

4
20j



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS
PROFESIONAL Y DE POSGRADO

"LIPASA: ESTUDIOS SOBRE SU SÍNTESIS EN
Penicillium candidum"

T E S I S

Que para obtener el grado de
MAESTRA EN BIOTECNOLOGIA

P r e s e n t a

MARIA DE LOS ANGELES DIAZ ALTAMIRANO

México, D.F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1992



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Lipasa: Estudios sobre su síntesis en *Penicillium candidum*

RESUMEN

Se desarrollaron cultivos de *Penicillium candidum* en un medio formulado con glucosa (1%), casaminoácidos (1%), sales y vitaminas (Medio D), incubándolos a 25°C y 160 rpm.

Se concentraron muestras de caldo de fermentación de 96 horas de cultivo en ese medio suplementado con 0.2% de aceite de oliva. Los resultados obtenidos a partir de la electroforesis con SDS y su gel replica sugieren que *P. candidum* excreta solamente una lipasa al medio. En otras palabras, se sugiere que *P. candidum* no posee enzimas lipolíticas. El peso molecular de esa lipasa se estimó en 55,000 Daltones.

Bajo las condiciones de trabajo utilizadas, resultó conveniente predecir el inoculo de *P. candidum* (micelio en glicerol al 30%) hasta que llegara a fase exponencial para disminuir el tiempo de fermentación.

Con este preinoculo se probó el efecto de diversos aceites vegetales al 0.2% sobre la producción de lipasa. Los resultados indican que los aceites de girasol y de cártamo ejercieron un efecto positivo sobre la síntesis de la enzima. Este efecto fue cuantitativamente semejante al observado con aceite de oliva. Por el contrario, el efecto ejercido por aceite de soya fue significativamente menor.

Por otra parte, se estableció que la formación de lipasa y su excreción al medio, respondió a la presencia de aceite de oliva en el mismo, pero la cantidad de enzima producida no fue proporcional a la concentración de aceite adicionada en un intervalo de concentración de 0.02 al 2%. Experimentos en los que se adicionó cicloheximida a los cultivos a diferentes tiempos de fermentación, demostraron que se requiere síntesis de proteínas *de novo* para que aparezca enzima en el medio, como respuesta a la presencia del aceite de oliva. Este comportamiento puede ser explicado en términos del fenómeno regulatorio denominado inducción. Fue suficiente con 0.02% de aceite de oliva en el medio para inducir la síntesis de la lipasa.

La trioleína al 0.2% presentó también un efecto positivo sobre la síntesis de lipasa en *P. candidum*. Tal efecto fue de igual magnitud que el ejercido por aceite de oliva. Esto sugiere que la trioleína es el componente del aceite de oliva responsable del fenómeno de inducción. Cabe la posibilidad de que el oleato sea también agente inductor de la enzima, puesto que resultó en el mismo efecto, aunque con menor grado.

Se probó el efecto de diversos sustratos y productos de reacción al 0.2% sobre la producción de lipasa. Triestearina, tripalmitina, estearato, palmitato, caprilato, butirato y glicerol no son agentes inductores de la enzima. Los iones oleato, estearato, palmitato y butirato tampoco ejercieron efecto negativo sobre la síntesis de lipasa en cultivos de P. candidum suplementados con aceite de oliva (0.2%). En medio suplementado con aceite de oliva (0.2%), el tween 80 (0.2%) ejerció una importante acción positiva sobre la concentración de lipasa ecretada.

Se probaron diversas fuentes de carbono, sustituyendo la glucosa del Medio D suplementado con 0.2% de aceite de oliva. El citrato resulto mejor fuente de carbono que la glucosa, ya que en medio suplementado con aceite de oliva permitio el crecimiento del microorganismo y una alta actividad especifica de lipasa. Los cultivos de P. candidum con glicerol, acetato, xilosa o lactosa como fuente de carbono, sufrieron un efecto negativo sobre la síntesis de lipasa. El glicerol a su vez ejercio un efecto positivo sobre el crecimiento.

INDICE GENERAL

Resumen	iv
Indice general	vi
Indice de figuras	xi
Indice de tablas	xiii
1.- INTRODUCCION	1
2.- GENERALIDADES SOBRE LIPASAS ...	3
3.- ANTECEDENTES	8
3.1 Proyecto global.....	8
3.2 Seleccion del modelo biologico.....	8
3.3 La regulacion de la sintesis. Generalidades	9
3.4 Regulacion en <u>Penicillium candidum</u>	11
3.5 Comentarios sobre las posibles isoenzimas extracelulares y la identidad del microorganismo	13
4.- OBJETIVOS	15
5.- ESTRATEGIA	16
6.- MATERIAL Y METODOS	17
6.1 Microorganismo	17
6.2 Produccion de inculo	17
6.3 Condiciones de cultivo	17
6.4 Muestreo	18
6.5 Metodos analiticos	18
6.5.1 CRECIMIENTO	18
6.5.1.1 Secado en el horno de microondas	18
6.5.1.2 Operacion de pesada	18
6.5.2 DETERMINACION DE ACTIVIDAD LIPOLITICA	19

6.5.3 DETERMINACION DE PROTEINA POR EL METODO DE BRADFORD	20
6.5.4 ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA CON DODECIL SULFATO DE SODIO (SDS-PAGE)	21
6.5.4.1 Precipitacion de la enzima	21
6.5.4.2 Preparacion del gel	22
6.5.4.3 Preparacion de las muestras	24
6.5.4.4 Electroforesis	24
6.5.4.5 Tincion con azul de Coomassie	24
6.5.4.6 Calculo de peso molecular	25
6.5.5 IDENTIFICACION DE BANDAS DE LIPASA ACTIVA POR MEDIO DEL GEL REPLICA	25
6.5.5.1 Preparacion del gel de agarosa con sustrato	25
6.5.5.2 Preparacion del gel de poliacrilamida que contiene las proteinas separadas ..	26
6.5.5.3 Sobreposicion de los geles	26
6.6 Analisis estadistico	27
7.- R E S U L T A D O S Y D I S C U S I O N	28
7.1 Presencia de isoenzimas	28
7.2 Fermentaciones	31
7.2.1 EFECTO DE LA EDAD DEL INOCULO SOBRE LA PRODUCCION DE LIPASA	31
7.2.2 EFECTO DE LA PRESENCIA DE ACEITE DE OLIVA Y DE LA CONCENTRACION DEL MISMO EN EL MEDIO DE CULTIVO SOBRE LA PRODUCCION DE LIPASA	33
7.2.3 EFECTO DE DIVERSOS ACEITES VEGETALES SOBRE LA PRODUCCION DE LIPASA	35

7.2.4 CARACTERIZACION DEL EFECTO ESTIMULATORIO	37
7.2.5 DEFINICION DEL METABOLITO RESPONSABLE DEL FENOMENO DE INDUCCION	41
7.2.6 EFECTO DEL TWEEN BU	43
7.2.7 EVALUACION DEL EFECTO DE LA PRESENCIA DE PRODUCTOS DE REACCION EN EL MEDIO DE CULTIVO SOBRE LA PRODUCCION DE LIPASA	45
7.2.8 EFECTO DE LA FUENTE DE CARBONO SOBRE LA PRODUCCION DE LIPASA	47
8.- C O N C L U S I O N E S	52
APENDICE 1: DETERMINACION DE ACTIVIDAD LIPOLITICA	54
Parte 1: Validación del método	55
Parte 2: Dedución de la fórmula	63
APENDICE 2: DETERMINACION DE LAS CONDICIONES DE REACCION PARA DETERMINAR ACTIVIDAD LIPOLITICA POR MEDIO DE UN ENSAYO EN PLACA	67
APENDICE 3: TRATAMIENTO ESTADISTICO DE LOS DATOS EXPERIMENTALES	69
Experimento 7.2.3 EFECTO DE DIVERBOS ACEITES VEGETALES SOBRE LA PRODUCCION DE LIPASA	
Archivo de datos	70
Actividad especifica:	
ANOVA	70
Tabla de medias	71
Comparacion multiple de medias	71
Crecimiento:	
ANOVA	72
Tabla de medias	72
Comparacion multiple de medias	72

**Experimento 7.2.5 DEFINICION DEL METABOLITO RESPONSABLE
DEL FENOMENO DE INDUCCION**

Archivo de datos	74
Actividad especifica:	
ANOVA	74
Tabla de medias	75
Comparacion multiple de medias	75
Crecimiento:	
ANOVA	76
Tabla de medias	76
Comparacion multiple de medias	77

Experimento 7.2.6 EFECTO DEL TWEEN 80

Archivo de datos	78
Actividad especifica:	
ANOVA	78
Tabla de medias	78
Comparacion multiple de medias	79
Crecimiento:	
ANOVA	80
Tabla de medias	80
Comparacion multiple de medias	80

**Experimento 7.2.7 EVALUACION DEL EFECTO DEL LA
PRESENCIA DE PRODUCTOS DE REACCION EN EL MEDIO
DE CULTIVO SOBRE LA PRODUCCION DE LIPASA**

Archivo de datos	82
Actividad especifica:	
ANOVA	82
Tabla de medias	83
Comparacion multiple de medias	83
Crecimiento:	
ANOVA	84
Tabla de medias	84
Comparacion multiple de medias	85

**Experimento 7.2.8 EFECTO DE LA FUENTE DE CARBONO
SOBRE LA PRODUCCION DE LIPASA**

Archivo de datos	86
Actividad especifica:	
ANOVA	86
Tabla de medias	87
Comparacion multiple de medias	87

Crecimiento:	
ANOVA	88
Tabla de medias	88
Comparación múltiple de medias	89

Prueba de Bartlett para determinar homogeneidad de varianza	90
--	----

APENDICE 4: REGISTRO DE DISTRIBUCION DE ACIDOS GRASOS EN

VARIOS ACEITES VEGETALES	91
Aceite de oliva (del fruto de <u>Olea europae</u>)	92
Aceite de cartamo (de la semilla de <u>Cartamus tinctorius</u>	93
Aceite de maiz (de la semilla de <u>Zea mays</u>)	94
Aceite de girasol (de la semilla de <u>Helianthus annuus</u>)	95
Aceite de soya (de la semilla de <u>Soja max</u>)	96

B I B L I O G R A F I A	97
-------------------------------	----

INDICE DE FIGURAS

GENERALIDADES SOBRE LIPASAS	
1.- Especificidad posicional de las lipasas microbianas	3
ANTECEDENTES	
2.- Proporción en el mercado mundial de los diversos tipos de enzimas de aplicación industrial. Comparación de volumen de ventas en 1981 y 1990	6
RESULTADOS Y DISCUSION	
3.- SDS-PAGE. Condiciones no reductoras Gel teñido con azul de Coomassie	29
4.- Regresión lineal utilizada para el cálculo de peso molecular de la lipasa de <u>P. candidum</u>	29
5.- Efecto de la edad del inóculo sobre la producción de lipasa en <u>P. candidum</u>	32
6.- Efecto de la concentración de aceite sobre la producción de lipasa en <u>P. candidum</u>	34
7.- Efecto de la presencia de diversos aceites vegetales sobre la producción de lipasa en <u>P. candidum</u>	36
8.- Efecto de la adición de aceite de oliva (0.2%) e inhibidor de síntesis de proteínas (100 ug/ml) sobre el crecimiento y síntesis de lipasa en <u>P. candidum</u>	38
9.- Efecto de la adición de aceite de oliva (0.2%) e inhibidor de síntesis de proteínas (100 ug/ml) sobre la actividad específica de lipasa en <u>P. candidum</u> y evolución del pH en el medio de fermentación	39
10.- Efecto de la presencia de sustratos o productos de reacción en el medio de cultivo sobre la síntesis de lipasa en <u>P. candidum</u>	42
11.- Efecto de la presencia de tween 80 (0.2%) sobre la concentración de lipasa en cultivos con y sin aceite de oliva (0.2%) en <u>P. candidum</u>	44
12.- Efecto de la presencia de productos de reacción en el medio con aceite de oliva (0.2%) sobre la síntesis de lipasa en <u>P. candidum</u>	46
13.- Efecto de diversas fuentes de carbono sobre la síntesis de lipasa en <u>P. candidum</u>	48
14.- β -Oxidación de ácidos grasos y probable metabolismo simplificado de la xilosa	50

APENDICE 1

16.- Efecto de la agitacion sobre la cinetica de hidrolisis al determinar actividad lipolitica. Registro expresado en unidades de pH	56
17.- Idem. Registro expresado en μmol butirico totales/ml ...	56
18.- Determinacion de velocidad enzimatica (μmol butirico liberados/ml muestra/min)	57
19.- Efecto del volumen de muestra en el sistema de determinacion de actividad lipolitica sobre la respuesta detectada	58
20.- Efecto de la temperatura sobre la actividad de lipasa en <u>Penicillium caseicolaum</u>	59
21.- Proporcion de acido butirico ionizado en el rango de pH de 4 a 6.5	60
22.- Estabilidad de la lipasa de <u>P. candidum</u> al pH	60
23.- Efecto de pH sobre la actividad de lipasa en <u>P. caseicolaum</u> con tributirina y aceite de mantequilla como sustratos	61
25.- Curva de calibracion de acido butirico en amortiguador succinatos 0.02 M pH = 6.0	63
26.- Curva de calibracion para la determinacion de actividad lipolitica, pH inicial variable	65
27.- Curva de calibracion para la determinacion de actividad lipolitica, grafica superficie de respuesta	65
28.- Comportamiento de la pendiente de las curvas de calibracion para determinar actividad lipolitica al variar el pH inicial	66

INDICE DE TABLAS

1.- Microorganismos productores de lipasas	4
2.- Usos de las lipasas reportados en patentes	5
3.- Alimentos que contienen productos lipolizados como saborizantes,.....	7
4.- Composición de ácidos grasos y distribución de triacilglicérols del sustituto de grasa de cocoa producido por interesterificación con lipasa de <u>Mucor miehei</u>	7
5.- Actividad lipolítica y proteolítica en los hongos filamentosos evaluados por Rivera Muñoz <u>et al.</u>	9
6.- Mecanismos regulatorios del metabolismo general	10
7.- Tipos de retroinhibición para la biosíntesis de metabolitos primarios en vías ramificadas	11
8.- Elementos estimulantes o depresores en la producción de lipasas en hongos filamentosos	12
9.- Características de algunas lipasas microbianas	14
10.- Composición del Medio "D"	17

INTRODUCCION

La biotecnología hace posible, a través de la aplicación integral de los conocimientos y técnicas de la bioquímica, microbiología, genética e ingeniería química, el logro de beneficios de tipo tecnológico, a través de las propiedades y capacidades de microorganismos y cultivos celulares (Strauch, 1987).

Actualmente existen múltiples alternativas biotecnológicas relevantes para la producción de enzimas. En todo el mundo, este tipo de compuestos ha adquirido una importancia especial. Para darse una idea de ello, basta comentar que el valor de su producción mundial en 1990 se estima en 1,500 millones de dólares (Cottle, 1987).

Un gran número de microorganismos son capaces de utilizar grasas y aceites como fuente de carbono para su crecimiento. Las enzimas responsables de la hidrólisis de tales lípidos previa a su digestión son las lipasas (glicerol éster hidrolasas, E.C. 3.1.1.3), que catalizan la hidrólisis de triacilglicérols a ácidos grasos libres, mono- y diacilglicérols y glicerol.

Aunque las lipasas pueden ya ser producidas en cultivos microbianos, y sus propiedades han sido estudiadas durante varios años, comparadas con las proteasas y carbohidrasas, las lipasas extracelulares tuvieron muy poca aplicación industrial en el pasado (Macrae, 1983). Sin embargo, actualmente, las lipasas microbianas comerciales se usan en el proceso de elaboración de productos lácteos y otros productos alimenticios, y las lipasas microbianas producidas en el seno de algunos alimentos son importantes para desarrollar su sabor y hacerlos apetitosos.

Las lipasas microbianas se han utilizado en detergentes, productos farmacéuticos, cosméticos, curtido de pieles, producción de ácidos alifáticos, y en el tratamiento de desechos industriales y domésticos (Seitz, 1974). Los fabricantes ofrecen enzimas lipolíticas en forma de polvo o en pasta, libre de otras enzimas (Fueme, 1988), y algunas veces microencapsuladas, para aplicaciones especiales (Seitz, 1974).

Es relevante mencionar que las lipasas no solo hidrolizan triglicéridos: los investigadores, tanto en el sector académico como en el industrial, han encontrado que manipulando las condiciones de reacción, estas enzimas pueden catalizar diversas reacciones potencialmente lucrativas, por ejemplo, síntesis de péptidos, producción de biosurfactantes, interesterificación, transesterificación, síntesis de ésteres y resolución de mezclas racémicas para producir compuestos ópticamente activos (Gillis, 1988).

