actividad de lipasas en cepas previamente seleccionadas mediante el método de Rodamina B.

En este experimento se observó que las cepas Ab02 y CnC alcanzaron su máxima actividad en el primer día de fermentación, con valores cercanos a 215 U/mL. Se observó que estas dos cepas presentaron un rápido crecimiento y consumo del aceite de olivo usado como sustrato desde el primer día de fermentación. Su actividad declinó en los días

subsecuentes. La cepa SE02 que fue la única con un pequeño halo alrededor de la colonia sobre el medio sólido con Rodamina B, también alcanzó su máxima actividad en el primer día de cultivo, con 21 U/mL; posteriormente la actividad empezó a declinar.

Por otra parte la cepa B13-1 inició su crecimiento lentamente, incrementando su actividad a partir del 4° día y alcanzó su máximo pico de actividad al octavo día, con 205 u/mL, seguido por la cepa B13-3 con 109 U/mL al 8° día, la cual presentó un crecimiento similar.

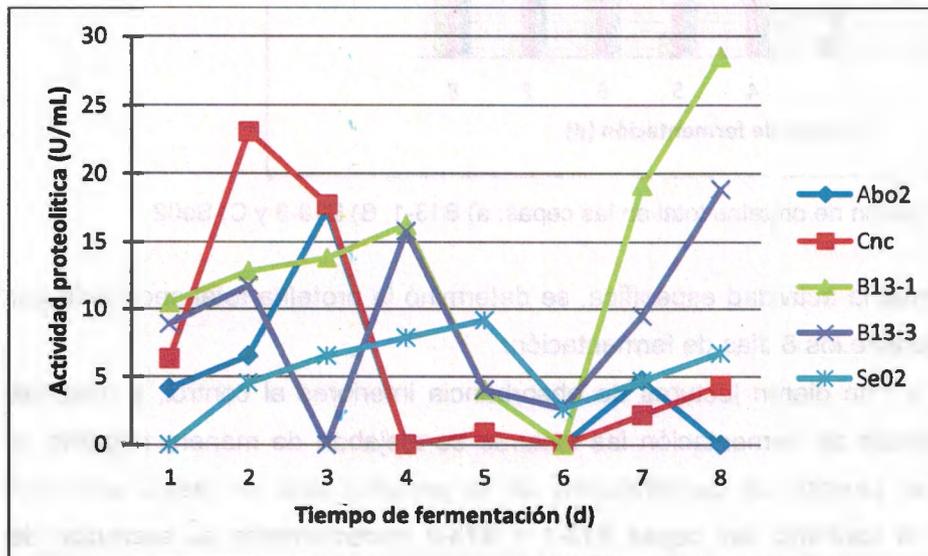


Figura 3.2. Cuantificación de la actividad de proteasas en las cepas previamente seleccionadas con el método de Rodamina B.

En cuanto a proteasas, las cepas CnC y B13-1 fueron las que más secretaron esta enzima. La cepa CnC presentó su máxima actividad proteolítica al segundo día, alcanzando aproximadamente 23 U/mL. Este incremento en la actividad enzimática coincidió con una drástica disminución en la actividad lipolítica; esta caída de actividad de lipasa también se observó en la cepa Ab02, la cual presentó un morfotipo similar y proviene de frutos oleaginosos. Las cepas B13-1 y B13-3 aisladas de residuos agroindustriales de plátano presentaron un perfil de actividad proteolítica similar; la cepa B13-1 alcanzó la mayor actividad enzimática en el último día de fermentación, con 28.6 U/mL, siendo también este día de fermentación en el cual se presentó la mayor actividad lipolítica de esta cepa. La cepa SE02 tuvo su máxima actividad proteolítica al 5° día de fermentación, con 9 U/mL. Checar esta parte

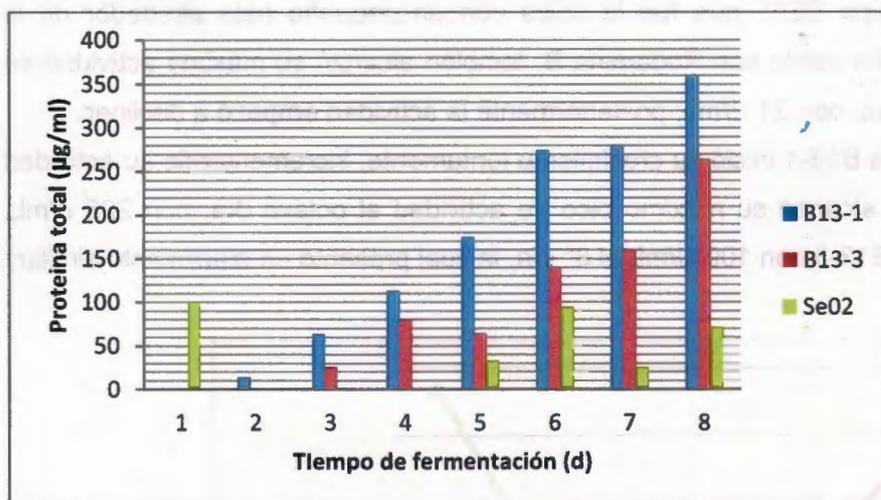


Figura 3.3. Cuantificación de proteína total en las cepas: a) B13-1, B) B13-3 y C) Se02

Con el fin de estimar la actividad específica, se determinó la proteína total secretada por las cinco cepas durante los 8 días de fermentación.

Las cepas Ab02 y Cnc dieron lecturas de absorbancia inferiores al control, y mientras mayor fuera el tiempo de fermentación las lecturas se alejaban de manera negativa al control, lo que no permitió la cuantificación de la proteína total en estos extractos enzimáticos. Por el contrario, las cepas B13-1 y B13-3 incrementaron su secreción de proteína total conforme avanzaba el tiempo de fermentación, alcanzando la máxima cantidad de proteína al octavo día de fermentación; la cepa B13-1 presentó una actividad específica de 568.26 U/mg (proteína total 360.75 µg/mL) y la cepa B13-3 413.26 U/mg (proteína total 264 µg/mL). La cepa Se02 tuvo su máxima cantidad de proteína total el primer día de fermentación (99.46 µg/mL) y su actividad específica de lipasa en el primer día de fermentación fue de 211.16 U/mg.