Por otra parte, es bien sabido que para producir enzimas microbianas de una manera rentable se acude normalmente a algún microorganismo sobreproductor, y el caso de las lipasas no es la excepción. El conocimiento de los mecanismos que regulan la producción de la enzima ayuda a diseñar técnicas que permitan sobreproducirla.

Este es el contexto en el que se ubica nuestro trabajo de investigación: conocer los mecanismos regulatorios con el fin de saber como sobreproducir la enzima, y así ser capaces de diseñar un proceso de producción rentable.

Por lo expresado, esta investigación tiene como objetivo conocer los mecanismos que emplea Penicillium candidum para regular la síntesis de su lipasa.

Los mecanismos por medio de los cuales los microorganismos regulan la síntesis de sus enzimas son muy variados; por ello, en este trabajo nos concretamos a determinar si se excretan isoenzimas al caldo de fermentación, si la enzima es constitutiva o inducible y, por último, el efecto que produce sobre la síntesis de la enzima la presencia de diversas fuentes de carbono en el medio.

Era necesario determinar si el microorganismo de trabajo excreta o no isoenzimas, porque estas tienen normalmente diferentes propiedades y aplicaciones. La determinación se realizó mediante electroforesis utilizando un gel réplica con sustrato para identificar la banda proteínica activa. Los objetivos restantes se alcanzaron mediante la producción de la enzima por fermentación sumergida, con la adición de diversos efectores al medio y posterior análisis de las muestras tomadas periódicamente.

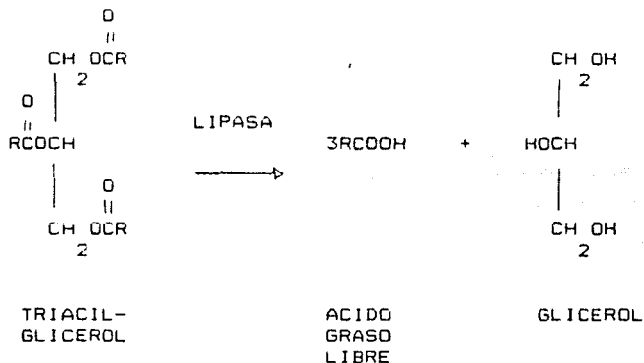
La importancia de estudios fundamentales como este es grande, dado que son el cimiento sobre el que se apoya la investigación aplicada. El presente trabajo contribuye de algún modo a la resolución de un problema concreto: la carencia de información básica, la cual es necesaria para desarrollar proyectos tendientes a producir a escala industrial enzimas que actualmente México importa.

Pese a las limitaciones de tiempo e infraestructura enfrentadas, pretendemos que este trabajo sirva como antecedente y de pie a otros proyectos, de modo que, sumando esfuerzos, a mediano plazo, nuestro país sea autosuficiente en cuanto a la producción de lipasas se refiere.

2.- GENERALIDADES SOBRE LIPASAS

Las lipasas (E.C. 3.1.1.3) [9001-62-1] son carboxilesterasas que hidrolizan glicéridos presentes en emulsión acuosa (Gerhartz, 1990) (figura 1). Esta definición excluye a las enzimas que actúan sobre ésteres solubles en agua (esterasas) y a aquellas que hidrolizan preferencialmente otro tipo de lípidos (acil-hidrolasas). Sin embargo, es también realidad que las lipasas pueden realizar otros tipos de reacciones, algunas de las cuales son de interés industrial.

LIPOLISIS CATALIZADA POR LIPASAS NO ESPECIFICAS:



LIPOLISIS CATALIZADA POR LIPASAS ESPECIFICAS-1,3:

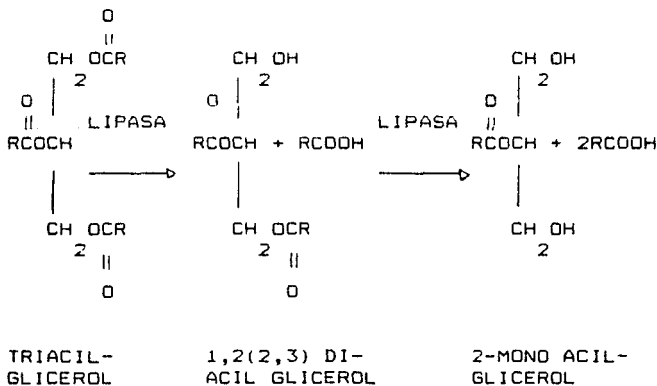


FIGURA 1. Especificidad posicional de las lipasas microbianas (Macrae, 1983).

Inicialmente las enzimas lipolíticas introducidas al mercado mundial eran lipasas pregastricas de ternera o de carnero. El sabor generado por las mismas es el característico de los quesos tipo italiano, debido a la producción de ácidos grasos de cadena corta tales como el butírico, capríco, caprílico y caproico. Es preciso recalcar que el sabor generado depende del perfil de ácidos grasos presentes en el producto, resultado a su vez de la especificidad y forma de corte de la enzima que se emplea. Sin embargo, la producción de enzimas a partir de animales presenta con frecuencia problemas de disponibilidad y de manejo, además de que se requiere de importantes extensiones de terreno y mano de obra para su producción. En este sentido, la utilización de microorganismos ofrece muchos atractivos ya que su obtención puede llevarse a cabo en espacios reducidos y en condiciones controladas. Además presentan la posibilidad de mejorarse en cuanto a sus rendimientos por ser susceptibles de manipulación genética y ambiental (Faith et al., 1971).

La literatura contiene muchos reportes de microorganismos con actividad lipolítica, presentes en el suelo, la leche bronca o el queso, por ejemplo (Sztajer et al., 1988); algunos de ellos se citan en la Tabla 1. Es relevante señalar la variedad de patrones de corte que se pueden encontrar entre las lipasas de origen microbiano. Tal característica incrementa y diversifica las posibilidades de aplicación de las mismas. Por ejemplo, las lipasas de Aspergillus niger o de Penicillium roqueforti pueden utilizarse para modificar el sabor de la grasa butírica e impartir sabor a mantequilla, mientras que las de Mucor miehei pueden usarse para dar sabor a queso. En la preparación de concentrados de sabor a queso Cheddar se utilizan enzimas provenientes de Aspergillus sp., aunque para la elaboración de quesos tipo italiano también se emplean algunas cepas de M. miehei (Moskowitz et al., 1977).

TABLA 1 . Microorganismos productores de lipasas.

BACTERIAS	HONGOS	LEVADURAS
<u>Chromobacter lipolyticum</u>	<u>Aspergillus flavus</u>	<u>Candida cylindracea</u>
<u>Alcaligenes faecalis</u>	<u>A. lipolyticum</u>	<u>C. paralytolitica</u>
<u>Bacillus cereus</u>	<u>A. niger</u>	<u>Pichia sp.</u>
<u>B. mycoides</u>	<u>Fusarium oxysporum</u>	<u>Sporobolomyces sp.</u>
<u>B. subtilis</u>	<u>Geotrichum candidum</u>	<u>Torulopsis sp.</u>
<u>Corynebacterium acnes</u>	<u>Hemicula lanuginosa</u>	<u>Trichosporon sp.</u>
<u>Chromobacterium viscosum</u>	<u>Mucor japonicus</u>	
<u>Leptospira pomona</u>	<u>M. lipolyticus</u>	
<u>Mycobacterium freudenreichii</u>	<u>Penicillium candidum</u>	
<u>M. nacreaceus</u>	<u>P. cyclopium</u>	
<u>M. phlei</u>	<u>P. roqueforti</u>	
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	<u>Rhizopus arrizus</u>	
<u>P. fluorescens</u>	<u>R. delemar</u>	
<u>P. fragii</u>	<u>R. chinensis</u>	
<u>Serratia sp.</u>	<u>R. japonicus</u>	
	<u>Mucor miehei</u>	

Fuente: Sztajer et al. (1988), Orozco, M.E et al. (1989) y Espinoza E. (1990).

El volumen de ventas en el mercado mundial de enzimas en 1985 fue de 600 millones de dolares y, en solo cinco años, ascendio a 1.5 billones, es decir, un 250% (figura 2). A la par, el mercado de las lipasas crece a un ritmo muy alto: pronosticos indicaron que la proporcion de lipasas en el mercado mundial de enzimas subio del 3 al 10%. (Kilara, 1985; Gillis, 1988).

Este fenomeno puede explicarse por varias razones:

1) Estas enzimas son versátiles (Macrae, 1989). Sus diversos usos se ejemplifican en la tabla 2.

2) En la industria alimentaria específicamente, los productos lipolizados utilizados como saborizantes han tenido amplia aceptación, debido en gran parte a su origen natural (tabla 3). (Arnold *et al.*, 1974).

3) El sustituto de grasa de cacao obtenido por interesterificación a partir de aceite de palma y ácido esteárico o triestearina resulta de alta calidad y muy bajo costo (tabla 4). Cabe mencionar que la firma consultora de administración Strategic Technologies International (STI; Mundelein, IL) afirma que en la industria de grasas y aceites, el uso de lipasas para hidrolizar triglicéridos y preparar grasa de cacao encontrará amplio uso en los próximos años, lo que involucrará sumas del orden de 40 millones de dolares en los Estados Unidos. (Para 1989 en aquel país el mercado correspondiente a aplicaciones de enzimas se estima en 266 millones de dolares). (Chemicalweek, 1988).

4) El uso de lipasas en solventes no acuosos abre una perspectiva halagüeña, debido a que se modifica la estabilidad y selectividad de la enzima, a la par que se evitan problemas de solubilidad de algunos sustratos (Macrae, 1989).

Para concluir, es oportuno comentar que en marzo de 1988 se lanzó al mercado un detergente que contiene lipasa producida por un hongo tratado con tecnología de DNA recombinante para producir la enzima (Gillis, 1989).

TABLA 2. Usos de las lipasas reportados en patentes.

-
- * Clarificación de lodos. Alemania, 1979.
 - * Sustitución de grasa de cacao. Japon, 1980.
 - * Remoción de manchas textiles. Alemania, 1982.
 - * Limpieza de lentes de contacto. Australia, 1983.**
 - * Elaboración de saborizante con sabor a queso y potenciador de sabor a partir del suero de la leche. E.U.A., 1983.
 - * Eliminación de caspa y comezon, en tónico para el cabello. Japon, 1983.**
 - * Eliminación de manchas de grasa (detergente). Japon, 1983.
 - * Desgrasado y deodorizado de productos a base de proteína de pescado. URSS, 1984.
 - * Preparación de arroz sin previo lavado. Japon, 1985.
 - * Tratamiento de desórdenes intestinales. Francia, 1985.
 - * Limpieza de instrumental médico previa a la esterilización. URSS, 1985.
 - * Crema limpiadora para el cutis. E.U.A., 1985.
 - * Manufactura de saborizante con sabor a tabaco a partir de hojas de tabaco de mala calidad. Japon, 1986.
-

**= La patente específica que la lipasa es de origen microbiano.

DISTRIBUCION DE ENZIMAS INDUSTRIALES EN EL MERCADO MUNDIAL

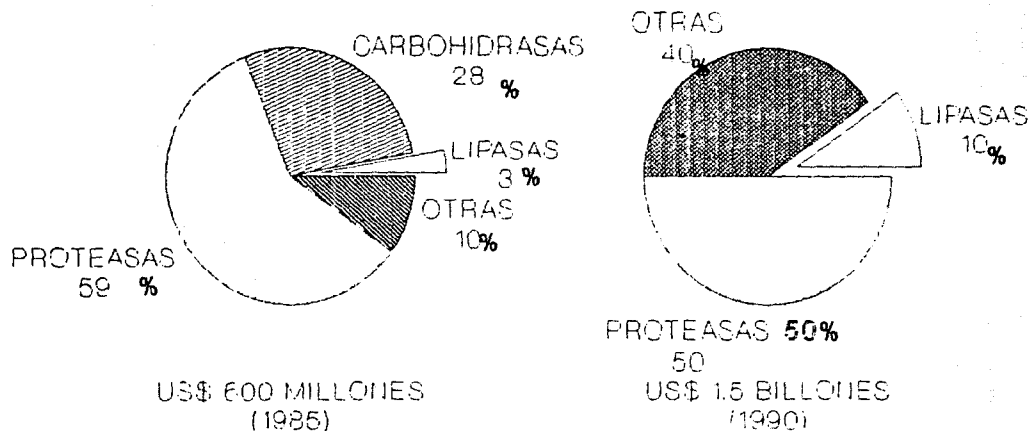


Fig. 2. Proporción en el mercado de los diversos tipos de enzimas de aplicación industrial. Nótese el significativo aumento tanto en el volumen mundial de ventas como en la proporción de lipasas de 1985 a 1990. (Godfrey, 1983; Kilara, 1985; Cottle, 1987).

TABLA 3. Alimentos que contienen productos lipolizados como saborizantes (Arnold, 1974).

Panificación y cereales:

- Mezclas para pasteles y galletas
- Formulas para esponjado
- Mezclas para pasteles de queso
- Mezclas para panque

Confitería:

- Leche con sabor a chocolate
- Centros suaves sabor a crema
- Chiclosos

Lácteos:

- Aderezos sabor a queso
- Sustitutos de crema para café

Productos misceláneos:

- Margarinas
- Aceites para palomitas de maíz
- Salsas
- Botanas
- Sopas

TABLA 4. Composición de ácidos grasos y distribución de triacilglicérols del sustituto de grasa de cacao producido por interesterificación con lipasa de Mucor miehei. (Macrae, 1989).

		Composición de Ácidos Grasos (%)				
		16:0	18:0	18:1	18:2	Otros
Grasa de cacao	Total	26	34	33	3	4
	posiciones 1,3	40	50	5	1	4
	posicion 2	2	3	89	6	trazas
Fracción media de aceite de palma	Total	57	6	32	3	2
	posiciones 1,3	81	9	8	1	1
	posicion 2	10	1	81	8	trazas
Producto inter-esterificado	Total	39	24	31	3	3
	posiciones 1,3	54	36	6	1	3
	posicion 2	9	1	82	8	trazas

3.- ANTECEDENTES

3.1 Proyecto global

El proyecto de grupo del que el presente proyecto forma parte, tiene por objeto la aplicación de enzimas lipolíticas de origen fungal para el desarrollo de productos lácteos lipolizados a partir de grasa butírica, crema y queso, destinados a usarse como saborizantes. En una primera etapa se llevó a cabo la elección de microorganismos con alto potencial de aplicación (Tinoco, 1988). Con el actual trabajo se exploran fenómenos regulatorios que inciden en la producción de la enzima, con el fin de diseñar estrategias tendientes a mejorar genéticamente al microorganismo que la sintetiza.

Paralelamente, otros investigadores se encargan de establecer y optimizar las condiciones de producción de lipasas, con el fin de tener un sistema que produzca cantidades suficientes para otras fases del proyecto, así mismo para fundamentar el posterior escalamiento.

Asimismo, se planea estudiar los parámetros que puedan incidir en la modificación de los diversos sustratos lácteos.

3.2 Selección del modelo biológico

Algunas características deseables para el microorganismo productor son:

- a) Alta actividad lipolítica, para conseguir altos rendimientos y abatir costos.
- b) Baja actividad proteolítica, para prevenir la hidrólisis de la enzima en el caldo, por una parte, y por otra, para evitar la generación de sabores amargos en el producto final por generación de péptidos de bajo peso molecular.
- c) Patrón de liberación de ácidos grasos adecuados, para que el sabor generado al lipolizar el producto sea agradable.

En la tabla 5 se enlistan las actividades enzimáticas mostradas por las cepas probadas. La actividad lipolítica de P. candidum resultó ser la mayor, y su actividad lipolítica relativamente baja (Rivera Muñoz et al, 1991).

En cuanto a las propiedades organolépticas de algún sustrato lácteo modificado enzimáticamente con estas lipasas, cabe decir que la crema de leche de vaca modificada con la enzima de P. candidum ocupó un lugar preferencial en los paneles realizados. Los paneles de descripción de sabor revelaron que el producto sabía a mantequilla o a queso, dependiendo del tiempo de contacto entre la enzima y el sustrato (Tinoco, 1989).

Es claro, pues, el por qué de utilizar a P. candidum como modelo biológico en el presente estudio.

TABLA 5. Actividad lipolítica y proteolítica en los hongos filamentosos evaluados. Los sustratos fueron utilizados en las determinaciones de actividad enzimática fueron tributirina al 8% en amortiguador de succinatos 0.02M pH 6.0 y caseína al 2% en amortiguador de fosfatos 0.2M pH 7.2. Los filtrados enzimáticos se obtuvieron después de 6 días de incubación en un sistema de fermentación semisólida a 29°C. El coeficiente de variación en los ensayos en sistema de fermentación en estado sólido no fue mayor al 4% (Rivera-Muñoz et al., 1991).