IV. Discusión

La producción de lipasas en los hongos está altamente regulada por factores nutricionales y fisicoquímicos como temperatura, pH, fuente de carbono y nitrógeno, sales inorgánicas, agitación y concentración de oxígeno disuelto. Además de estos factores se reporta que estas enzimas son generalmente inducidas por la presencia de lípidos tales como aceite, ácidos grasos, triglicéridos, detergentes, surfactantes, ésteres hidrolizables y sales biliares (Singh y Mukhopadhyay, 2011). También existen reportes en los cuales la producción de la enzima se da de manera constitutiva en medios ausentes de aceites. Abbas y colaboradores (2002) reportaron el aislamiento de una cepa de *Mucor* sp. a partir de aceite de palma contaminado; la adición de aceite de olivo en el medio de cultivo no incrementó la producción de las lipasas de esta cepa. Su producción óptima fue en un medio rico en nitrógeno y la máxima producción fue al 6° día de cultivo, con 57 U/mL. Ülker y colaboradores (2011) reportaron la cuantificación de lipasas en una cepa de *Trichoderma harzianum*, con un máximo de actividad de 0.24 U/mL al 7° día de fermentación en un medio de glucosa con peptona.

Sin embargo, la mayoría de los trabajos reportados citan un incremento de la producción de lipasas en medios con aceites, siendo el aceite de olivo uno de los más usados como inductor (Adham y Ahmed, 2009; Asses *et al.*, 2009; Azeredo *et al.*, 2007; Colen *et al.*, 2006; Burkert *et al.*, 2003; Coca *et al.*, 2001; Torre *et al.*, 1996). Chahinian y colaboradores (2000) realizaron la caracterización de una cepa de *Penicillium cyclopium* en cultivos estacionarios, observando una baja producción de lipasas cuando los fermentados estaban en ausencia de aceite de olivo. Bajo las mismas condiciones, pero con 1% de aceite de olivo, la actividad de las lipasas en el medio aumentó a 120 U/mL a los seis días de fermentación. Resultados similares se obtuvieron en la producción de lipasa con *Yarrowia lipolytica*, en donde la producción de la enzima extracelular fue baja en un medio basal e incrementó considerablemente a 48.5 U/mL cuando se le adicionó aceite de olivo (Domínguez *et al.*, 2003). Debido a esto en el presente trabajo se empleó un medio que como fuente de carbono contenía aceite de olivo, para favorecer la inducción de la enzima. Las cepas Ab02 y Cnc aisladas de frutos ricos en grasa presentaron altas actividades a las 24 horas de fermentación y posteriormente fueron disminuyendo. En estas cepas se observó rápido crecimiento del inóculo (apreciación visual), lo cual podría estar relacionado con la pronta aparición de las lipasas. Fickers y colaboradores (2003) demostraron a través de inmunolocalización que en las etapas tempranas de la fase de crecimiento de las cepas de *Yarrowia lipolytica*, las lipasas

extracelulares están comúnmente asociadas a la pared celular y empiezan a ser liberadas en el medio de cultivo en la etapa final de la fase de crecimiento. Hlavsová y colaboradores (2009) reportó una máxima producción de lipasas asociadas a membrana después de 22 horas de incubación, cuando existe un crecimiento celular y una máxima actividad de lipasas extracelulares a las 26 horas de fermentación; posterior a esto la actividad disminuyó. Así mismo Mladenoska y Dimitrivski (2001) reportaron una cepa de *Geotrichum candidum* aislada de leche en estado de descomposición, la cual presentó máxima producción de lipasas a las 24 horas de fermentación. Por otra parte Hala y colaboradores (2010) reportaron una máxima producción de lipasas al quinto día de fermentación con una cepa de *Fusarium oxysporum*, mientras que Azeredo y colaboradores (2007) encontraron que *Penicillium restrictum* aislado de la torta proteica de babassu (*Attalea speciosa*) produce lipasas rápidamente en diversas fuentes de carbono, entre 96 y 172 horas de fermentación. Estos reportes sugieren que la producción de la enzima no depende estrictamente del sitio de aislamiento, sino del hongo y su capacidad *per se* de producción de la enzima. Algunas cepas seleccionadas entre las que fueron aisladas de residuos ricos en lípidos, como las que fueron seleccionadas entre las cepas aisladas de residuos agroindustriales de plátano, presentaron interesantes perfiles enzimáticos, con actividades por arriba de varias de las demás cepas evaluadas (cuadro 3.2) y siendo las cepas Ab02 y Cnc las más altas con 215 U/mL

Cuadro 3.2. Cepas fúngicas con actividad lipolítica en fermentación sumergida.

Cepa	Aislamiento	Actividad	Referencia
<i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus fumigatus</i>	Cepario del Instituto Cubano de Investigaciones y Derivados de la caña de azúcar	0.26 U /mL 0.21 U/mL	Coca <i>et al.</i> , 2001
<i>Aspergillus niger</i>	Semillas de <i>Jatropha curca</i> y pan	0.212 U/mL	Xiao <i>et al.</i> , 2010
<i>Aspergillus</i> sp.	Lodos, suelos contaminados con aceite y alimentos	16.6 U/mL	Cihangir y Sarikaya., 2004

	en descomposición		
<i>Candida rugosa</i>		5.3 U/mL	Dalmau <i>et al.</i> , 2000
<i>Fusarium oxysporum</i>	Margarina	44.9 U/mL	Moataza <i>et al.</i> , 2005
<i>Mucor geophyllus</i>	Suelos	44.56 U/mL	Naqvi <i>et al.</i> , 2011
<i>Penicillium chrysogenum</i>		205 U/mL	Shafei y Allam, 2010.
<i>Rhizopus oryzae</i>	Fruto de palma de aceite	120 U/mL	Hiol <i>et al.</i> , 2000.
<i>Rhodotirula glutinis</i>		30.4 U /mL	Papaparaskevas <i>et al.</i> , 1992
<i>Trichoderma reesei</i>		4.23 U/mL	Rajesh <i>et al.</i> , 2010.
<i>Rhizopus sp.</i>	Aceites contaminados	870 U/mL	Kantak <i>et al.</i> , 2011
Ab02	Fruto de aguacate	215 U/mL	
B13-1	Residuos lignocelulósicos de plátano	205 U/mL	
B13-3	Residuos lignocelulósicos de plátano	109 U/mL	
Cnc	Fruto de coco	215 U/mL	
Se02	Alimento contaminado	21 U/mL	

Kantak y colaboradores (2011) aislaron una cepa de *Rhizopus sp.* de aceites contaminados en los templos de Pune, en India, presentando una de las más altas actividades descritas en la literatura, con 870 U/mL a las 72 horas de fermentación en un medio optimizado con glucosa como fuente de carbono y licor de maíz concentrado como fuente de nitrógeno. Los altos rendimientos encontrados en esta cepa podrían deberse a que las fuentes orgánicas de nitrógeno favorecen la síntesis de la enzima (Fadiloglu y Ekemen, 1999). Además se ha reportado que la producción de lipasas en *Rhizopus*

oryzae es constitutiva (Hama *et al.*, 2006; Ban *et al.*, 2001). Messias y colaboradores (2009) describieron una cepa de *Botryosphaeria ribis* aislada de *Eucalyptus citriodora*, como la mejor productora de lipasa entre siete cepas del género *Botryosphaeria*. Esta cepa produjo 316.7 U/mL de lipasa en un medio que contiene ácido esteárico y 283.5 U/mL cuando se usó ácido palmítico y Tritón X-100. Posiblemente esta alta producción se debe a que *B. ribis*, hongo patógeno principalmente de especies leñosas, puede infectar a los frutos del olivo (Moral *et al.*, 2010; Romero *et al.*, 2005), los cuales son ricos en ácidos grasos.