MICROORGANISMO	ACTIVIDAD LIPOLITICA (UL/ml)	ACTIVIDAD PROTEOLITICA (U/ml)
<u>Aspergillus niger</u>	2.8	5.5
<u>Geotrichum candidum</u> (1)	1.4	0.0
<u>Geotrichum candidum</u> (2)	1.1	16.0
<u>Mucor miehei</u>	25.1	16.6
<u>Penicillium camembertii</u>	24.6	13.2
<u>Penicillium candidum</u>	36.6	12.6
<u>Penicillium chrysogenum</u>		
UAM 17842	7.4	48.0
<u>Penicillium chrysogenum</u>		
NRRL 1851	14.0	27.5
<u>Penicillium caseicola</u>	14.0	12.7
<u>Penicillium glaucum</u>	8.1	5.5
<u>Penicillium roqueforti</u>		
CNR2 883	5.1	6.6
<u>Penicillium roqueforti</u>	8.0	35.9
<u>Penicillium roqueforti</u> Milano	1.7	32.0
<u>Rhizopus arrhizus</u>	0.6	2.8
<u>Rhizopus delemar</u> CDBB H313	1.7	4.4

3.3 La regulación de la síntesis. Generalidades.

Se sabe que una regulación enzimática apropiada asegura que en un tiempo dado, la célula forme únicamente las enzimas necesarias, en concentraciones adecuadas y que, una vez producidas, se modulen también sus actividades.

En los sistemas microbianos se han caracterizado diversos mecanismos que desempeñan un papel fundamental en la regulación del metabolismo general (tabla 6) (Sanchez y Farres, 1987) pueden clasificarse en dos grupos: aquellos que afectan la concentración de enzimas (inducción, retrorepresión y represión catabólica) y aquellos que afectan la actividad de las mismas (retroinhibición).

Dado que no hay reportado en bibliografía material referente a la regulación de síntesis de lipasas, por ahora nos limitamos a hacer un breve comentario sobre algunos mecanismos regulatorios caracterizados en microorganismos de diversos tipos.

La inducción consiste en el aumento específico de la concentración de una enzima como respuesta a la presencia de una sustancia química determinada (inductor). Generalmente el inductor es un sustrato del sistema enzimático, aunque en algunos casos puede ser el producto de reacción. Cabe mencionar que con frecuencia existen analogos químicos relacionados con el inductor que estimulan también la síntesis de la enzima (inductores gratuitos).

La represión catabólica describe el comportamiento de una célula cuando, teniendo en funcionamiento la maquinaria enzimática para asimilar una fuente de carbono dada, se le proporciona una fuente de carbono adicional, cuya utilización es más fácil. La célula suspende, es decir, reprime la síntesis de las enzimas necesarias para utilizar la fuente de carbono más compleja, y canaliza sus energías hacia la asimilación de la más sencilla.

TABLA 6. Mecanismos regulatorios del metabolismo general (Sanchez y Farrés, 1987).

Activación
Inactivación catabólica
Inducción
Inhibición por producto
Modulación catabólica
Permeabilidad
Regulación por carga energética
Regulación por enzimas
Regulación de vías cruzadas
Regulación de la síntesis de RNA por aminoácidos
Represión catabólica
Represión nitrogenada
Represión por producto
Represión transitoria

La **retrorepresión** puede definirse como la inhibición en la síntesis de una o varias enzimas de una vía metabólica, como respuesta a la presencia del producto final de biosíntesis o de un derivado del mismo (correpresor) en concentraciones importantes.

Retroinhibición. En este mecanismo regulatorio, el producto final de una secuencia bioquímica inhibe la actividad de una de las primeras enzimas involucradas en la misma. Es importante destacar que el inhibidor no requiere parecerse al sustrato en tamaño, carga o forma, y que se une a la enzima en un sitio físico diferente al del sustrato natural. La unión del inhibidor al sitio regulatorio provoca un cambio en la estructura tridimensional de la enzima, lo cual impide que el sustrato pueda combinarse con la misma (efecto alosterico).

Los microorganismos han desarrollado diversas estrategias que les permiten regular eficientemente la formación de metabolitos primarios en vías metabólicas ramificadas (tabla 7). Un caso representativo de este ejemplo está dado por las dos formas moleculares de la sintetasa de heptulose-7-fosfato en Saccharomyces cerevisiae, primer paso en la biosíntesis de los aminoácidos aromáticos. Los aminoácidos tirosina y fenilalanina respectivamente retroinhiben dichas actividades (Sanchez y Farres, 1987).

TABLA 7.- Tipos de retroinhibición para la biosíntesis de metabolitos primarios en vías ramificadas (Sanchez y Farres, 1987).

Acumulativa	Concertada o multivalente
Compensatoria	Por isoenzimas
Cooperativa	Secuencial

3.4.- Regulación en Penicillium candidum

En la bibliografía revisada no se encontró información sobre la regulación de la síntesis de lipasas en este microorganismo a nivel bioquímico ni a nivel molecular. Lo que se encuentra es el resultado de algunos experimentos exploratorios realizados con P. candidum, P. camemberti, P. caseicolum y algunos otros hongos filamentosos.

Por ejemplo, en cuanto a la influencia de factores nutricionales o condiciones de cultivo sobre la producción de lipasa en P. candidum, Kornach et al. (1980) demuestran que la cantidad de enzima producida, así como la proporción lipasa:proteasa puede ser controlada, en gran medida, por el tipo de medio y las condiciones de cultivo. Asimismo, informa que la producción de lipasas es mayor en cultivo sólido que en sumergido.

Por otra parte, Stepaniak et al. (1980) indican que el nivel de producción entre cepa y cepa de P. candidum varía hasta en un orden de magnitud, y que la actividad encontrada en el caldo es significativamente mayor que la localizada en el micelio.

Saad et al. (1990) suplementan el medio con 1% de aceite de maíz para cultivar a P. caseicolum, Sztajer et al. (1988) con 1% de tributirina para Penicillium sp., mientras que Lamberet y Lemoir (1976) cultivan a P. camemberti sin más grasa que la contenida en el extracto de levadura (Solomons, 1969) con que se suplementa el medio.

En la tabla 8 se muestran algunos elementos estimulantes o depresores de la producción de lipasas en algunos hongos filamentosos. Pudiera parecer contradictorio que el aceite de oliva en algunos casos estimula la producción de lipasas, como en el de P. chinensis (Nakashima et al., 1988), mientras que en otros la deprime, como es el de P. roqueforti (Eithenahiller, 1980). Pero es muy normal que no se observe un patrón de comportamiento general.

TABLA 8.- Elementos estimulantes o depresores en la producción de lipasas en hongos filamentosos (Espinosa, 1990).

Microorganismo	Estimulantes	Represores	Referencia
<u>Penicillium roqueforti</u>	Peptona, extracto de levadura	Aceite de maíz y olivo, lactosa, glucosa	Eitenahller <u>et al.</u> 1970
<u>P. candidum</u>	Glucosa, peptona y oxígeno		Kornacki <u>et al.</u> 1980
<u>P. chrysogenum</u>	Glucosa, peptona y oxígeno		Chander <u>et al.</u> 1981
<u>Aspergillus wentii</u>	Glucosa, manitol, harina de soya y peptona	Fructosa, aceites, tributirina, grasa butírica	Chander <u>et al.</u> 1980
<u>A. niger</u>	Sacarosa, nitrato de amonio	Aceites y magnesio	Pal <u>et al.</u> 1978
<u>Geotrichum candidum</u>	Peptona, sales de magnesio y potasio		Arends <u>et al.</u> 1986
<u>Rhizopus nigricans</u>	Glucosa, galactosa y peptona		Chander <u>et al.</u> 1981
<u>R. oligosporus</u>	Tweens, harina de soya	Oxígeno	Nahas 1988
<u>R. chinensis</u>	Acido oleico, aceite de oliva	Glucosa	Nakashima <u>et al.</u> 1988

Los resultados citados son útiles en una medida muy limitada, ya que, si bien indican algunos factores que aumentan o disminuyen la producción, y otros que no lo hacen, se limitan a indicar la especie química o factor ambiental probado y el resultado final, evitando cualquier comentario acerca del mecanismo por el cual el fenómeno detectado se realiza.

3.5 Comentarios sobre las posibles isoenzimas extracelulares y la identidad del microorganismo

Cuando se estudia la regulación de la síntesis de una enzima cualquiera, se debe disponer de una metodología analítica que permita cuantificarla sin interferencias importantes. Por supuesto, se debe tener certeza de que solo se mide la actividad de una enzima a la vez, y así, poder establecer correlaciones válidas entre la cantidad de enzima presente (reflejo de la regulación de la síntesis de la misma) y las condiciones de producción.

El caso del presente proyecto, por tanto, requiere de una metodología analítica con tales cualidades. Así pues, es necesario saber si Penicillium candidum produce varias lipasas -como Rhizopus delemar, que produce tres (Iahoun y Ali, 1986), o Penicillium roqueforti, que produce dos (Menassa y Lambaret, 1982)- o si produce solo una, como Penicillium camemberti (Auberger et al., 1985) y Penicillium caseicola (Lambaret y Lenoir, 1976). Ver tabla 6.

Es oportuno señalar que Samson y colaboradores (1977) abordan el tema de taxonomía de las especies Penicillium procedentes de quesos fermentados, y llegan a la conclusión de que P. caseicola Bainier es un sinónimo de P. camemberti Thom, en base a sus características morfológicas. Argumentan que la delimitación de especies basada únicamente en diferencias en colonia es contable, y remiten a estudios de actividades enzimáticas. Finalmente, recomiendan utilizar el nombre más antiguo: P. camemberti Thom. Saad (1990), quien estudio la lipasa de P. caseicola, menciona a P. candidum como sinónimo en su publicación.

Asimismo, Pitt (1979), en su libro sobre El Genero Penicillium, asegura que hablar de P. camemberti, P. caseicola, P. candidum, P. biforme, P. rogeri, P. album, P. episteinii y de P. paecilomyceforme es hablar del mismo microorganismo, y explica las razones históricas por las que se dio la variedad de nombres.

Pese a esto, en el presente trabajo, se exploró la posible presencia o ausencia de isoenzimas lipolíticas en los caldos de fermentación de P. candidum. Aunado al recurso de la electroforesis discontinua en geles de poliacrilamida, cabe mencionar otro cuyo uso recientemente ha resuelto problemas en el campo de la enzimología: el de la impresión de bandas proteicas sobre un gel de sustrato (Hofelmann et al., 1983; Kouker y Jaeger, 1987). Ambas técnicas fueron empleadas para el análisis de filtrados de P. candidum.

TABLA 9 . - CARACTERISTICAS DE ALGUNAS LIPASAS MICROBIANAS

MICROORGANISMO	NOMENCLATURA	PESO MOLECULAR (DALTONES)	pH OPTIMO	TEMPERATURA OPTIMA °C	REFERENCIA
<i>Aspergillus niger</i>	I	31 000	5-6		Hofelmann <i>et al.</i> , 1985
	II	19 000	5-6		
<i>Rhizopus delemar</i> CBS 327.47	A'	76 000			Tahoun y Ali, 1986
	B'	60 000			
	C'	45 000			
<i>Penicillium roqueforti</i>	A		6.0	40	Menassa y Lamberet 1982
	B		4.5	35	
<i>Rodotorula pilimanae</i> CBS-5804	I	172 800	4.0	45-55	Muderhwa <i>et al.</i> , 1986
	II	21 400	7.0	45-55	
<i>Candida deformans</i> CBS-2071	I	207 000	7.0	40-50	Muderhwa <i>et al.</i> , 1986
<i>Penicillium cyclopium</i>	I		8.0		Okumura <i>et al.</i> , 1980 Isobe <i>et al.</i> , 1982
	II		5.0		
	III	110 000	6.0	40	
<i>Mucor lypoliticus</i>	F ₁	30 000			Muderhwa <i>et al.</i> , 1985
	F ₂	59 000			
	F ₃	200 000			
<i>Rhizopus pilimanae</i>	I	25 000			Muderhwa <i>et al.</i> , 1986
	II	176 000			
<i>Humicola lanuginosa</i> No. 3	A	39 000	7.0	45	Ibrahim <i>et al.</i> , 1987
<i>Penicillium camemberti</i>	A	24 000	9.0-9.5	35	Auberger <i>et al.</i> , 1983
<i>Penicillium caseicola</i>	A	24 000	8.5-9.6	35-40	Lamberet y Jenoit, 1976

Modificado de Rivera Muñoz. Tesis en proceso.

4. O B J E T I V O S

4.1 Objetivo general:

Elucidar algunos mecanismos de regulacion de sintesis de una lipasa producida por P. candidum.

4.2 Objetivos particulares:

1.- Determinar si el microorganismo produce una o varias enzimas lipolíticas que sean activas a pH = 6.0. Si son varias, montar una técnica para determinar actividad a solo una de ellas.

2.- Determinar si la lipasa en cuestion es una enzima constitutiva o inducible.

3.- Si la lipasa es inducible:

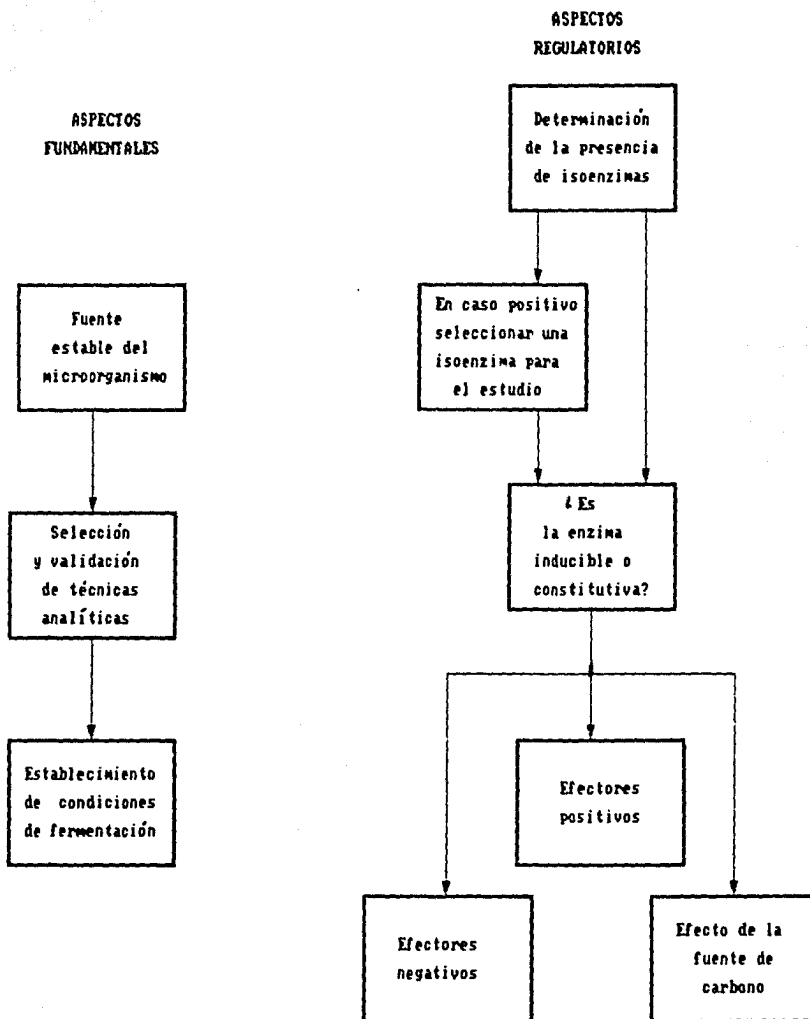
a) Determinar que agentes químicos la inducen.

b) Determinar la concentracion de agente inductor necesaria para que se produzca la enzima.

4.- Determinar si existe algún efecto regulatorio ejercido por diversos productos de reaccion sobre la sintesis de la enzima en estudio. En caso, caracterizar dicho efecto.

5.- Determinar si existe algún efecto regulatorio ejercido por la fuente de carbono sobre la sintesis de la enzima en estudio. En su caso, caracterizar tal efecto.

S.-ESTRATEGIA



6. MATERIAL Y METODOS

6.1.- Microorganismo

Para el desarrollo del presente trabajo se utilizo una cepa de Penicillium candidum procedente de los laboratorios G. Roger (77260 La Ferté sous Jouarre, France). La cepa se conservo en forma de esporas en placas con PDA y en forma de micelio (pellets) en tubos con solución al 30% de glicerol y 0.1% de K HPD pH = 7.0.