La alta actividad de lipasa extracelular encontrada en el presente trabajo en las cepas seleccionadas confirma lo observado en el escrutinio en placa. Con base en ambos resultados las cepas Ab02, Cnc y B13-1 pueden ser consideradas interesantes para posteriores trabajos de estudio o producción de lipasas. Las cepas microbianas productoras de lipasas extracelulares, no solo secretan estas enzimas en los medios de fermentación, sino que también pueden producir y secretar proteasas (Zhen-Yu *et al.*, 2010). La actividad proteolítica puede provocar la degradación de las lipasas, por lo cual se busca que las cepas seleccionadas con alta capacidad lipolítica tengan baja actividad proteolítica (Rivera-Muñoz *et al.*, 1991).

En el presente trabajo las cepas B13-1 (28.5 U/mL), Cnc (23 U/mL) y B13-3 (18.8 U/mL) presentaron la mayor actividad extracelular de proteasas a distintos tiempos de fermentación; sin embargo en las cepas B13-1 y B13-3 no se observó un decremento en la actividad de lipasas que pudiera explicarse por alta actividad de proteasas; únicamente con la cepa Cnc pareció coincidir la disminución de actividad de lipasa con la presencia de proteasa. Curiosamente en las cepas B13-1 y B13-3 coinciden los momentos de máximas actividades de lipasas y proteasas; es posible que el papel de las proteasas en estos hongos sea liberar las lipasas de la membrana celular en los últimos días de la fermentación. En el caso de *R. oryzae* la lipasa ROL34 es cortada en una secuencia terminal por acción de serina proteasas y se libera de una secuencia N-terminal de 28 aminoácidos que es determinante en la translocación de las enzimas una vez cortado, conservando su actividad (Hama *et al.*, 2006). Existen pocos trabajos en la literatura en donde se cuantifica tanto la actividad de lipasas como de proteasas; la mayoría solo llega a la determinación semi-cuantitativa de halos de degradación. Alves y colaboradores (2002) observaron que las cepas con mayor actividad de lipasas, presentaron halos de actividad de proteasas medios a elevados. Rivera-Muñoz y colaboradores (1991) estudiaron la producción de lipasas en fermentación en estado sólido con varios hongos

filamentosos. Los hongos *Penicillium candidum*, *Mucor miehi* y *Penicillium camembertii* presentaron las mayores actividades del estudio (36.5, 25.1, 24.6 U/mL) y baja actividades de proteasas (12.6, 16.6 y 13.2 U/mL) respectivamente, siendo estos valores más bajos que los encontrados en la actividad proteolítica de las cepas B13-1 (28.5 U/mL) y Cnc (22 U/mL), pero cercano a lo determinado en B13-3 (18 U/mL). Diniz y colaboradores (1999) observaron que en medios peptonados la cepa *Fusarium solani* (FS1) presentó una baja actividad de proteasas, alcanzando su máxima actividad a las 72 horas de cultivo (10.5 U/mL). Katz (1993) reportó selección de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* hiperproductoras de lipasas y su criterio de selección fue que tuviera alta producción de la enzima comparada con las otras cepas (en ese caso fue de 18.5 U/mL) y baja actividad de proteasas (0.9 U/mL).

En la cuantificación de proteína total realizada por el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1985) se observó que las cepas Ab02 y Cnc presentaron lecturas por abajo del control y que las lecturas fueron disminuyendo en el transcurso del tiempo de fermentación. Por el contrario, en las cepas B13-1 y B13-3 se apreció un aumento de la proteína total al paso de los días de fermentación, teniendo similitud con el patrón de incremento de actividad de lipasas en ambas muestras. El comportamiento presentado en las cepas Ab02 y Cnc podría estar relacionado con la presencia de compuestos que inhiban o alteren la cuantificación de proteína total por el método seleccionado. Niamke y colaboradores (2005) reportaron que distintos compuestos químicos como ácidos orgánicos pueden alterar la estimación de proteínas mediante el método de Lowry, mientras que algunos compuestos como el ácido ascórbico provocan que se sobreestime la proteína, ácidos orgánicos como el propiónico y el acético provocan que se subestime y la subestimación es mayor conforme se incrementa la cantidad de estos compuestos en el medio. Algunos de estos ácidos se generan en el proceso fermentativo de los hongos, por ejemplo Daigle y colaboradores (1999) reportaron la síntesis de los ácidos acético, propiónico, isobutírico y butírico en la fermentación llevada a cabo con *Geotrichum candidum*.

Cuadro 3.3. Actividad específica de lipasa extracelular fúngica.

Hongo	Actividad Lipolítica (U/mL)	Actividad específica (U/mg)	Referencia
<i>Botryosphaeria ribis</i>	20.1	227.6	Barbosa <i>et al.</i> , (2011)
<i>Botryosphaeria ribis</i>	173.3	247.4	Messias <i>et al.</i> , (2009)
<i>Candida rugosa</i>	48.61	1.48	Benjamin y Pandey., (2001)

<i>Penicillium</i> sp.	120.7	9.6	Gulomova <i>et al.</i> , (1996)
<i>Penicillium citrinum</i>	2.880	3.2	Pimentel <i>et al.</i> , (1994)
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	0.4	22	Lima <i>et al.</i> , (2003)
<i>Rhizopus oryzae</i>	870	28-31	Kantak <i>et al.</i> , (2011)
B13-1	205	568.26	Presente trabajo
B13-3	109	413.27	Presente trabajo
Se02	21	211.13	Presente trabajo
Ab02	215	-----*	Presente trabajo
Cnc	215	-----*	Presente trabajo

Actividad específica en extractos crudos obtenidos de fermentación sumergida.