2 4

6.2.- Produccion de inoculo

Un mililitro de una suspension de esporas de una densidad optica de 0.6 a 540 nm, leida en un espectrofotometro Bausch & Lomb Spectronic 21, se transfirio a matraces Erlenmeyer de 250 ml con 50 ml de medio "D" de crecimiento (Celerin y Fergus, 1971) suplementado con 1% de casaminoácidos (tabla 10). Se incubo a 29°C con una agitacion de 160 rpm, durante 4 o 5 dias, tiempo en el cual se formaron pellets con un diámetro aproximado de 1 mm (tal tamaño evito posteriores dificultades al muestrear). Se centrifugo, lavó con solución salina isotónica dos veces, y resuspendió en solución de glicerol conforme se indico arriba. Se almaceno a 15°C bajo cero.

6.3.- Condiciones de cultivo

Todas las fermentaciones se realizaron en una incubadora New Brunswick Psychotherm a 29°C, agitando a 160 rpm. El medio utilizado fue el Medio "D" de crecimiento, suplementado, segun se indica en su caso, con 0.2% de aceite de oliva u otro efector de prueba. Este medio fue seleccionado porque, además de ser adecuado para el crecimiento del microorganismo en estudio, carece de fuentes de carbono o nitrogeno complejas, a diferencia de otros metodos reportados para producir lipasas (tabla 9) por lo que pudo ser utilizado como medio basal para un estudio regulatorio. Las condiciones de temperatura, pH y agitacion fueron establecidas para este microorganismo por Rivera Muñoz (tesis en proceso), y el tiempo de fermentacion se estableció en base a los resultados experimentales generados en este trabajo.

TABLA 10. COMPOSICION DEL MEDIO "D"

	g/l
Glucosa	10.0
Casaminoácidos	10.0
Nitrato de potasio	2.0
Fosfato de potasio monoácido	1.0
Sulfato de magnesio	0.5
Elementos traza (ml)	1.0

Solución de elementos traza: sulfato de zinc (439.9 mg/l), nitrato de hierro (II) (723.5 mg/l), sulfato de manganeso (203.0 mg/l).

6.4.- Muestreo

En las fermentaciones en que se deseaba conocer la cinética de producción, se muestrearon 3 ml del cultivo cada 24 horas. La muestra sin filtrar se almacena a 15°C bajo cero.

En las fermentaciones a tiempo fijo, solo se tomaron muestras al principio y final de la fermentación.

Nota:

El error inherente a la operación de muestreo disminuye significativamente al aumentar la edad del cultivo, por ser entonces más fácil el tomar una muestra representativa del total.

El coeficiente de variación para cultivos jóvenes y de edad intermedia (1-4 días, 1-7 mg/ml) es de 13-14%. Para cultivos muy crecidos (7 días, 10 mg/ml), el coeficiente de variación disminuye a 6%.

6.5.- Métodos Analíticos

6.5.1.- CRECIMIENTO

En papeles filtro Whatman 540, previamente secados y pesados, se filtra el caldo de fermentación para separar el micelio. Posteriormente se secan durante 24 horas a 60°C y se pesan. El crecimiento se expresa como mg de biomasa/ml de caldo de fermentación.

6.5.1.1.- Secado en el horno de microondas

Cuando hay poca biomasa (3-6 mg) el secado en el horno de microondas (a intensidad máxima durante 3 minutos) es tan eficiente como el secado en horno convencional (a 60°C/24h), con la ventaja de ser mucho más rápido.

Cuando hay mucha biomasa (15-20 mg), el secado en el horno de microondas es menos efectivo que el secado a 60°C/24h. El error es positivo, del orden de 4 a 6%, debido a que parte de la humedad no se elimina por completo.

Se recomienda, por lo tanto, no usar el secado con microondas como método de rutina para procesar las muestras de una fermentación. Sin embargo, cuando es necesario disponer rápidamente del dato de crecimiento, se puede recurrir a las microondas, teniendo presente el error inherente al método. Posteriormente, si se ve conveniente, para tener el dato exacto, se puede terminar de secar a 60°C/24h.

6.5.1.2 Operación de pesada

La balanza analítica utilizada fue una Sartorius 2432. El coeficiente de variación asociado a la operación per se es ligeramente menor al 2%.

6.5.2 DETERMINACIÓN DE PRODUCCIÓN DE LIPASA

La enzima presente en el caldo de fermentación se pone en contacto con su sustrato (tributirina) emulsificado en un amortiguador a 37°C (Hofelmann *et al.*, 1985). Por acción de la enzima, se libera ácido butírico al medio, lo que ocasiona un cambio perceptible en el pH del mismo. Tal cambio es monitoreado por la lectura periódica del pH durante un minuto, tiempo en el cual el método exhibe linealidad de respuesta.

Reactivos:

Amortiguador de succinatos 0.02M. Pesar 0.2362 g de ácido succínico. Disolver en 80 ml de agua. Ajustar pH a 6.0 con solución concentrada de NaOH. Aforar a 100 ml. Reajustar pH si es necesario.

Tributirina. Grado II (95% de pureza), marca Sigma.

Procedimiento:

En un baño de agua a 37°C colocado sobre una plancha de agitación magnética, colocar un tubo de ensayo con 1.0 ml de tributirina y 12.5 ml de amortiguador. Introducir una barra de agitación magnética de 0.5 cm. Después de un minuto de agitación vigorosa agregar a la emulsión formada 0.5 ml del caldo de fermentación cuya actividad se desea conocer. Hacer medición del pH del sistema. Tomar lectura nuevamente a los 20, 40 y 60 segundos de reacción.

Calculo:

Sustituir los valores de pH inicial y final en la ecuación que se muestra, para saber la actividad de lipasa (LU: número de micromoles de ácido butírico liberados a partir de tributirina durante un minuto por acción de la enzima presente en 1.0 ml de filtrado bajo las condiciones de reacción).

Con los valores intermedios de pH se puede verificar si la enzima se encuentra en velocidad inicial, al graficar o hacer una regresión lineal con los micromoles liberados (calculados con la ecuación) y el tiempo.

$$LU = \frac{(2) (\text{pH final} - \text{pH inicial})}{-3} + 0.0383442$$

(-7.40851 x 10⁻³) (pH inicial)

La producción lipolítica volumétrica se expresa como unidades de lipasa (LU), es decir, la cantidad de producto de reacción (umoles de ácido butírico) liberados por 1 ml de muestra en 1 minuto. La producción lipolítica específica se calcula dividiendo la producción lipolítica volumétrica (LU) entre el crecimiento correspondiente a esa muestra (mg biomasa/ml) y, se puede expresar como umol de ácido butírico/mg biomasa/minuto o, de manera abreviada, como LU/mg.

Notas: (1) Se utilizó un potenciómetro Beckman modelo 3500.

(2) La validación del método y la deducción de la fórmula se muestran en el anexo 1.

6.5.3 DETERMINACION DE PROTEINA POR EL METODO DE BRADFORD

El azul de Coomassie (rojo en solución acuosa ácida) al combinarse con las proteínas presentes en la muestra, forma un complejo de color azul intenso, cuyo máximo de absorbancia se presenta a los 595 nm. La intensidad del color se determina espectrofotométricamente, ya que es proporcional a la concentración de proteína (Bio-Rad, 1989).

Reactivos:

Solución de reactivo de Bradford (comercialmente disponible, Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate). Contiene azul de Coomassie G-250, etanol, ácido fosfórico y agua.

Procedimiento (Bio-Rad, 1989):

Preparar varias disoluciones estándar de proteína que contengan de 1 a 25 $\mu\text{g/ml}$.

Desarrollar una curva estándar cada vez que se lleve a cabo el ensayo.

Colocar 800 μl de los estándares y muestras diluidas adecuadamente en tubos de ensayo limpios y secos.

Agregar 200 μl de reactivo colorante.

Agitar en vortex, evitando la formación excesiva de espuma, o por inversión varias veces.

Incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos o, como máximo, una hora.

Calibrar a 0 de absorbancia el espectrofotómetro con el blanco de la curva de calibración. Si resulta imposible, dada la coloración del reactivo per se, calibre a 0 con agua.

Medir densidad óptica a 595 nm.

Graficar D.O. vs. concentración de los estándares.

Interpolar los valores de concentración de las muestras a partir de los valores de D.O.

La linealidad de la respuesta está demostrada en el rango de 0 a 25 $\mu\text{g/ml}$.

Comentarios:

El método de Bradford es sencillo, rápido, reproducible y confiable. Los resultados obtenidos por este método correlacionan bien con los resultados obtenidos por SDS-PAGE. No se recomienda usar el método de Lowry (1951) para procesar estas muestras dado que algunos componentes del caldo causan una interferencia positiva del 500 al 600%.

6.5.4.- SDS-PAGE (Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio)

Las proteínas migran a través de una red inerte (gel de poliacrilamida) al someterse a un campo eléctrico.

El gel de poliacrilamida se forma por copolimerización de acrilamida y bisacrilamida. La reacción es de polimerización por adición de grupo vinilo y se inicia por un sistema de generación de radicales libres (persulfato de amonio/TEMED).

Por efecto del SDS (un detergente), la relación carga/masa de todas las proteínas presentes es constante, de modo que la migración de cada una de ellas es función de su peso molecular.

La separación es eficiente cuando la diferencia entre los pesos moleculares proteínicos es lo suficientemente grande, y la concentración de acrilamida en el gel es adecuada al intervalo de pesos moleculares que se maneja en la corrida.

Una vez realizada la corrida, el gel se tinte con alguna sustancia que al reaccionar con las proteínas de lugar a un compuesto visible. De este modo, las bandas de proteína se detectan fácilmente y se puede realizar la medición de la migración.

Tomando como punto de referencia la migración en el gel de varias proteínas de peso molecular conocido se determina con exactitud aceptable el peso molecular de las proteínas presentes en la muestra problema (Pharmacia, 1984). Una curva estándar de este tipo se muestra en la figura 5.

6.5.4.1. Precipitación de la enzima

Debido a que el caldo de fermentación en el que se encuentra la enzima contiene grasas y sales en concentración importante, así como muchos metabolitos de diversa naturaleza química, para poder obtener resultados claros en la electroforesis es necesario someterlo a un proceso de purificación parcial.

A la vez que se eliminan sustancias indeseables, al precipitar las proteínas con acetona (Okeke y Gugnani, 1989), la enzima de interés se concentra tanto como sea necesario.

El tratamiento es suave y, dado que se realiza a temperaturas inferiores a los 0°C, la enzima no pierde su capacidad hidrolítica. Esto permite detectar la actividad lipolítica con la ayuda de un gel con sustrato, una vez realizada la separación electroforética.

Procedimiento:

Enfriar acetona en un baño de hielo seco y acetona. Por ejemplo, colocar un matraz Erlenmeyer de 125 ml con aproximadamente 80 ml de acetona dentro de un vaso de precipitados de 600 ml que contenga una mezcla de dióxido de carbono sólido macerado y acetona.

Colocar la muestra de caldo con enzima activa (15 o 20 ml aproximadamente) en otro matraz Erlenmeyer del mismo volumen, y enfriarla en el mismo baño, evitando que se congele.

Llenar una bureta con la acetona helada, y añadir el solvente gota a gota a la muestra, con agitación constante. Mantener frío, sin congelar.

Suspender la adición cuando el volumen de solvente añadido sea por lo menos el triple del volumen de caldo utilizado.

Repartir la suspensión de proteína en tubos para centrifuga y centrifugar a 7000 rpm durante 10 minutos. Decantar.

Resuspender en 50 o 100 μ l de agua.

Determinar proteína por el método de Bradford (Bio-Rad, 1989).

Comentarios:

Para ilustrar con un ejemplo la eficiencia de la concentración, es oportuno comentar que a partir de caldos con concentración de proteína inferior a 0.1 μ g/ μ l se obtienen concentrados con 2 μ g/ μ l. Dicho en otras palabras, el factor de concentración es, al menos, de 20, o hasta de 30 veces.

Con la muestra así concentrada, es fácil detectar la banda de actividad lipolítica en el gel de sustrato.

Sin embargo, cuando se tinte el gel de poliacrilamida con azul de Coomassie, es conveniente realizar un paso más de purificación. Este consiste sencillamente en centrifugar la suspensión proteínica obtenida. Tanto el nuevo precipitado como el sobrenadante exhiben actividad lipolítica, lo que muestra que la separación de la enzima no es completa. Sin embargo, la fracción soluble muestra un patrón de bandas más claro y limpio que el precipitado.

6.5.4.2.- Preparación del gel.

Reactivos:

Todos los reactivos deben ser grado electroforesis. Los utilizados fueron marca Bio-Rad.

Solución A: Acrilamida 30%, bisacrilamida 0.8%. Pesar 49.5 g de acrilamida y 1.32 g. de bisacrilamida. Disolver en agua, completar a 165 ml y filtrar a través de membrana millipore de 0.45 μ m.

Solución B: Amortiguador resolovedor o inferior. Tris 1.5 M, SDS 0.4%. Pesar 18.7 g. Tris(hidroximetil)aminometano. Añadir 4 ml de stock SDS al 10%, disolver en 80 ml de agua. Ajustar pH a 8.8 con HCl concentrado. Completar a 100 ml con agua.

Solución C: Amortiguador concentrador o superior. Tris 1.5 M, SDS 0.4%. Pesar 6.06 g Tris, añadir 4 ml de stock de SDS al 10%, disolver

en 80 ml de agua. Ajustar pH a 6.8. Completar a 100 ml con agua.

Solución D: Amortiguador de corrida. Tris 0.025 M, glicina 0.19 M, 0.1% SDS. Pesar 1.52 g tris, 7.21 g glicina y añadir 5 ml de solución stock de SDS al 10%. Disolver en 450 ml de agua. Ajustar pH a 8.6 con solución de NaOH al 10%. Ajustar volumen a 500 ml. con agua.

Solución E: Amortiguador de muestra. Mezclar 1.25 ml. de amortiguador concentrador con 100 µl de SDS al 10%, 1 ml de glicerol y 400 µl de azul de bromofenol al 0.05%. Si se desea amortiguador de muestra para condiciones reductoras, añadir además 5% (500 µl) de 2-mercapto-etanol. Añadir agua hasta un volumen total de 10 ml.

Solución F: Persulfato de amonio al 10%. Disolver 50 mg en 500 µl de agua. Debe prepararse el día en que se usa.

TEMED: N, N, N', N'-Tetra-metilen-etilen-diamina.

kit de marcadores de bajo peso molecular Bio-Rad.

Procedimiento para preparar el gel:

	gel 12.5%	gel 4%
Solución A	1.66 ml	0.3 ml
Solución B	1.0 ml	
Solución C		0.63 ml
agua	1.33 ml	1.54 ml
TEMED	3.3 µl	2.5 µl
Solución F	12.5 µl	12.5 µl

Montar cámara de electroforesis para hacer el gel.

En un matraz kitasato, mezclar los reactivos en la proporción indicada para el gel inferior (12.5%). El TEMED y el persulfato se añaden en otro momento. Agitar con una barra magnética y a vacío durante 7 minutos, para desgasificar y evitar que el oxígeno disuelto haga lenta la reacción.

Una vez desgasificada la mezcla, añadir el TEMED y el persulfato. Verter en la cámara con pipeta Pasteur. Añadir unas gotas de agua sobre la mezcla para asegurar bordes uniformes. Dejar reposar aproximadamente 10 minutos a temperatura ambiente para que gelifique.

Repetir el procedimiento para el gel superior (4%), teniendo presente que se debe retirar el agua de encima del gel inferior antes de añadir el superior. Una vez añadido, colocar el peine para hacer carriles en los que se colocara la muestra. Dejar gelificar. Retirar el peine, enjuagar con agua destilada y vaciar los carriles con tiras de papel filtro o una jeringa con aguja.

6.5.4.3.- Preparación de las muestras.

En tubos Eppendorf, colocar el volumen de muestra que corresponde a la cantidad de proteína necesaria. Esta se determina en base al número de bandas esperadas, considerando que para detectar con azul de Coomassie una banda bien entocada se requieren de 1 a 2 µg, y para detectarla con plata se requieren 0.5 µg. En el caso de nuestras muestras, se obtienen buenos resultados aplicando entre 20 y 40 µg de proteína/carril. Es conveniente mantener uniforme el contenido de proteína en todos los carriles de una corrida dada.

Añadir volumen igual de amortiguador de muestra, si el volumen de esta es superior a 20 µl, o completar a 20 µl si es menor. Es deseable que en una corrida la cantidad de amortiguador sea semejante en todos los carriles.

En caso de que el amortiguador de corrida contenga 2-mercapto etanol (condiciones reductoras), incubar las muestras a temperatura de ebullición durante 8 minutos.

6.5.4.4.- Electroforesis (Cámara Protean-II, Bio-Rad).

El voltaje que se usa es 100 V mientras corren las muestras por el gel superior y 200 V mientras lo hacen por el inferior.

Para geles de 7 cm de longitud y 0.75 mm de espesor, la corrida tiene una duración aproximada de 1 hora, cuando la concentración de poliacrilamida es la descrita, al voltaje indicado.

6.5.4.5.- Tinción del gel con azul de Coomassie

El metanol desnaturaliza las proteínas y las fija al gel. El azul de Coomassie en medio de ácido forma un complejo intensamente coloreado con las proteínas. Finalmente, los lavados con ácido acético retirarán el colorante no combinado que había penetrado el gel.

Reactivos:

Solución de azul de Coomassie:

Azul de Coomassie R-250	0.5 g (0.25%)
Metanol	91.0 ml (45.5%)
Acido acético	20.0 ml (9.2-10%)
agua, c.b.p.	200.0 ml

Solución para destefir:

Acido acético	50.0 ml (10%)
agua c.b.p.	500.0 ml

Procedimiento:

Sumergir el gel en la solución azul. Incubar sobre plancha rotatoria con agitación lenta durante 10 o 15 minutos a temperatura ambiente.

Destefir el fondo azul (para se vean que las bandas

proteínicas) sumergiendo el gel teñido en la solución ácida. Agitar. Descartar la solución una vez que se sature, y adicionar solución nueva. Si se desea mayor rapidez, calentar aproximadamente a 80°C.

6.5.4.6.- Cálculo de peso molecular

Una vez teñidas las bandas, medir con una regla corriente la distancia total recorrida por el frente en el gel resolvidor. Asimismo, medir la distancia recorrida por cada una de las bandas, tanto del carril de marcadores de peso molecular como de los carriles de muestras problema.

Calcular el cociente distancia recorrida/distancia total para cada banda (Rf).

Construir una gráfica con la información procedente del carril de los marcadores de peso molecular. En el eje de las ordenadas, con escala logarítmica, el peso molecular reportado para los marcadores utilizados; en el de las abscisas, con escala lineal, el Rf. Interpolarse el peso molecular de las proteínas desconocidas en base a su Rf. (Cfr. figura 5).

Si no se desea construir la gráfica descrita, puede hacerse una regresión lineal entre el Rf y el logaritmo del peso molecular reportado, e igualmente interpolarse los valores de peso molecular deseados.

6.5.5.- IDENTIFICACION DE LAS BANDAS DE LIPASA ACTIVA POR MEDIO DEL GEL REPLICA

Ya que se desea saber cuál de las bandas de proteína contenidas en un gel de poliacrilamida corresponde a la lipasa, se prepara un gel de agarosa que contiene el sustrato de la enzima emulsificado en su seno.

Ambos geles se ponen en contacto y se da tiempo para que la enzima actúe.

El aceite de oliva ubicado cerca de la enzima es hidrolizado, por lo que se rompe la emulsión en esa zona del gel de agarosa y cambia su apariencia, oscureciéndose el color (Samad *et al.*, 1989). A la par, los ácidos grasos liberados reaccionan con la rodamina presente en el gel de agarosa, dando lugar a un compuesto que exhibe una clara fluorescencia bajo luz ultravioleta (Kouker and Jaeger, 1987).

Así, al conocer la ubicación de la banda fluorescente en el gel de agarosa, se puede identificar la correspondiente banda de lipasa en el gel de poliacrilamida (Hofelmann *et al.*, 1983).

6.5.5.1.- Preparación del gel de agarosa con sustrato

Ya que bajo las condiciones que se manejan en este trabajo la enzima actúa perceptiblemente en amortiguador de succinatos pH 6.0 sobre aceite de oliva (cfr. sección 6.5.2), se optó por utilizar tales compuestos de forma rutinaria.

La agarosa funde en caliente, por lo que se puede mezclar con la emulsion de rodamina en aceite estabilizada con triton.

Al enfriarse la mezcla, la agarosa gelifica con la rodamina y el aceite emulsificado en su seno.

Reactivos:

Solucion saturada de rodamina. Pesar 0.05g de rodamina 6G (Sigma). Disolver en 80 ml de agua. Ajustar pH a 6.0 con solucion concentrada de NaOH. Aforar a 100 ml. Reajustar el pH si es necesario. Filtrar a traves de papel Whatman 540 para eliminar la rodamina no disuelta.

Acete de oliva. Comestible (Hijos de Ybarra, S.A.).

Triton X-100. (Sigma).

Agarosa. Grado electroforesis (Bio-Rad).

Procedimiento:

Pesar 60 mg de agarosa. Añadir 4 ml de amortiguador. Calentar hasta disolucion completa.

Colocar 4 ml de solucion de rodamina en un tubo de homogenizador de pistilo. Añadir 200 µl de acete de oliva y 40 µl de triton. Homogenizar. Calentar a 40°C.

Mezclar ambas soluciones y agitar en vortex. Verter con una pipeta Pasteur la mezcla entre los cristales de la cámara de electroforesis. (La pipeta Pasteur debe calentarse previamente, para evitar que la mezcla con agarosa gelifique dentro de ella).

Almacenar a 40°C para acelerar la gelificacion y disminuir así la probabilidad de que se rompa la emulsion.

6.5.5.2 Preparación del gel de poliacrilamida que contiene las proteínas separadas

Dado que el gel de poliacrilamida contiene SDS y este detergente disminuye significativamente la actividad de la enzima, es necesario removerlo para recuperar la actividad de la misma. Veeraragavan et al. (1990) reportan que concentraciones inferiores a 10 mM de SDS inhiben completamente la actividad de una de las lipasas de Geotrichum candidum. En nuestro caso (SDS 3.5 mM), tres lavados sucesivos de 40 minutos con solucion de triton X-100 al 1% en amortiguador de succinatos 0.02 M pH 6.0 son suficientes para recuperar la actividad enzimatica y hacerla perceptible sobre el gel replica.

6.5.5.3 Sobreposición de los geles

Una vez eliminado el SDS del gel de poliacrilamida (sin tenir), este se coloca encima del gel de agarosa con sustrato, y se incuba a 37°C durante 24 horas.

Nota: Se recomienda mantener los geles sobrepuestos entre los cristales en que se preparo alguno de los docs, y sellar el "sandwich" de algun modo, por ejemplo con cinta para cubrir, con el fin de evitar que los geles se deshidraten y/o cambien su color o consistencia, lo que impediria la lectura de resultados.

La banda de lipasa se hace visible a simple vista porque se oscurece la zona donde esta ubicada, y tambien bajo luz ultravioleta, porque exhibe fluorescencia. En base al Rf de la banda de lipasa en el gel de sustrato, se puede saber cual de las bandas en el gel teñido con azul de Coomassie corresponde a la enzima, y así calcular su peso molecular. La posibilidad de teñir el gel de poliacrilamida, ya usado para detectar la actividad enzimatica, puede ser explorada.

6.6 Analisis estadistico

El diseño de cada uno de los experimentos es completamente aleatorio. Cada experimento se hizo por lo menos dos veces. Los resultados reportados son promedio de duplicados o de triplicados, segun se indica en el apendice 3. Los datos fueron sometidos a analisis de varianza, prueba de Bartlet para determinar homogeneidad de la misma (Little and Hills, 1978), y prueba de comparacion multiple de medias LSD (Montgomery, 1984), a un nivel de significancia del 95%. Los resultados de tales analisis se muestran con detalle en el apendice 3.

7.- RESULTADOS Y DISCUSION

7.1 Presencia de isoenzimas

Como se explico con algun detalle en la seccion 3.5, debido a que el presente trabajo es un estudio regulatorio, resulta de fundamental importancia el saber si Penicillium candidum excreta al medio una o varias enzimas lipolíticas. Se decidió separar las proteínas del caldo de fermentación por medio de SDS-PAGE. Una vez efectuada la separación, las lipasas presentes fueron identificadas por medio del gel réplica con sustrato (se asumió que se formaron tantas bandas como isoenzimas se encontraban presentes). Paralelamente, un gel idéntico fue tenido con azul de Coomassie, para hacer visible el patrón de bandas completo.

La preparación comercial llamada "Palatase M1000L" (producida por Novo Industries), contiene una lipasa de origen fungal (producida por Mucor miehei, Novo, 1987), por lo que fue utilizada como control positivo.

En cuanto a los caldos de fermentación utilizados, se aplicaron aquellos procedentes de dos condiciones de cultivo: con y sin aceite de oliva en el medio. En consecuencia, el primero presentó actividad lipolítica y el segundo, no.

Tanto en el patrón generado por la lipasa comercial, como en el patrón generado por la muestra del caldo de fermentación con aceite, se puso de manifiesto solamente una banda proteica con actividad lipolítica. El caldo sin aceite no exhibió actividad alguna; su función fue la de control negativo.

La fotografía del gel tenido se muestra en la figura 3, en la que se destacan las bandas correspondientes a las proteínas que exhibieron actividad lipolítica en el gel réplica. La regresión utilizada para el cálculo del peso molecular se muestra en la figura 4.

Como puede observarse, la banda de lipasa de P. candidum corrió cercana a la albúmina sérica bovina (BSA), utilizada como marcador de peso molecular, con un peso de 66000 Daltones. El peso molecular que se calculó para la enzima es, aproximadamente, 65000 Daltones, lo cual difiere del peso reportado por Auberger et al. 1985 respecto a la lipasa de P. camemberti y por Lamberet y Lenoir (1976) respecto a la de P. caseicolum, cuyos pesos moleculares se estimaron en 24000 Daltones (Tabla 6).

Por lo expuesto, se puede pensar que cuando P. candidum crece en las condiciones citadas, excreta solamente una lipasa al medio de cultivo. En consecuencia, en el resto del presente trabajo se asume que se estudia la regulación de una sola enzima.

Dada la evidente diferencia entre los resultados obtenidos con la cepa en estudio y lo reportado en bibliografía, cobra importancia el desarrollo del presente trabajo.

Se recomienda que, como continuación de este estudio, se realicen corridas electroforéticas en condiciones no desnaturizantes, para asegurar que ninguna lipasa sea inactivada irreversiblemente por el SDS.

Asimismo, puede resultar de interés la información procedente de una separación electroforética en condiciones reductoras, puesto que indicara si existen puentes disulfuro en la molécula de la enzima, y si las fracciones obtenidas, en su caso, mantienen la actividad lipolítica. En caso de que las fracciones generadas presenten actividad lipolítica, podría pensarse que la actividad enzimática detectada inicialmente correspondía a un agregado de varias unidades de menor peso molecular, y/o que no hay puentes disulfuro en el sitio activo.

También generaría información valiosa el enfoque isoelectrico de una muestra obtenida por PAGE no desnaturizante preparativa, pues la separación sería más eficiente y, adicionalmente, se determinaría el punto isoelectrico de la enzima.

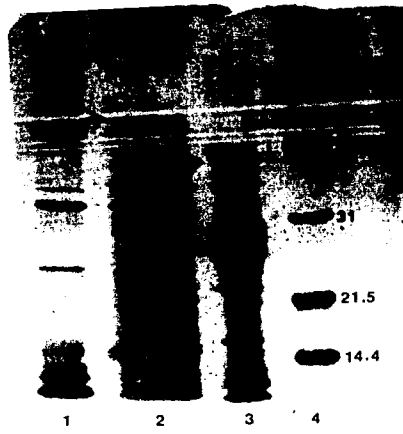


FIGURA 3.- SDS-PAGE. Condiciones no reductoras. Gel teñido con azul de Coomassie. (1) caldo de fermentación concentrado de P. candidum sin actividad lipolítica; (2) caldo de fermentación concentrado de P. candidum con actividad lipolítica; (3) control positivo (comercial); (4) marcadores de peso molecular. Se señala con \blacktriangledown las bandas correspondientes a proteínas con actividad lipolítica.

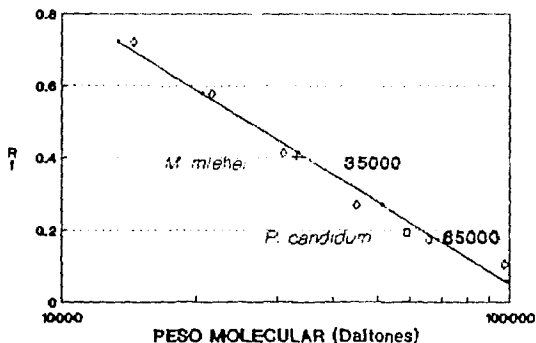


FIGURA 4.- SDS-PAGE. Regresion lineal utilizada para el calculo de peso molecular de la lipasa de P. candidum. La lipasa de Mucor miehe se utilizó como control positivo. Marcadores de peso molecular: fosforilasa B: 97.2 kD; albumina serica bovina: 66 kD; ovalbúmina 45 kD; anhidrasa carbonica: 31 kD; inhibidor de tripsina: 21.5 kD; lisozima: 14.4 kD.

7.2 Fermentaciones

7.2.1 EFECTO DE LA EDAD DEL INOCULO SOBRE LA PRODUCCION DE LIPASA

Al inicio de este trabajo se observó que la duración de la fase lag en las curvas de crecimiento, de un experimento a otro, eran significativamente distintas. Las tendencias exhibidas en las repeticiones eran las mismas, pero había un considerable desfaseamiento en el tiempo.

Se sospechó entonces que el microorganismo (micelio en solución al 30% de glicerol almacenado a 130C bajo cero) estaba siendo afectado, y se pensó en precrecerlo antes de utilizarlo para inocular el experimento. Así, se inocularía el experimento cuando el cultivo del inóculo estuviera en fase exponencial, y reduciría significativamente la fase lag, a la par que probablemente los resultados serían más reproducibles.

Se procedió a hacer un experimento a partir de un inóculo precrecido 0, 24 y 48 h, (condiciones A, B y C respectivamente) inoculando con igual cantidad de biomasa tres series de matraces (una cada día), muestreando cada 24 h durante una semana.

Los resultados se muestran en la figura 5. Como puede observarse, la fase lag de crecimiento en la condición A dura 96 h, la enzima aparece a las 120 h. En cambio, en las condiciones B y C la fase lag dura 24 h y la enzima aparece desde las 48 h de fermentación. La producción volumétrica máxima en los tres casos fue muy semejante, aunque a diferentes tiempos de fermentación.

Los perfiles de B y C son muy similares. Sin embargo, se observa que en C la fase estacionaria se alcanza 24 horas antes que en B y que, por estar la producción asociada al crecimiento, en C se detectan cantidades importantes de enzima en menor tiempo.

En la condición C, es decir, cuando el inóculo se precree 48 h, la actividad volumétrica máxima se alcanza a las 120 horas, lo cual coincide con lo reportado por Kornacki *et al.* (1980), quienes cultivaron a *P. candidum* en fermentación sumergida agitada para estudiar su lipasa. Saad *et al.* (1990), en cambio, cosechan la enzima a los tres días de incubación, pero no mencionan que en ese tiempo la producción sea máxima.

En cuanto al pH del medio de fermentación, cabe mencionar que no hay diferencias relevantes; lo mismo se puede comentar de la producción específica.

En base a estos resultados se estableció que es conveniente precrecer el inóculo hasta que llegue a fase exponencial antes de iniciar la fermentación. Así, la fase lag es mas corta y se obtienen cantidades importantes de enzima rápidamente. A la vez, se facilita lograr reproducibilidad en los tiempos y niveles de producción de lote a lote.

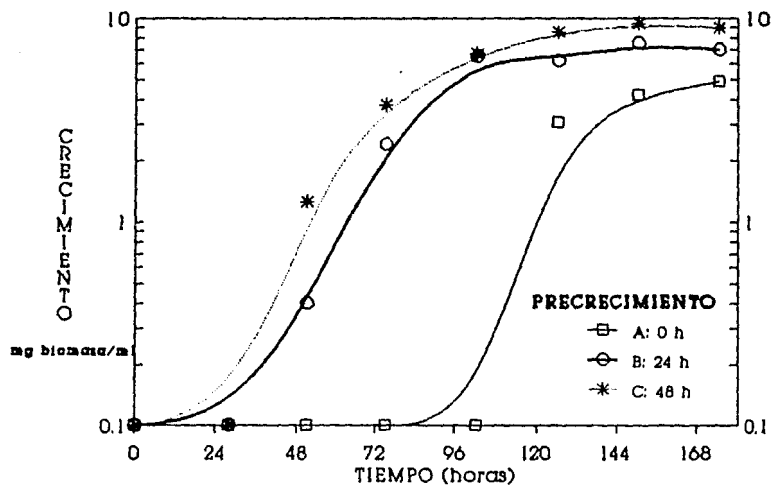


FIGURA 5.- Efecto de la edad del inóculo sobre el crecimiento en cultivos de P. candidum suplementados con 0.2% de aceite de oliva.