*probable presencia de interferencia que provocan lecturas por debajo del blanco

La actividad específica de lipasa en las cepas B13-1 y B13-3 fueron superiores a reportes previos (Cuadro 3.3), siendo el más cercano, el de Messias y colaboradores (2009) con una cepa de *Botryosphaeria ribis* aislada de fuentes lignocelulósicas y cultivado con 1% de aceite de olivo.

Los resultados de cuantificación confirmaron que las cepas B13-1, Ab02 y Cnc, que fueron las que mostraron mayor fluorescencia sobre el medio con Rodamina B, son las que secretan mayor actividad de lipasa entre las cepas estudiadas en el presente estudio.

V. Referencias

- Abbas, H., A. Hiol, V. Deyris, L. Comeau (2002). Isolation and characterization of an extracellular lipase from *Mucor sp* strain isolated from palm fruit. *Enzyme and microbial technology*, 31, 968-975.
- Adham N. Z. y E. M. Ahmed (2009). Extracellular lipase of *Aspergillus niger* NRRL3; production, partial purification and properties. *Indian Journal Microbiology*, 49, 77-83.
- Alves, M. H., G. M. Campos-Takaki, A. L. Figueiredo, A. I. Milanez (2002). Screening of *Mucor spp.* for the production of amylase, lipase, polygalacturonase and protease. *Brazilian journal of microbiology*, 33, 325-330.
- Asses, N., L. Ayed., H. Boullagui, I.B. Rejeb, M. Garaguri, M. Hamdi (2009). Use of *Geotrichum candidum* for olive mill wastewater treatment in submerged and static culture. *Bioresource Technology*, 100, 2182-2188.
- Azeredo, L. A. I., P. M. Gomes, G. L. Sant'Anna Jr., L. R. Castilho y D. M. G. Freire (2007). Production and regulation of lipase activity from *Penicillium restrictum* in submerged and solid-state fermentations. *Current Microbiology*, 54, 361-365.
- Ban, K., M. Kaieda, T. Matsumoto, A. Kondo y H. Fukuda (2001). Whole cell biocatalyst for biodiesel fuel production utilizing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles. *Biochemical Engineering Journal*, 8:39-43.
- Barbosa, A. M., J. M. Messias, M. M. Andrade, R. F. H. Dekker y B. Ventakatesagowda (2011). Soybean oil and meal as substrates for lipase production by *Botryosphaeria ribis*, and soybean oil to enhance the production of Botryosphaeran by *Botryosphaeria rhodina*. In: *Soybean-Biochemistry, chemistry and physiology*. Tzi-Bun, N. (ed). InTech. Pp. 101-118.
- Benjamin, S. y A. Pandey (2001). Isolation and characterization of three distinct forms of lipase from *Candida rugosa* produced in solid state fermentation. *Brazilian archives of biology and technology*, 4(2), 213-221.
- Burkert, J. F. M., F. Maugeri y M. I. Rodrigues (2003). Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum sp.* Using factorial design. *Bioresource Technology*, 91, 77-84.
- Chahinian, H., G. Vanot, A. Ibrik, N. Rugani, L. Sarda y L. Comeau (2000). Production of extracellular lipases by *Penicillium cyclopium* purification and characterization of a partial acylglycerol lipase. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 64(2), 215-222.

- Cihangir, N. y E. Sarikaya (2004). Investigation of lipase production by a new isolated of *Aspergillus* sp.. World journal of microbiology and biotechnology, 20, 193-197.
- Coca, J., O. Hernández, R. Berrio, S. Martínez, E. Díaz y J. C. Dustet (2001). Producción y caracterización de las lipasas de *Aspergillus niger* y *A. fumigatus*. Biotecnología aplicada, 18 (4), 216-220.
- Colen, G., R. Goncales-Junqueira y T. Moraes-Santos (2006). Isolation and screening of alkaline lipase-producing fungi from Brazilian savanna soil. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 22, 881-885.
- Daigle, P., P- Gélinas, D. Leblanc y A. Morin (1999). Production of aroma compounds by *Geotrichum candidum* on waste bread crumb. Food Microbiology, 16, 517-522.
- Dalmau, E., J.L. Montesinos, M. Lotti, C. Casas (2000). Effect of different carbon sources on lipase production by *Candida rugosa*. Enzyme and microbial technology, 26, 657-663.
- Diniz, M. M., M. M. Camargo, M. A. Morais, E. H. Magalhaes y J. L. de Lima (1999). Production of extracellular lipase by the phytopathogenic fungus *Fusarium solani* FS1. Revista de Microbiología, 30, 304-309.
- Domínguez, A., F. J. Deive, M. A. Sanromán y M. A. Longo (2003). Effect of lipids and surfactants on extracellular lipase production by *Yarrowia lipolytica*. Journal of chemical technology and biotechnology, 78, 1166-1170.
- Fickers, P., J.M. Nicaud, J. Destain y P. Thonart (2003). Overproduction of lipase by *Yarrowia lipolytica* mutants. Applied Microbiology Biotecnology, 63, 136-142.
- Fadiloglu, S. y O. Erkmen (1999). Lipase production by *Rhizopus oryzae* growing on different carbon and nitrogen sources. Journal of the Science of Food and Agriculture, 79, 1936-1938.
- Gulomova, K., E. Ziomek, J. D. Schrag, K. Davranov y M. Cygler (1996). Purification and characterization of a *Penicillium* sp. Lipase which discriminates against diglycerides. Lipids, 31(4), 379-384.
- Gupta, R., P. Rathi, N. Gupta y S. Bradoo (2003). Lipase assays for conventional and molecular screening: an overview. Biotechnology and Applied Biochemistry, 37, 63-71.