7.2.2 EFECTO DE LA PRESENCIA DE ACEITE DE OLIVA Y DE LA CONCENTRACION DEL MISMO EN EL MEDIO DE CULTIVO SOBRE LA PRODUCCION DE LIPASA

Se observó que en los cultivos sin aceite de oliva no siempre se produce la enzima y, además, que cuando esta se produce en tales cultivos, es a tiempos tardíos de fermentación y en baja concentración. Por contraste, cuando el aceite de oliva se incluye en el medio de cultivo, invariablemente la enzima puede ser detectada en el medio, en cantidades importantes, a tiempos tempranos de fermentación, esto es, durante la fase exponencial de crecimiento.

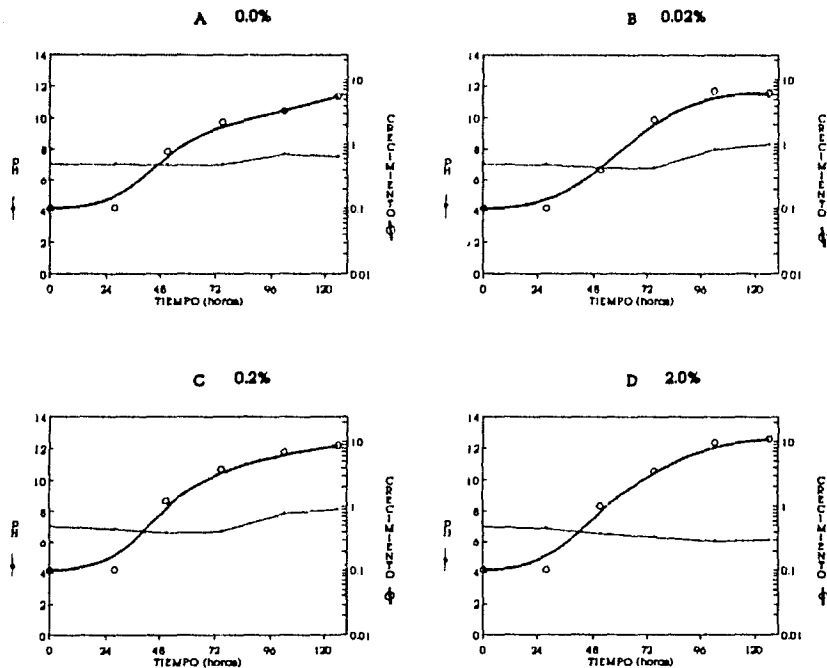
Es frecuente que el aceite de oliva ejerza efecto estimulador sobre la producción de lipasa en hongos (Pal *et al.*, 1978; Akhtar, 1979; Hegedus y Khachatourians, 1988; Jacobsen *et al.*, 1989b); no es raro que se incluya algún componente lipídico en el medio de cultivo para producir lipasas (Bloquel y Veillet-Poncet, 1984; Jacobsen *et al.*, 1989b; Del Río *et al.*, 1990; Petrovick *et al.*, 1990; Saad *et al.*, 1990). Sin embargo, en algunos casos el aceite de oliva no ha estimulado la producción de la enzima (Nahas, 1988), o ha presentado efecto negativo (Bloquel y Veillet-Poncet, 1984).

Con la intención de saber si la cantidad de enzima producida era proporcional a la cantidad de aceite de oliva en el medio, se desarrollaron cultivos con concentraciones variables del mismo, a saber: 0% (A), 0.02% (B), 0.2% (C) y 2.0% (D). Se inoculó con cultivo precrecido y se muestreó cada 24 h.

Como puede observarse en la figura 6, la producción del cultivo sin aceite es significativamente menor que la generada en presencia de aceite de oliva. Sin embargo, entre los matraces con concentraciones variables de aceite, no se observa una correlación directa entre concentración de aceite y concentración máxima de enzima. Este comportamiento es típico en aquellos sistemas enzimáticos que son inducibles.

Por lo que se refiere al crecimiento, en los cultivos con 0.02 y 0.2% de aceite, los niveles alcanzados son prácticamente iguales. En el cultivo con 2% la biomasa producida fue ligeramente superior, lo que hace pensar que el microorganismo utiliza el aceite como fuente de carbono para crecer, cuando este sustrato se encuentra en cantidad suficiente.

En base a estos resultados podría decirse que la presencia de cantidades importantes de lipasa en el medio responde a la presencia de aceite de oliva en el mismo, pero la cantidad de enzima producida no es proporcional a la concentración de aceite en el medio.



PRODUCCION DE LIPASA

CONDICION	TIEMPO DE INICIO DE LA PRODUCCION	PRODUCCION MAXIMA ALCANZADA
A	72 horas	17 LU
B	48 horas	8.0 LU
C	24 horas	13.2 LU
D	24 horas	12.8 LU

FIGURA 6

Efecto de la concentración de aceite de oliva sobre el crecimiento (mg biomasa/ml) y la producción de lipasa (LU/ml) en *Penicillium candidum*. Edad del inóculo: 52 horas.

7.2.3 EFECTO DE OTROS ACEITES VEGETALES SOBRE LA PRODUCCION DE LIPASA

Teniendo en cuenta que en estudios semejantes al presente, se han presentado efectos positivos importantes por la presencia de aceites vegetales distintos al de oliva en el medio (Espinoza, et al., 1990). Se decidió probar el efecto de los aceites de cártamo, maíz, girasol y soya.

Como se muestra en el apéndice 4, la distribución de ácidos grasos en tales aceites es ligeramente distinta a la del de oliva. En el aceite de oliva, el componente mayoritario lo constituyen normalmente triacilgliceroles ricos en el grupo oleato (C18:1). En cambio, en el resto de los aceites vegetales probados, la mayor proporción puede estar dada también por el grupo linoleato (C18:2), no solo por el oleato. Por lo demás, las cantidades y proporciones de los componentes minoritarios son prácticamente iguales.

Se desarrollaron cultivos con cada uno de los cinco aceites citados, en una concentración del 0.2%, utilizando glucosa al 1% como fuente de carbono. Los resultados se muestran en la figura 7.

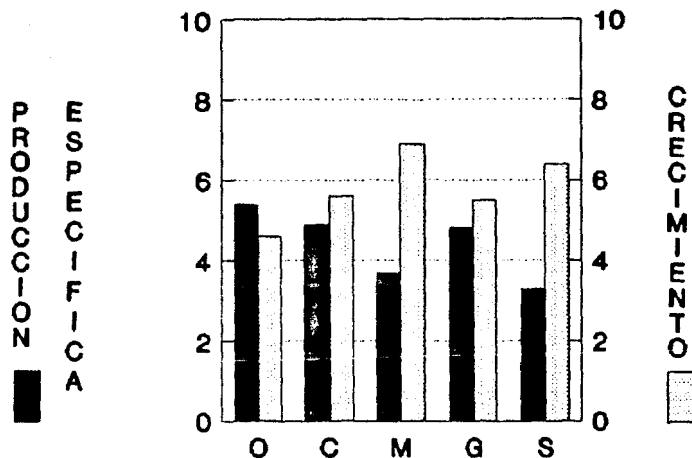
De acuerdo con el análisis estadístico efectuado con los resultados generados (cfr. apéndice 3), se pueden formar tres grupos de cultivos:

- a) Aquellos que exhiben producción lipolítica alta y crecimiento moderado: girasol y cártamo.
- b) Aquellos que exhiben producción específica baja y crecimiento alto: soya.
- c) Aquellos que exhiben producción específica moderada: maíz y oliva

Se realizó el análisis estadístico de la producción específica porque es un reflejo de la producción de cada célula. Sin embargo, como puede observarse, las producciones volumétricas mostradas, no son significativamente diferentes.

En base a los resultados obtenidos se puede establecer que el aceite de soya no resulta buen efector para estimular la síntesis de la enzima, tal vez porque la proporción de los grupos oleato:linoleato en sus triacilgliceroles sea comparativamente diferente a la de los demás aceites probados (cfr. apéndice 4). En estudios posteriores se puede utilizar aceite de girasol o de cártamo como sustituto del aceite de oliva.

Los resultados concuerdan parcialmente con lo reportado por Nahas (1988), quien no encontró diferencias en la producción lipolítica de cultivos de R. oligosporus desarrollados en presencia de aceites de oliva, maíz, soya, algodón o arroz. Por el contrario, Espinoza et al. (1990), al cultivar a R. delemar en presencia de aceite de cártamo o aceite de girasol encontraron producción de lipasa significativamente superior a la obtenida en cultivos desarrollados en presencia de aceite de oliva.



P.V. (LU)	25	27.4	25.4	26.2	20.9
P.E. (LU/mg)	5.4	4.9	3.7	4.8	3.3
CREC. (mg/ml)	4.6	5.6	6.9	5.5	6.4
pH INICIAL	6.92	6.94	6.92	6.92	6.92
pH FINAL	7.9	7.89	7.95	7.91	7.98

FIGURA 7.- Efecto de la presencia de varios aceites vegetales sobre la producción de lipasa en *P. candidum*. P.V.: producción volumétrica; P.E.: producción específica; CREC: crecimiento. O: aceite de oliva; C: aceite de cartamo; M: aceite de maíz; G: aceite de girasol; S: aceite de soya. Concentración de aceite: 0.2%. Tiempo de cosecha 96h.

7.2.4 CARACTERIZACION DEL EFECTO ESTIMULATORIO

Una vez demostrado que el aceite de oliva ejercía un efecto positivo sobre la producción enzimática detectada, se procedió a investigar si el fenómeno observado correspondía a una inducción o activación de la enzima.

Para ello se recurrió al uso de cicloheximida, 3[2(3,5-dimetil-2-oxociclohexil)-2 hidroxietil]] glutarimida, bien conocida por su capacidad para inhibir la síntesis de proteínas en eucariotes.

La estrategia consistió en lo siguiente: a un cultivo sin aceite de oliva se le adicionó este, durante el transcurso de la fermentación, para ver si se presentaba el efecto positivo (D), y a otro, en iguales condiciones, se le adicionó cicloheximida después del aceite (F).

De este modo se vería si es necesaria la síntesis de proteínas de novo para que se presente el efecto positivo que, en tal caso, sería una inducción.

En caso de presentarse el efecto positivo, pese a la presencia de cicloheximida, el fenómeno podría ser explicado por una activación, puesto que una proenzima ya presente se volvería activa como consecuencia de la presencia del aceite, sin ser necesaria la síntesis de proteínas.

Resultaba interesante probar a la par el efecto de la adición de cicloheximida a un cultivo que contenía aceite desde el inicio de la fermentación (E), para ver si, a partir del momento de la adición, la producción lipolítica del caldo seguía incrementándose, pese a que no se sintetizaran más proteínas, (lo que correspondería a una activación), o si, por el contrario, tal producción se mantenía constante porque la enzima no se produjera en adelante, o disminuía al degradarse con el transcurso del tiempo.

Los controles utilizados fueron:

(A) Sin aceite de oliva, para verificar que en ausencia de este componente no se produjera enzima.

(B) Sin aceite, con adición de cicloheximida durante la fermentación, para ver el efecto de la cicloheximida sobre el crecimiento en un cultivo desarrollado sin aceite.

(C) Con aceite desde el inicio, para ver el efecto estimulatorio.

Los resultados generados se muestran en las figuras 8 y 9. De estas, en la figura 8, en la que se grafican producción volumétrica y crecimiento, resulta más claro el fenómeno observado, ya que la producción graficada es independiente del crecimiento alcanzado por el cultivo.

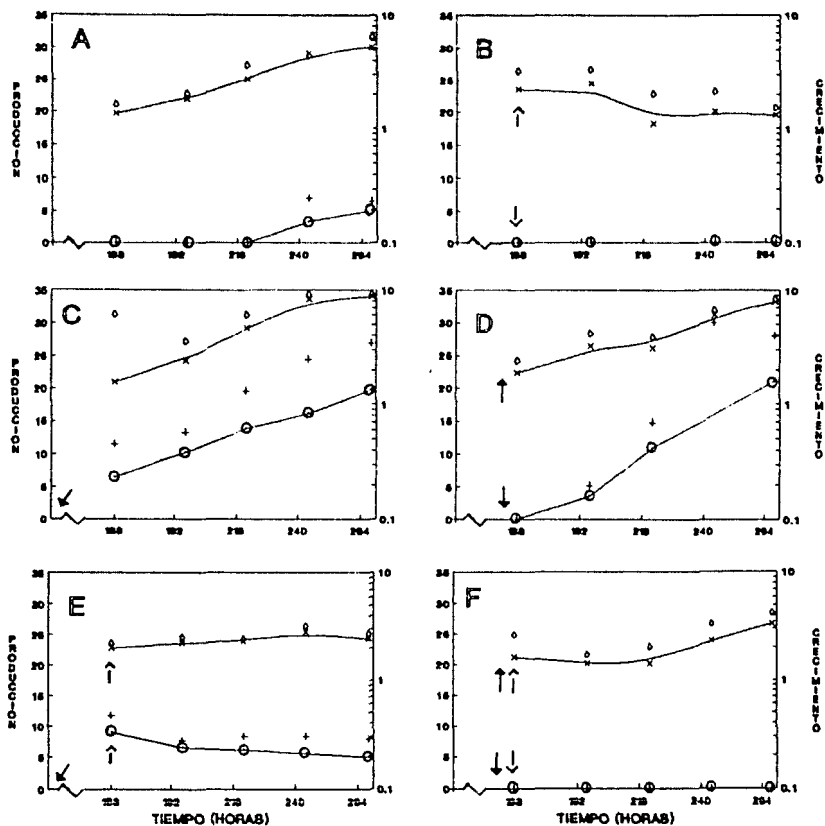


FIGURA 8

Efecto de la adición de aceite de oliva (0.2%) e inhibidor de síntesis de proteínas (100 μ g/ml) sobre el crecimiento y síntesis de lipasa en *Penicillium candidum*.

A: Control sin aceite;

B: Control sin aceite, adición de cicloheximida a las 168 h;

C: Adición de aceite a las 0 horas;

D: Adición de aceite a las 166 horas;

E: Adición de aceite a las 0 horas y cicloheximida a las 166 horas;

F: Adición de aceite a las 166 horas y cicloheximida a las 168 horas.

x Crecimiento (mg/ml)

o Crecimiento + desviación estándar

o Actividad volumétrica (LU)

+ Actividad volumétrica + desviación estándar

→ Adición de aceite de oliva

→ Adición de cicloheximida

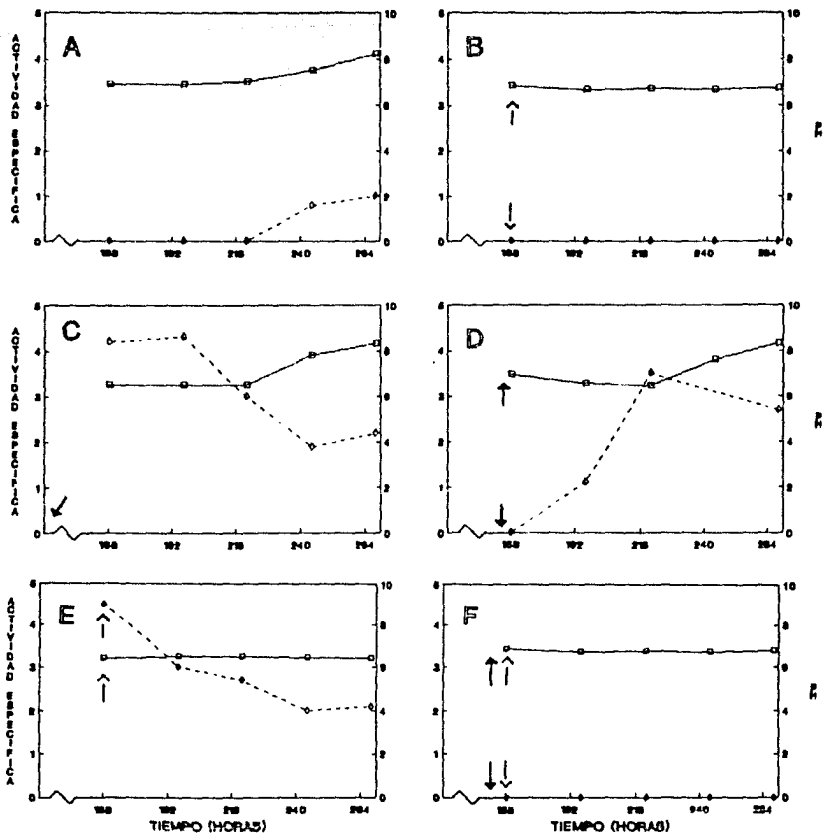


FIGURA 9

Efecto de la adición de aceite de oliva (0.2%) e inhibidor de síntesis de proteínas (100µg/ml) sobre la actividad específica de lipasa en *Penicillium candidum* y evolución del pH en el medio de fermentación.