- Hala, M.O. R., A. E. Adel, A. E. Hassaan y A. D. Samed (2010). Production, optimization and partial purification of lipase from *Fusarium oxysporum*. Journal of Applied Sciences in Environmental Sanitation, 5(1), 39-53.
- Hama, S., S. Tamalampudi, T. Fukumizu, K. Miura, H. Yamaji, A. Kondo y H. Fukuda (2006). Lipase localization in *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles for use as whole-cell biocatalysts in biodiesel-fuel production. Journal of Bioscience and Bioengineering, 101(4), 328-333.
- Hasan F., A. A. Shah y A. Hameed (2009). Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. Biotechnology Advances, 27, 782-798.
- Hiol, A., M. D. Jonzo, N. Rugani, D. Druet, L. Sarda y L. C. Comeau (2000). Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit. Enzyme and Microbial Technology, 26, 421-430.
- Hlavsová, K., M. Zrevucka, Z. Wimmer, M. Macková, H. Sovová. (2009). *Geotrichum candidum* 4012: Extracellular lipase versus cell-bound lipase from the single strain. Journal of molecular catalysis B. Enzymatic, 61:188-193.
- Hou, C. T. y T. M. Johnston (1992). Screening of lipase activities with cultures from the agricultural research service culture collection. JAAOCS, 69(11), 1088-1097.
- Kantak, J. B., A. V. Badage, S. A Mahajan, S. P. Pawar, Y. S. shouche, A. A. Prabhune (2011). Isolation, identification and optimization of a new extracellular lipase producing strain of *Rhizopus* sp., Applied Biochemistry and Biotechnology, 164, 969-978.
- Katz, L., C. Marcin, L. Zitano, J. King, K. Price, N. Grinberg, M. Bhupathy, J. McNamara, J. Bergan, R. Greasham y M. Chartrain (1993). Screening and selection of a microbial lipase for the stereospecific hydrolysis of Velukast. Journal of Industrial Microbiology, 11, 89-94.
- Lima V. M.G., N. Krieger, M. I. M. Sarquis, D. A. Mitchell, L. P. Ramos y J. D. Fontana (2003). Effect of nitrogen and carbon sources on lipase production by *Penicillium aurantiogriseum*. Food Technology and Biotechnology, 41(2), 105-110.
- Lowry, R. R. y I. J. Tinsley (1976). Rapid colorimetric determination of free fatty acids. Journal of the American Oil Chemists' Society., 53, 470-473.

- Lowry, O. H., N.J. Rosenbrough, A. L. Farr y R. J. Randall (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
- Messias, J. M., B. Z da Costa, V. M. G. de Lima, R. F. H. Dekker, M. I. Rezende, N. Krieger y A. M. Barbosa (2009). Screening *Botryosphaeria* species for lipases: Production of lipase *Botryosphaeria ribis* Ec-01 grown on soybean oil and other carbon sources. *Enzyme and Microbial Technology*, 45, 26-431.
- Mladenoska, I. y A. Cimitrovski (2001). Lipase production by *Geotrichum candidum*-M2. *Bulletin of the chemists and technologists of Macedonia*, 20(1), 39-43.
- Moataza, M. S., L. K. Amany y M. A. Gadallah (2005). Optimization of extracellular lipase production by *Fusarium oxysporum*. *Arabia Journal of Biotechnology*, 8 (1), 19-28.
- Moral, J., C. Muñoz-Díez, N. González, A. Trapero y T. J. Michailides (2010) Characterization and pathogenicity of *Botryosphaeriaceae* species collected from olive and other hosts in Spain and California. *Ecology and Epidemiology*, 100(2), 1340-1351.
- Naqvi, S. H., M. U. Dahot, A. Ali, M. Y. Khan y M. Rafiq (2011). Production and characterization of extracellular lipase secreted by *Mucor geophyllus*. *African Journal of Biotechnology*, 10(84), 19598-19606.
- Niamke, S., L. P. Kouame, J. P. Kouadio, D. Koffi, B. M. Faulet y S. Dabonne (2005). Effect of some chemicals on the accuracy of protein estimation by the Lowry method. *Biokemistri*, 17 (2): 73-81.
- Papaparaskevas, D., P. Christakopoulos, D. Kekos y B. J. Macris (1992). Optimizing production of extracellular lipase from *Rhodotorula glutinis*. *Biotechnology letters*, 14(5), 397-402.
- Petersen, M. y R. Daniel (2006). Purification and characterization of an extracellular lipase from *Clostridium tetanomorphum*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 22, 431-435.
- Pimentel, M. C. B., N. Krieger, L.C.C. B. Coelho, J. O. Fontana, E. H. M. Melo, W. M. Ledingham, y J.L Lima (1994). Lipase from a Brazilian strain of *Penicillium citrinum*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 49, 59-74.
- Pinsirodom, P y K.L. Parkin (2001). Lipase Assays, in: *Current protocols in food analytical chemistry*, Whitaker, J (ed). John Wiley and Sons, Inc.

- Rapp, P. y S. Backhaus (1992). Formation of extracellular lipases by filamentous fungi, yeasts, and bacteria. *Enzyme Microbiology Technology*, 14, 938-943.
- Rajesh, E. M., R. Arthe, R. Rajendran, C. Balakumar, N. Pradeepa y S. Anitha (2010). Investigation of lipase production by *Trichoderma reesei* and optimization of production parameters. *Electronic Journal of Environmental, agricultural and food chemistry*. 9(7), 1177-1189.
- Rivera-Muñoz, G., J. R. Tinoco-Valencia, S. Sánchez y A. Farrés (1991). Production of microbial lipases in a solid state fermentation system. *Biotechnology letters*, 13(4), 277-280.
- Romero, M. A., M. E. Sánchez y A. Trapero (2005). First report of *Botryotinia ribis* as a branch dieback pathogen of olive trees in Spain. *Plant Disease*, 89 (2), 208-208.
- Shafei, M. S. y R. F. Allam (2010) Production and immobilization of partially purified lipase from *Penicillium chrysogenum*. *Malaysian Journal of Microbiology*, 6(2), 196-202.
- Schmid, R. D y R. Verger (1998). Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications. *Angewandte Chemie*, 3, 1608-1633.
- Singh, A. K. y M. Mukhopadhyay (2012) Overview of fungal lipase: A Review. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166(2), 486-520.
- Supakdamrongkul, P., A. Bhumiratana y C. Wiwat (2010). Characterization of an extracellular lipase from the biocontrol fungus *Nomuraea rileyi* MJ, and its toxicity toward *Spodoptera litura*. *Journal of invertebrate pathology*, 105: 228-235
- Thomson, C. A., P. J. Delaquis y G. Mazza (1999). Detection and measurement of microbial lipase activity: a review. *Critical reviews in food Science and Nutrition*, 39(2), 165-187.
- Torre, M. E., A. Diaz, B. Ruiz, A. Farres, C. Aramburo y S. Sanchez (1996). Physiology of lipase formation in *Penicillium candidum*. *Journal of Industrial Microbiology*, 17, 73- 76.
- Ulker, S., A. Özel , A. Colak, S. Alpay-Karaoglu (2011). Isolation, production, and characterization of an extracellular lipase form *Trichoderma harzianum* isolated from soil. *Turkey Journal Biology*, 35, 543-550.

Xiao, M., S. Mathew y J. P. Obbard (2010). A newly isolated fungal strain used as whole-cell biocatalyst for biodiesel production from palm oil. *Global change biology, Bionergy*, 2, 45-51.

Zheng-Yu, S., J. Huan, L. Rui-Feng, J. Yong-Mei, L. Lin y H. Jian-Zhong (2010). Technical methods to improve yield. Activity and stability in the development of microbial lipases. *Journal of molecular catalysis B: Enzymatic*, 62, 1-8.