A Control sin aceite;

B Control sin aceite, adición de cicloheximida a las 168 horas;

C Adición de aceite a las 0 horas;

D Adición de aceite a las 168 horas;

E Adición de aceite a las 0 horas y cicloheximida a las 168 horas;

F Adición de aceite a las 168 horas y cicloheximida a las 168 horas.

○ Actividad específica (LU/mg)

◻ Actividad específica + desviación estándar

□ pH

→ Adición de aceite de oliva

→ Adición de cicloheximida

El comportamiento de los cultivos control se sintetiza así:

- (A) Control sin aceite. Apareció poca enzima en tiempos tardíos de fermentación.
- (B) Control sin aceite con adición de cicloheximida durante la fermentación. El crecimiento se detiene cuando se añade cicloheximida. No se detecta la enzima.
- (C) Control con aceite desde el inicio. Se detectan cantidades crecientes de la enzima.

Los cultivos problema exhibieron la siguiente respuesta:

- (D) Sin aceite al inicio, adición de aceite durante la fermentación: no se detectó enzima mientras que no hubo aceite. 24 horas después de haber adicionado el aceite, se empezaron a detectar cantidades crecientes de la enzima.
- (E) Con aceite desde el inicio, adición de cicloheximida durante la fermentación. La enzima se produce pero, al adicionar el inhibidor de síntesis de proteínas, la producción detectada disminuye ligeramente, y luego permanece constante.
- (F) Sin aceite al inicio, adición de aceite y, dos horas después, adición de cicloheximida. No se detecta producción en el medio.

En la figura 10 se muestra la producción específica con el registro del pH. Esta producción es un claro reflejo de la producción volumétrica detectada, y expresa la producción de cada célula. Al comparar la producción entre una condición de cultivo y otra, conviene tener presente el crecimiento alcanzado por el cultivo en cada caso, pues, las tendencias exhibidas en presencia y ausencia de cicloheximida son significativamente distintas. Sin embargo, este registro no hace otra cosa sino corroborar el fenómeno observado.

En cuanto al registro del pH, es útil para tener la certeza de que los cambios observados no son atribuibles a este parámetro, que muestra en los cultivos problema las mismas tendencias en los cultivos control correspondientes.

En base a los resultados obtenidos, se puede establecer el requerimiento de síntesis de proteínas de novo para que aparezca la enzima en el medio, como respuesta a la presencia del aceite de oliva. Este comportamiento puede ser explicado en términos del fenómeno regulatorio denominado inducción.

7.2.5 DEFINICION DEL METABOLITO RESPONSABLE DEL FENOMENO DE INDUCCION

Una vez que se tuvo evidencia experimental en favor de que la enzima es inducible, y de que 0.02% de aceite es suficiente para inducirla, se procedió a probar otros posibles sustratos de la enzima y algunos productos de reacción, para saber si estas sustancias también ejercían un efecto inductor.

Ya que los compuestos probados en esta ocasión fueron de alta pureza, y no una mezcla de compuestos, como el aceite de oliva, se pretendía encontrar a la sustancia o sustancias que, como componentes del aceite, ejercieran el efecto inductor.

En el apéndice 4 se incluye el rango de distribución de ácidos grasos para el aceite de oliva. El 80% en peso de los ácidos grasos que lo componen corresponde a ácido oleico (18:1), casi el 10% a palmítico (16:0) y una pequeña fracción a estearico (18:0). El resto, (aproximadamente 7%) lo constituye el ácido linoléico (18:2).

Por tanto, se decidió probar la capacidad inductora de trioleína, tripalmitina y triestearina, cultivando al microorganismo en Medio D suplementado con 0.2% de cada compuesto. Se probaron algunos productos de hidrólisis, ya que la enzima puede actuar reversiblemente si se varían las condiciones de reacción.

Los resultados se sintetizan en la figura 10.

El análisis por comparación múltiple de medias, (ver apéndice 3) clasifica los resultados en tres grupos:

a) Los que tienen producción semejante a la del control negativo, es decir, aquellos que prácticamente no presentaron producción lipolítica: caprilato, butirato, glicerol, triestearina, estearato, palmitato y tripalmitina. Estas sustancias no son inductores de la enzima.

b) Los que presentan producción semejante al control positivo (el cual contiene aceite de oliva): la trioleína. Esta sustancia, como componente del aceite de oliva es probablemente responsable del fenómeno de inducción.

c) Los que presentan producción significativamente superior al control negativo, pero inferior al control positivo: oleato. Esta sustancia es también, muy probablemente, inductora de la enzima.

Matute (1992) determinó la afinidad de la lipasa de P. candidum por triacilglicérolos de diferente longitud de cadena. La enzima presentó alta afinidad por los grupos de cadena larga, principalmente por el palmitato. La afinidad por los grupos estearato y oleato resultó ser el 80% de la correspondiente al palmitato. Ya que las diferencias en producción no corresponden a las diferencias en afinidad, se descarta la posibilidad de que el

fenomeno observado sea atribuible a diferencias en la afinidad de la enzima por los sustratos suplementados en el medio de cultivo.

Cabe señalar que se presentaron diferencias significativas entre el crecimiento de los cultivos con caprilato, palmitato y estearato, y el crecimiento de los demás cultivos. Tal efecto no podría atribuirse a diferencias en el pH del medio. Tal vez lo que este ocurriendo con estos compuestos es que haya dificultad en su asimilación o que presenten toxicidad

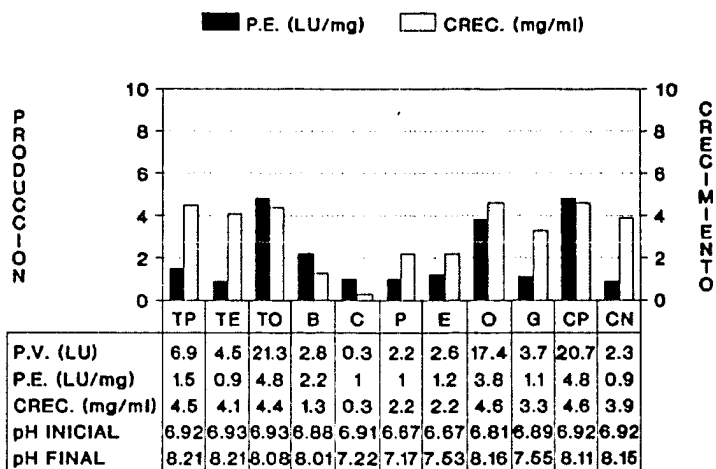


FIGURA 10.- Efecto de la presencia de sustratos o productos de reacción en el medio de cultivo sobre la producción de lipasa en *P. candidum*. Concentración de aceite de oliva en el medio: 0%. P.V.: producción volumétrica; P.E.: producción específica; CREC.: crecimiento. TP: tripalmitina; TE: triestearina; TO: trioleína; B: butirato; C: caprilato; P: palmitato; E: estearato; O: oleato; G: glicerol; CP: control positivo (aceite de oliva); CN: control negativo (medio sin adiciones). Todas las especies probadas se utilizaron al 0.2%. El pH de el medio se ajusto a 7.0 con las especies en solución. Tiempo de fermentación: 96 h.

7.2.6 EFECTO DE LA PRESENCIA DE TWEEN 80 EN EL MEDIO DE CULTIVO SOBRE LA PRODUCCION DE LIPASA

El tween 80 (polioxi-etilen sorbitán monooleato) es un detergente que posee un grupo éster hidrolizable. En numerosas ocasiones se ha reportado que causa efecto positivo sobre la concentración de lipasa en el medio de cultivo. Por ejemplo, Jacobsen et al (1989a) encontraron que esta sustancia causó un aumento de 600% en la concentración de lipasa extracelular en Geotrichum candidum, en comparación con la del medio basal, que contenía peptona y sales. Asimismo, Espinosa et al. (1990) encontraron un efecto positivo ejercido por el tween 80, en una concentración que va del 0.02 al 2% en Rhizopus delemar. En Rhizopus oligosporus, el tween 80 al 0.5% fue la fuente de carbono que permitió mayor producción de lipasa, comparado con diversos aceites vegetales probados a la misma concentración (Nahas, 1988). En Phanerochatae chrysosporium, el tween 80 al 0.1% causó un efecto positivo en la producción de ligninasa, y se produjo lipasa. En Acremonium strictum, una concentración al 1% del detergente, causó un incremento del 130% en la concentración de lipasa (Okeke y Okolo, 1990). Por el contrario, en el caso de Beauveria bassiana, el tween 80 al 0.4%, presentó efecto inhibitorio (Hegedus y Khachatourians, 1988).

En este trabajo también se probó el efecto del tween 80 sobre la producción de lipasa en P. candidum (figura 11). El tween se adicionó a cultivos con y sin aceite de oliva, desde el inicio de la fermentación. La concentración de ambos en el medio fue 0.2%. Se utilizó como control positivo un cultivo con 0.2% de aceite, y como control negativo un cultivo sin aceite ni tween 80.

Como puede observarse, en el cultivo con tween 80 sin aceite de oliva, la producción específica exhibida es baja, es decir, el efecto del tween 80 per se sobre la producción de enzima no parece ser relevante.

Sin embargo, en el cultivo con aceite, el tween 80 ejerce un claro efecto positivo, de modo que la producción llega casi al 300%, comparada con aquella obtenida en presencia de aceite de oliva.

Esto podría explicarse en términos de modificación de la permeabilidad de la pared celular, ya que las proporciones de lipasa ligada : lipasa excretada se pueden afectar por la presencia de este detergente (Jacobsen et al., 1989a).

En cuanto al crecimiento, solo hay diferencia significativa entre los cultivos con y sin aceite de oliva, pero ello carece de relevancia. Entre ellos y los demás cultivos, el crecimiento es muy similar.

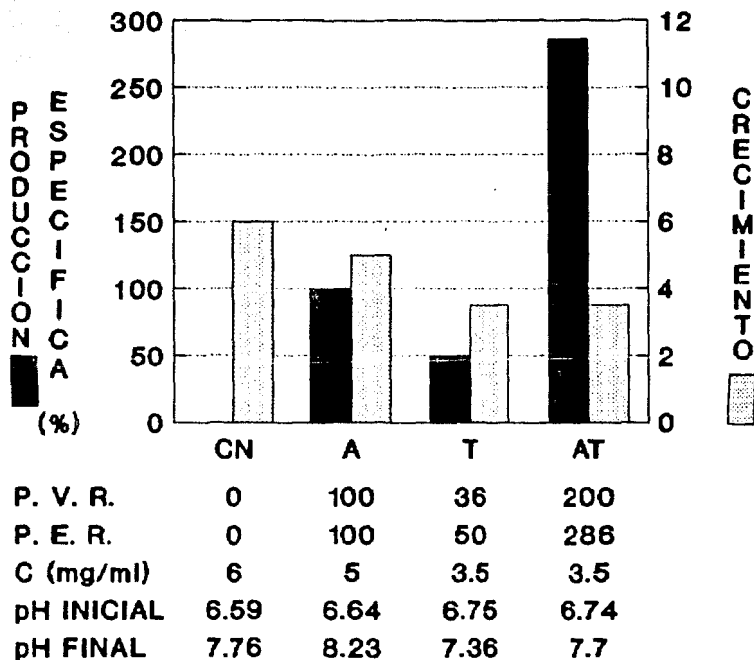


FIGURA 11.- Efecto de la presencia de Tween 80 (0.2%) sobre la producción de lipasa en cultivos con y sin aceite de oliva (0.2%) en *P. candidum*. P.V.R.: Producción volumétrica relativa; P.E.R.: Producción específica relativa; C: crecimiento. CN: Control negativo (sin aceite y sin tween); A: Control con aceite; T: Condición con tween 80; AT: Condición con tween y aceite. Tiempo de cosecha: 72 h.

7.2.7 EVALUACION DEL EFECTO DE LA PRESENCIA DE PRODUCTOS DE REACCION EN EL MEDIO DE CULTIVO SOBRE LA PRODUCCION DE LIPASA.

Por otra parte, buscando algun efecto represor o inhibitorio por parte de los productos de hidrolisis, se cultivo a P. candidum en presencia de aceite de oliva (0.2%) con butirato, caprilato, palmitato, estearato, oleato o glicerol al 0.2%. El control positivo lo constituyó un cultivo con aceite de oliva al 0.2%, sin ninguna especie extra en solución. El control negativo fue un cultivo en el mismo medio, pero sin aceite.

Si no hubiera efecto represor o inhibitorio, ya que la especie inductora se encuentra presente, se esperaría encontrar igual cantidad de enzima en todos los casos. Esto, en caso de que el crecimiento sea semejante al acostumbrado.

Si hubiera efecto estimulativo sinérgico por parte del ácido oléico u alguna otra especie sobre el efecto del aceite, la producción registrada en estos casos sería superior a la del control.

Como puede observarse en la figura 12, no hay diferencia significativa entre la producción del control positivo y de los cultivos con butirato, palmitato, estearato, oleato o glicerol. De ello que se deduce que, en la concentración utilizada, no hay efecto alguno por parte de estas especies.

Los resultados contrastan con algunos reportes encontrados en bibliografía, en los que se establece que la presencia de ácidos grasos en el medio de cultivo, causó una reducción significativa tanto en el crecimiento como en la producción de lipasa en hongos (Hegeudus y Khachatourians, 1988; Okeke y Okolo, 1990). Los primeros probaron los ácidos palmítico, estearico, oléico, y linoléico, en una concentración de 10mM (aproximadamente 0.28%), y los segundos, los mismos ácidos, además del mirístico y el araquídico, en una concentración de 4mM (aproximadamente 0.11%).

Por otra parte, la producción exhibida por el cultivo con caprilato es nuevamente despreciable. No hay diferencia significativa entre ella y la del control negativo. Esto concuerda con lo reportado por Bloquel y Veillet-Poncet (1984), quienes mencionan que el caprilato y el caproato ejercen efecto inhibitorio sobre la síntesis de lipasa en Pseudomonas sp. Sin embargo, ya que el crecimiento fue tan pobre en el caso de P. candidum, no se puede pensar en un efecto de represión, sino más bien en toxicidad.

En cuanto al crecimiento, cabe señalar que el caso del glicerol resulto singular, ya que fue significativamente superior al del resto de los cultivos.

En cuanto al pH del medio de fermentación, se observaron aumentos de 1 a 1.5 unidades, lo cual suele ocurrir como consecuencia de la aparición en el medio de productos del metabolismo del hongo.

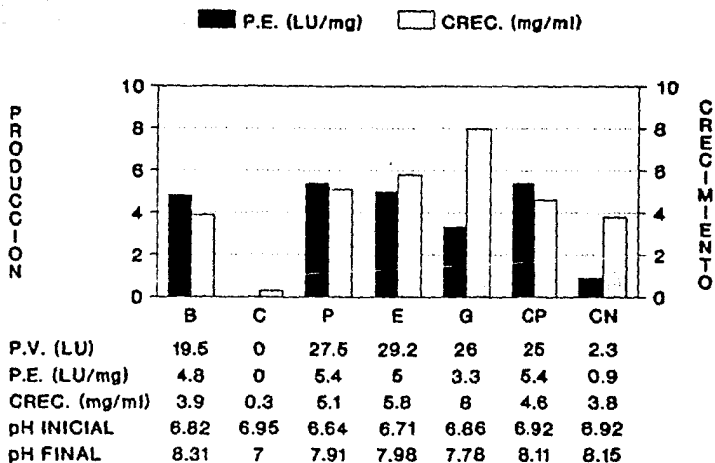


FIGURA 12.- Efecto de la presencia de productos de reacción en el medio con aceite de oliva (0.2%) sobre la síntesis de lipasa en *P. candidum*. P.V.: producción volumétrica. CREC.: crecimiento, P.E.: producción específica. B: butirato; C: caprilato; P: palmitato; E: estearato; G: oleato; G: glicerol; CP: control positivo; CN: control negativo. Concentración inicial de los productos de reacción adicionados: 0.2%. Al control positivo no se le adicionó ningún producto de reacción, pero sí aceite. Al control negativo no se le adicionó ningún producto ni aceite. El pH del medio se ajustó a 7.0 con las especies en solución. Tiempo de cosecha: 96 horas.