IV: DISCUSIÓN, CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS.

I. Discusión y conclusiones generales.

A pesar de que la producción de lipasas ya se realiza de manera comercial, la industria todavía demanda enzimas de nuevas fuentes y con diferentes características bioquímicas, esta demanda impulsa el aislamiento y selección de nuevas cepas de microorganismos. En México, existen pocos trabajos enfocados al aislamiento y escrutinio de cepas con capacidad lipolítica. Rivera-Muñoz y colaboradores (1991) reportaron la producción de lipasas en fermentación en estado sólido con cepas fúngicas pertenecientes a la colección de cultivos del instituto de Investigaciones Biomédicas; en ese trabajo la máxima actividad reportada fue una cepa de *Penicillium candidum* con 36.5 U/mL. En el presente trabajo se obtuvo mayor actividad de lipasas en 4 de los hongos estudiados. En un estudio más reciente Córdova y colaboradores (2003) aislaron hongos termofílicos y termotolerantes de residuos de coco y suelos del estado de Guerrero; sin embargo en ese trabajo solo se realizó un análisis semi- cualitativo de las lipasas. Un estudio similar fue realizado por Sandoval y colaboradores (2009), quienes reportaron el escrutinio de 30 cepas de levaduras y hongos provenientes de la colección del CIATEJ (Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco). En ese trabajo seleccionaron una cepa de *Yarrowia lipolytica* debido a su alta actividad extracelular de lipasa. Recientemente Cruz y colaboradores (2012) se enfocaron a la búsqueda de diferentes enzimas hidrolíticas en hongos termotolerantes aislados en la Huasteca Hidalguense. Se detectó actividad extracelular de lipasas en 49 hongos de los 100 aislados. Sin embargo en ese trabajo solo se realizó un análisis semi-cuantitativo midiendo en medio sólido el índice de potencia de la enzima, sin llegar a cuantificar la actividad específica.

Aún existen una gran variedad de cepas fúngicas que no han sido exploradas para la producción de lipasas por lo que pudieran identificarse nuevas cepas que resultaran en organismos altamente productores. En el presente trabajo se realizó el establecimiento de las metodologías para la detección de la actividad de lipasas y la bioprospección en dos colecciones de hongos aislados de distintas fuentes. Se siguió la estrategia propuesta por Colen y colaboradores (2006) de realizar la bioprospección en dos fases, la primera basada en la detección cualitativa sobre medio sólido ("escrutinio en placa") y la segunda cuantificando la actividad enzimática de las cepas en una fermentación en fase líquida.

Para el escrutinio en placa de lipasas se han descrito distintas metodologías, la mayoría de ellas basadas en la adición de sustratos hidrolizables por la enzima y la visualización

de halos de degradación o cambios en la coloración del medio (Griebeler *et al.*, 2011; Sorokin *et al.*, 2008; Kwon y Rhee, 1989; Samad *et al.*, 1989). Sin embargo muchos de los sustratos usados (surfactantes y tributirina) son hidrolizados también por esterases (Griebeler *et al.*, 2011), enzimas que catalizan la hidrólisis de ésteres de ácidos carboxílicos de cadena corta (Kim *et al.*, 2007). Por lo tanto estos sustratos pueden no conducir a la correcta detección de las lipasas. Kouker y Jaeger (1987) desarrollaron una metodología que utiliza aceite de olivo como sustrato, al cual se le adiciona Rodamina B, fluoróforo que al interaccionar con los ácidos grasos liberados por la enzima forman un complejo que emite fluorescencia cuando se expone a 350 nm. Este método favorece la detección de lipasas porque las esterases tienden a trabajar con ácidos grasos menores de seis carbonos (Bornscheuer, 2002) y el aceite de oliva está compuesto en su mayoría por ácidos grasos de 18 y 16 carbonos. En el presente trabajo el escrutinio se realizó empleando esta metodología Contrario a lo que inicialmente se esperaba. Se observó que solo la cepa Se02 presentó un pequeño halo alrededor del micelio fúngico; este hongo tuvo un crecimiento compacto. En las demás cepas se observó la fluorescencia asociada al micelio. Observaciones similares de asociación de la fluorescencia al micelio se han reportado en géneros fúngicos considerados productores de lipasas. Savitha y colaboradores (2007) reportaron el aislamiento de una cepa de *Mucor* sp. de suelos, cuya fluorescencia en el medio Rodamina B-agar estuvo asociada al micelio; cuando este hongo se cultivó en medio líquido se cuantificó una actividad extracelular de 12.1 U/mL, confirmando que si secreta lipasa a pesar de no observarse halo sobre el medio sólido. Hala y colaboradores (2010) reportaron una cepa de *Fusarium oxysporum* con zonas fluorescentes asociadas al micelio en el escrutinio en placa, y con una actividad enzimática de 17 U/mL en fermentación sumergida. Así mismo Panuthai y colaboradores (2012) describieron el escrutinio de hongos endófitos en la búsqueda de lipasas extracelulares, encontrando una cepa de *Fusarium oxysporum* con una fluorescencia en placa asociada al micelio, similar a la observada en las cepas con alta fluorescencia en este trabajo.

Cabe mencionar que generalmente se menciona la formación de halos fluorescentes alrededor de las colonias (Kantak *et al.*, 2011; Rajeswari *et al.*, 2011; Srimhan *et al.*, 2011; Messias *et al.*, 2009; Vargas *et al.*, 2004). Se piensa que la falta de halos se debe a la presencia de baja actividad de lipasa (Thomson *et al.*, 1999), o debido a la pobre difusión de la enzima en el medio sólido (Colen *et al.*, 2006). Los resultados en el presente trabajo pudieran deberse a la segunda razón, pues la cuantificación de la actividad recuperada de

los cultivos sumergidos descarta que todas las cepas estudiadas tengan baja actividad. La ausencia de halos en el medio sólido puede también deberse al rápido crecimiento de los hongos estudiados, lo que no permite percibir halos, sino que la fluorescencia provocada por la actividad lipolítica se visualiza asociada al área cubierta por el tejido.

En este trabajo se observó que la capacidad de secretar actividad de lipasa no está limitada únicamente a los hongos aislados de residuos ricos en grasa, sino también se encontró en los hongos aislados de fuentes lignocelulósicas, similar a lo reportado previamente por Messias y colaboradores (2009). En resumen, el escrutinio y evaluación permitió identificar cuatro cepas que poseen alta actividad de lipasas, probablemente extracelular. La identificación de cepas lipolíticas entre los hongos aislados de residuos agroindustriales de plátano puede explicarse por la capacidad de los hongos saprófitos de sobreproducir una variedad de enzimas celulolíticas, hemicelulolíticas, proteolíticas, pectinolíticas y lipolíticas para romper la pared celular vegetal y aprovechar los componentes de sus células (Schinke y Germani, 2012). Kathiresan y colaboradores (2011) realizaron un estudio sobre las actividades enzimáticas de los microorganismos encargados de la descomposición de las hojas del manglar y encontraron que los hongos saprófitos juegan un papel esencial en la degradación de las hojas. Los géneros *Trichoderma* y *Thraustochytrid* presentaron las actividades enzimáticas más elevadas para degradar celulosa, almidón, lípidos, proteínas y ligninas. La variabilidad de la batería enzimática les permite a estos hongos adaptarse a ambientes extremos y a distintos nichos ecológicos; géneros como *Aspergillus*, *Fusarium* y *Trichoderma* han sido aislados desde fuentes lignocelulósicas hasta suelos contaminados con aceites (Nwuche y Ogbonna, 2011; Ulker *et al.*, 2011; Rajesh *et al.*, 2010; Gopinath *et al.*, 2005), y han sido reportados como géneros productores de lipasas.

Las cepas con mayor fluorescencia en el presente escrutinio en placa fueron seleccionadas para la cuantificación de la enzima mediante fermentación en fase líquida y estimación espectrofotométrica. Los perfiles de actividad de lipasa respecto al tiempo de cultivo variaron ampliamente entre las cepas. Mientras que las cepas Cnc y Ab02 (ambas seleccionadas de residuos ricos en lípidos) alcanzaron su máxima actividad a las 24 horas de fermentación; la cepa B13-1 (procedente de residuos lignocelulósicos de plátano) obtuvo su máxima actividad a las 192 horas, alcanzando una actividad enzimática máxima similar a la encontrada en las cepas Cnc y Ab02, a pesar de que fueron aislados de fuentes no oleaginosas. En cuanto a la producción de proteasas, las cepas B13-1 y B13-3 presentaron mayor actividad en los últimos días de fermentación; sin embargo en estas

cepas no se observó una disminución de la actividad lipolítica que coincidiera con la presencia de actividad de proteasa en el medio de cultivo. Los valores encontrados de actividad lipolítica en Ab02, Cnc, B13-1 y B13-3 se comparan con algunos de los mejores reportes en la literatura (Barbosa *et al.*, 2011, Naqvi *et al.*, 2011, Shafei y Allam, 2010, Xiao *et al.*, 2010, Messias *et al.*, 2009, Moataza *et al.*, 2005, Hiol *et al.*, 2000 y Gulomova *et al.*, 1996), por lo que tienen un potencial promisorio.

Cabe enfatizar que para el escrutinio en medio sólido se partió de protocolos ampliamente utilizados en la búsqueda de organismos lipolíticos. Sin embargo, una modificación importante introducida en este trabajo fue adaptar el uso del programa Assess 2.0 para la estimación del área fluorescente, lo cual permite estimar la actividad en placa de manera menos arbitraria a la generalmente usada, que se basa en la clasificación visual por cruces o símbolos "+". La generalización de métodos semicuantitativos en el escrutinio sólido puede permitir comparar resultados de diferentes laboratorios, lo cual el día de hoy es muy difícil. Solo son relativamente comparables los resultados de cuantificación de la actividad soluble. La comparación entre laboratorios será posible en la medida que se homogenice el uso del método de cuantificación (espectrofotométrico, por titulación, etc.), sustrato y condiciones de ensayo. Disponer de un método de escrutinio menos arbitrario que el actualmente utilizado en la literatura representa definitivamente un avance, siendo esta una aportación del presente trabajo.

II. Perspectivas

Las cepas seleccionadas con alta actividad de lipasas son potencialmente aplicables en una variedad de usos industriales como la biorremediación de efluentes con alto contenido de lípidos, y en la producción de biodiesel, sustituyendo a los catalizadores químicos usados en su síntesis. Este último es uno de los campos con mayor oportunidad para la aplicación de estas enzimas, debido al creciente interés por la obtención de energías renovables.

Sin embargo, para el uso comercial de estos hongos o de sus enzimas es necesario realizar pruebas de funcionalidad (es decir su capacidad de hidrolizar triglicéridos o de transesterificar), la purificación de las lipasas y la caracterización de sus parámetros bioquímicos (pH y temperatura óptimos, estabilidad a pH y temperatura, tolerancia a disolventes, estereoselectividad y regioselectividad). También es importante realizar la identificación de las cepas, para determinar si son organismos tipo GRASS o son patógenos. Se requiere optimizar los medios de cultivo para conseguir la máxima producción de lipasas con las cepas seleccionadas, comparar con la fermentación sólida para eventualmente explorar los procesos de escalamiento para la producción a nivel industrial.

III. Referencias.

- Barbosa, A. M., J. M. Messias, M. M. Andrade, R. F. H. Dekker y B. Ventakatesagowda (2011). Soybean oil and meal as substrates for lipase production by *Botryosphaeria ribis*, and soybean oil to enhance the production of Botryosphaeran by *Botryosphaeria rhodina*. In: Soybean-Biochemistry, chemistry and physiology. Tzi-Bun, N. (ed). InTech. Pp. 101-118.
- Bornscheuer, U. T. (2002). Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. FEMS Microbiology Reviews 26, 73-81.
- Colen, G., R. Goncalves, T. Moraes-Santos (2006). Isolation and screening of alkaline lipase-producing fungi from Brazilian savanna soil. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 22, 881-885.
- Córdova, J., S Roussos, J. Barratti, J. Numgara y O. Loera (2003). Identification of mexican thermophilic and thermotolerant fungal isolates. Micología Aplicada Internacional, 15(2), 37-44.
- Cruz, M. G., J. M. Rivera-Ríos, A. Téllez-Jurado, A. P. Maqueda-Gálvez, Y. Mercado-Flores y a. Arana-Cuenca (2010). Screening for thermotolerant lignolytic fungi with laccase, lipase, and protease activity isolated in Mexico. Journal of Environmental Management, 95, s256-s259.
- Gopinath, S. C. B., P. Anbu y A. Hilda (2005). Extracellular enzymatic activity profiles in fungi isolated from oil-rich environments. Mycoscience. 46, 119-126.
- Griebeler, N, A. E. Polloni, D. Remonato, F. Arber y R. Vardanega (2009). Isolation and Screening of lipase-producing fungi with hydrolytic activity. Food Bioprocess Technology. 4, 578-586.
- Gulomova, K., E. Ziomek, J. D. Schrag, K. Davranov y M. Cygler (1996). Purification and characterization of a *Penicillium* sp. Lipase which discriminates against diglycerides. Lipids, 31(4), 379-384.
- Hala, M.O. R., A. E. Adel, A. E. Hassaan y A. D. Samed (2010). Production, optimization and partial purification of lipase from *Fusarium oxysporum*. Journal of Applied Sciences in Environmental Sanitation, 5(1): 39-53.
- Hiol, A., M. D. Jonzo, N. Rugani, D. Druet, L. Sarda y L. C. Comeau (2000). Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit. Enzyme and Microbial Technology, 26,

- 421-430 Katak, J. B., A. V. Bagade, S. A. Mahajan, S. P. Pawar, Y. S. Kathiresan, K., K. Saravanakumar, R. Anburaj, V. Gomathe, G. Abirami, S. K. Sahu y S. Anandhan (2011). International journal of advanced biotechnology and research, 2(3), 382-389.
- Kim J. T., S. G. Kang, J. H. Woo, J. H. Lee, B. C. Jeong y S. J. Kim. (2007). Screening and its potential application of lipolytic activity from a marine environment: characterization of a novel esterase from *Yarrowia lypolitica* CL180. Applied Microbiology and Biotechnology, 74, 820-828.
- Kouker. G. y K. E. Jaeger (1987). Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. Applied and Environmental Microbiology. 53 (1), 211-213.
- Kwon, D. Y. y J. S. Rhe (1989). A simple and rapid colorimetric method for determination of free fatty acids for lipase assay. Journal of the American Oil Chemist's Society, 63(1), 89-92.
- Messias, J. M., B. Z da Costa, V. M. G. de Lima, R. F. H. Dekker, M. I. Rezende, N. Krieger y A. M. Barbosa (2009). Screening *Botryosphaeria* species for lipases: Production of lipase *Botryosphaeria ribis* Ec-01 grown on soybean oil and other carbon sources. Enzyme and Microbial Technology, 45 26-431.
- Moataza, M. S., L. K. Amany y M. A. Gadallah (2005). Optimization of extracellular lipase production by *Fusarium oxysporum*. Arabia Journal of Biotechnology, 8 (1), 19-28.
- Naqvi, S. H., M. U. Dahot, A. Ali, M. Y. Khan y M. Rafiq (2011). Production and characterization of extracellular lipase secreted by *Mucor geophilus*. African Journal of Biotechnology, 10(84), 19598-19606.
- Nwuiche, C. O. y J. C. Ogbonna (2011). Isolation of lipase producing fungi from palm oil mil effluent (POME) dump sites at Nsukka. Brazzilian archives of biology and technology, 54(1), 113-116.
- Panuthai, T., P. Sihanonth, J. Piapukiew, S. Sooksai, P. Sangavanich y A. Karnchanatat (2012). An extracellular lipase from the endophytic fungi *Fusarium oxysporum* isolated from the Thai medicinal plant, *Croton oblongifolius* roxb. African Journal of Microbiology Research, 6(11), 2622-2638.
- Rajesh, E. M., R. Arthe, R. Rajendran, C. Balakumar, N. Pradeepa y S. Anitha (2010). Investigation of lipase production by *Trichoderma reesei* and optimization of

- production parameters. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*. 9(7),1177-1189
- Rajeswari, T., M. Palaniswamy, S. Rose, M. Shyni y B. Padmapriya (2011). Biosynthesis of novel alkaline lipase production from *Penicillium chrysogenum* suitable for detergent formulation. *Research journal of pharmaceutical, biological chemical sciences*, 2(3), 128-141.
- Rivera-Muñoz, G., J. R. Tinoco-Valencia, S. Sánchez y A. Farrés (1991). Production of microbial lipases in a solid state fermentation system. *Biotechnology letters*, 13(4), 277-280.
- Samad, M. Y., C. N. A. Razak, A. B. Salleh, W. M. Zin, K. Ampon y M. Basri (1989). A plate assay for primary screening of lipase activity. *Journal of Microbiological Methods*, 9, 51-56.
- Sandoval, G., I. Rivera, L. Casas e I. Sánchez (2009). Biodiesel synthesis from waste lipids catalyzed by immobilized lipases. *Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería y Simposio Internacional de Producción de Alcoholes y Levaduras*.
- Savitha, J. S. Srividya, R. Jagat, P. Payal, S. Priyanki, G. W. Rashmi, K. T. Roshini y Y. M. Shantala. Identification of potential fungal strain(s) for the production of inducible, extracellular and alkalophilic lipase. *African Journal of Biotechnology*, 6(5), 564-568.
- Schinke, C. y J. C. Germani (2012). Screening Brazilian *Macrophomina phaseolina* isolates for alkaline lipase and other extracellular hydrolases. *International Microbiology*, 15, 1-7.
- Shafei, M. S. y R. F. Allam (2010) Production and immobilization of partially purified lipase from *Penicillium chrysogenum*. *Malaysian Journal of Microbiology*, 6(2), 196-202.
- Shouche y a. A. Prabhune (2011). Isolation, identification and optimization of a new extracellular lipase producing strain of *Rhizopus* sp.. *Applied Biochem Biotechnol*, 164, 969-978.
- Srimhan, P., K. Kongnum, S. Taweerodjandakarn y T. Hongpattarakere (2011). Selection of lipase producing yeasts for methanol-tolerant biocatalyst as whole cell application for palm-oil transesterification. *Enzyme and microbial technology*, 48, 293-298.

- Sorokin, D. Y. y B. E. Jones (2009). Improved Method for direct Screening of true lipase-producing microorganisms with particular emphasis on alkaline conditions. *Microbiology*, 78, 125-130.
- Thomson, C. A., P. J. Delaquis y G. Mazza (1999). Detection and measurement of microbial lipase activity: a review. *Critical reviews in food Science and Nutrition*. 39(2), 165-187.
- Ulker, S., A. Özel , A. Colak, S. Alpay-Karaoglu (2011). Isolation, production, and characterization of an extracellular lipase form *Trichoderma harzianum* isolated from soil. *Turkey Journal Biology*, 35: 543-550.
- Vargas, V. A., O. D. Delgado, R. Hatti-Kaul y B. Mattiasson (2004). Lipase-producing microorganisms from a Kenyan alkaline soda lake. *Biotechnology Letters*, 26, 81-86.
- Xiao, M., S. Mathew y J. P. Obbard (2010). A newly isolated fungal strain used as whole-cell biocatalyst for biodiesel production from palm oil. *Global change biology, Bioenergy*, 2, 45-51.