7.2.8 EFECTO DE LA FUENTE DE CARBONO

Como se menciona anteriormente, es frecuente que la síntesis de enzimas este regulada por la fuente de carbono (tabla 8). Para explorar este aspecto de la regulación de la síntesis de lipasa en P. candidum, se desarrollo un experimento en el que la glucosa al 1%, utilizada como fuente de carbono en todos los experimentos anteriores reportados en este trabajo, fue sustituida por otros compuestos carbonados, entre ellos carbohidratos de diversa longitud de cadena, sales de acidos organicos y glicerol. La concentración de las fuentes de carbono probadas fue 1%. La fuente de carbono utilizada en los cultivos control fue glucosa. Todos los cultivos, excepto el control negativo, fueron crecidos en presencia de aceite de oliva al 0.2%, para inducir la enzima.

Los resultados se sintetizan en la figura 13. Como puede observarse, se obtuvieron variaciones importantes en la cantidad de enzima presente.

Del analisis estadístico de resultados por comparacion multiple de medias efectuado (cfr. Apendice 3), se pueden clasificar los comportamientos exhibidos en tres grupos. Las condiciones de cultivo correspondientes se enlistan en orden decreciente de producción:

- a) Aquellos que exhiben producción específica alta: citrato y control positivo.
- b) Aquellos que exhiben producción específica intermedia: almidón, maltodextrinas y maltosa.
- c) Aquellos que exhiben producción específica baja: acetato, lactosa, xilosa, control negativo y glicerol.

En lo que se refiere a crecimiento, la agrupacion es, también en orden decreciente:

- a) Aquellos que presentan buen crecimiento: xilosa, glicerol, maltodextrinas.
- b) Aquellos que presentan crecimiento intermedio: lactosa, maltosa, almidón.
- c) Aquellos que presentan crecimiento relativamente bajo: control positivo, control negativo, citrato, acetato.

Como puede verse, el citrato es una buena fuente de carbono para la producción de la enzima, pues su producción específica es equiparable con la del control positivo (glucosa).

Los carbohidratos que generan glucosa a partir de su hidrólisis, es decir, almidón, maltodextrinas y maltosa, permiten una producción específica intermedia. Esto concuerda con lo reportado para Acremonium strictum, que cultivado con almidón o maltosa al 2% como fuente de carbono, produjo aproximadamente el 70% de la

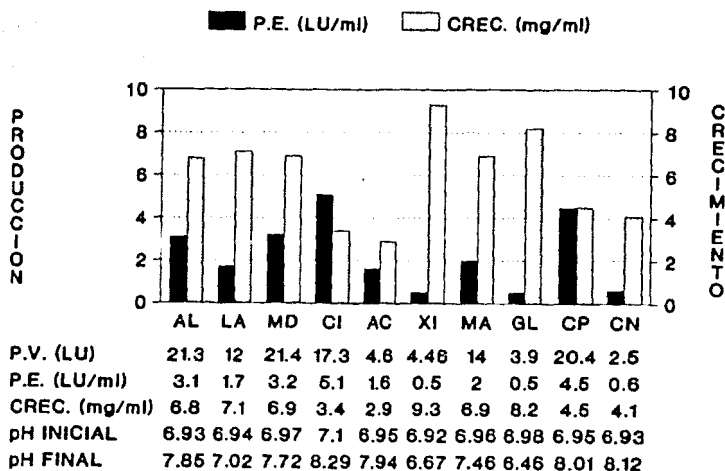


FIGURA 13.- Efecto de diversas fuentes de carbono sobre la síntesis de lipasa en *P. candidum* cultivado en presencia de inductor (aceite de oliva, 0.2%). P.V.: producción volumétrica; P.E.: Producción específica; CREC: crecimiento. AL: almidón; LA: lactosa; MD: maltodextrinas; CI: citrato; AC: acetato; XI: xilosa; MA: maltosa; GL: glicerol; CP: control positivo (glucosa, con inductor); CN: control negativo (glucosa, sin inductor). Concentración de la fuente de carbono: 1%. Tiempo de cosecha: 96 h.

producción lipolítica específica (LU/mg) respecto a lo producido utilizando glucosa (Okeke y Okolo, 1990). Puede pensarse que se presenta una deficiencia en amilasa, glucoamilasa, maltasa, etc., o que la baja concentración de glucosa, debida a su liberación gradual, no permite una producción de enzima mayor.

Respecto a los cultivos con producción específica baja, llaman la atención varios puntos:

Efecto del glicerol.

La producción específica exhibida por el cultivo desarrollado con glicerol como fuente de carbono es equiparable a la del control negativo. El efecto negativo sobre la producción de lipasa presentado por el glicerol pudiese ser explicado en términos de represión por producto final, pues este compuesto es uno de los productos de reacción que se obtienen por la acción hidrolítica de las lipasas (Figura 15).

Lo observado concuerda con el comportamiento de Rhizopus delemar, en el que el glicerol ejerció efecto negativo sobre la producción de lipasa detectada (Espinosa E., 1990, comunicación oral).

Por otra parte, los resultados sugieren que el glicerol es una buena fuente de carbono para el microorganismo, pues el crecimiento que alcanzó es muy superior al obtenido en los cultivos desarrollados en las otras condiciones. Podría pensarse que este compuesto presenta un efecto estimulatorio per se sobre el crecimiento en cultivos con aceite, pues en un experimento anterior (cfr. sección 7.2.7), en el que se cultivo al microorganismo en presencia de 1% de glucosa, con 0.2% de aceite de oliva y 0.2% de glicerol, se presentó el mismo efecto sobre el crecimiento.

Efecto de la xilosa

Al igual que el caso del glicerol, el comportamiento de los cultivos desarrollados con xilosa como fuente de carbono se agrupa con aquellos que exhiben baja producción específica y alto crecimiento. Cabe pensar, al menos, en dos posibilidades:

a) La xilosa presenta efecto de represión catabólica sobre la síntesis de lipasa.

b) Se sabe que la vía de las pentosas, por la que se incorpora la xilosa, genera poder reductor en forma de NADPH. Por su parte, la β -oxidación de ácidos grasos también lo hace, aunque en forma de NADH (Figura 15). Por tanto, cabe la posibilidad de que, en presencia de xilosa, el microorganismo no se vea en la necesidad de asimilar los ácidos grasos procedentes de los triglicéridos presentes en el medio de cultivo, y por lo tanto no produzca lipasa. Por tanto se podría hablar de una represión indirecta por xilosa.

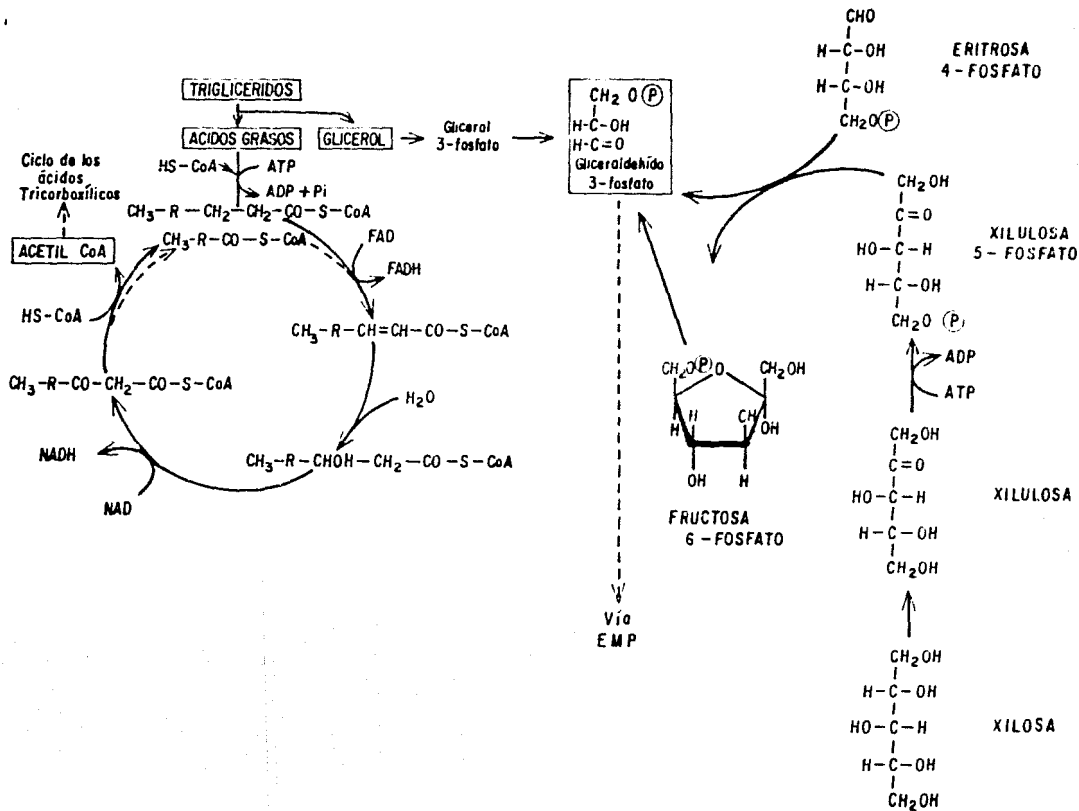


FIGURA 14. β -Oxidación de ácidos grasos y metabolismo simplificado probable de la xilosa (Rose, 1976; Stryer, 1988).

Los resultados contrastan con lo reportado para Rhizopus oligosporus (Nahas, 1988) y Acremonium strictum (Okeke y Okolo, 1970), que a una concentración de 1 y 2% respectivamente, produjeron mayor producción lipolítica con xilosa que con glucosa. Sin embargo, coinciden con lo reportado para Aspergillus niger (Pal et al. 1978), que con xilosa al 1% como fuente de carbono produce solamente trazas de la enzima, mientras que con glucosa la producción lipolítica detectada es significativamente mayor.

Como puede verse en la figura 15, el gliceraldehído-3-fosfato es un intermediario común del metabolismo del glicerol y de la xilosa. Además de pensarse que el efecto lo pueden causar estas fuentes de carbono per se, puede pensarse en la posibilidad de que el gliceraldehído-3-fosfato o algún producto de su metabolismo sea responsable del efecto negativo observado.

Efecto de la lactosa

La producción de lipasa que se presentó en los cultivos con lactosa como fuente de carbono es semejante a la exhibida por el control negativo. Dado que el crecimiento exhibido por este cultivo resultó ser superior al de los controles con glucosa, no puede pensarse que la asimilación de la fuente de carbono haya sido deficiente. Sin embargo, ya que no se dispone de la información concerniente al efecto de la galactosa como fuente de carbono, faltan elementos de juicio para explicar la naturaleza del fenómeno observado. Podría pensarse en algún tipo de represión, pero no se puede concluir al respecto.

Efecto del acetato.

El cultivo en presencia de acetato aparece agrupado con los que poco producen y con los que poco crecen. Esto podría ser explicado en dos escenarios:

a) El acetato es precursor del producto final de degradación de los lípidos (acetil coenzima A), al cual se llegaría con ayuda de la lipasa. Estando el acetato disponible en el medio, el microorganismo no tiene necesidad de sintetizar la enzima. Por tanto, aparentemente hay represión indirecta por acetato.

b) El acetato es una fuente de carbono difícilmente asimilable para P. candidum. Por tanto, no puede crecer bien, ni producir la enzima.

El comportamiento exhibido por P. candidum coincide con el reportado para Aspergillus niger, que presentó escaso crecimiento y baja producción lipolítica al cultivarse con acetato de sodio al 1% como fuente de carbono (Pal et al., 1978).

Cabe comentar que cada uno de los efectos observados puede ser objeto de un estudio particular, para esclarecer sin lugar a dudas la naturaleza del fenómeno que se presenta.

CONCLUSIONES

1.- Los resultados obtenidos a partir de la electroforesis con SDS y su gel replica sugieren que cuando Penicillium candidum se cultiva en medio D suplementado con 0.2% de aceite de oliva, a 29°C y 160 rpm, excreta solamente una lipasa al medio. En otras palabras, se sugiere que no posee isoenzimas.

2.- El peso molecular de la lipasa de Penicillium candidum se estimó en 65,000 Daltones.

3.- Bajo las condiciones de trabajo utilizadas, resulta conveniente precrecer el inóculo de P. candidum hasta que llegue a fase exponencial para disminuir el tiempo de fermentación.

4.- Los aceites de girasol y de cartamo ejercen un efecto positivo sobre la síntesis de lipasa en cultivos de P. candidum. Este efecto es cuantitativamente semejante al ejercido por el aceite de oliva. Por el contrario, el efecto ejercido por el aceite de soya es significativamente menor.

5.- La formación de lipasa y su excreción al medio responde a la presencia de aceite de oliva en el mismo, pero la cantidad de enzima producida no es proporcional a la concentración de aceite adicionada. Se requiere síntesis de proteínas de novo para que aparezca enzima en el medio como respuesta a la presencia del aceite de oliva. Este comportamiento puede ser explicado en términos del fenómeno regulatorio denominado inducción. Es suficiente con 0.02% de aceite de oliva en el medio para que se induzca la síntesis de la lipasa.

6.- La trioleína ejerce un efecto positivo sobre la síntesis de lipasa en Penicillium candidum. Tal efecto es de igual magnitud que el ejercido por el aceite de oliva. Esto sugiere que la trioleína es el componente del aceite de oliva responsable del fenómeno de inducción. Cabe la posibilidad de que la tributirina y el oleato sean agentes inductores de la enzima, puesto que ejercen el mismo efecto, aunque con menor grado.

7.- Triestearina, tripalmitina, estearato, palmitato, caprilato, butirato y glicerol no son agentes inductores de la enzima. Los iones oleato, estearato, palmitato y butirato no ejercen efecto negativo sobre la síntesis de lipasa en cultivos de Penicillium candidum suplementados con aceite de oliva. En medio suplementado con aceite de oliva, el tween 80 ejerce un importante efecto positivo sobre la concentración de lipasa excretada.

8.- El citrato es una buena fuente de carbono para la producción de lipasa para Penicillium candidum, ya que en medio con aceite de oliva permite su crecimiento y una alta actividad específica de lipasa .

9.- Los cultivos de Penicillium candidum con glicerol, acetato, xilosa o lactosa como fuente de carbono, sufrieron un efecto negativo sobre la síntesis de lipasa.

10.- El glicerol ejerce un efecto positivo sobre el crecimiento de Penicillium candidum en cultivos suplementados con aceite de oliva.

APENDICE 1

DETERMINACION DE ACTIVIDAD LIPOLITICA

PARTE 1: VALIDACION DEL METODO

PARTE 2: DEDUCCION DEL MODELO MATEMATICO

PARTE I :
VALIDACION DE METODO
DETERMINACION DE ACTIVIDAD LIPOLITICA

METODO DE HOFELMANN et al. MODIFICADO

Al dar inicio a este proyecto se hicieron determinaciones de actividad lipolítica a caldos de fermentación. El método utilizado se basó en el reportado por Hofelmann et al. (1985). La cuantificación de actividad se hace al comparar el cambio de pH en un sistema de reacción, contra una curva estándar de ácido butírico en solución. La actividad se reportaba como micromoles de ácido butírico liberados por un mililitro de muestra en 15 minutos ($\mu\text{mol}/\text{ml}/15 \text{ min}$). Aunque las condiciones de reacción utilizadas en nuestro laboratorio son semejantes a las utilizadas por Hofelmann, el sistema de medición es diferente, ya que este autor utiliza un sistema de pH-stat, mientras que en nuestro laboratorio se realizaba la medición del descenso del pH con un potenciómetro a un tiempo fijo (15 minutos).

El principal argumento en contra de la validez de ese método es que la actividad enzimática puede verse disminuida significativamente por efecto del pH, el cual, al bajar, puede desnaturalizar la enzima. Además, a valores de pH muy bajos, la disociación del ácido butírico es muy pobre (figura 21), y la lectura de pH registrada no es reflejo fiel de la cantidad de ácido liberado por la acción de la enzima sobre la tributirina.

Para respaldar el trabajo experimental contenido en esta Tesis con un método confiable, con limitaciones conocidas y cuantificadas, se evaluó la influencia que diversos factores ejercen sobre la respuesta generada. Matute (1992) validó un método para medir actividad lipolítica a muestras con lipasa de *P. candidum* basado en el mismo principio. Como resultado de las pruebas efectuadas, explicadas en este apéndice, se modificó el método en lo que se consideró conveniente y, entonces pudo ser utilizado para determinar actividad lipolítica a todas las muestras cuya actividad se reporta en este trabajo.

Finalmente, cabe mencionar que, aunque los resultados generados con el método validado son útiles, sería mejor aún utilizar el equipo pH-stat, y así evitar la inestabilización de la enzima por el pH.

OBSERVACIONES, INFERENCIAS Y RECOMENDACIONES

1.- El lugar en el que se coloca el tubo con la mezcla de reacción dentro del baño a temperatura constante (colocado sobre la plancha de agitación magnética) influye de una manera significativa sobre el resultado generado. La variación osciló entre el 10 y el 40% en las mediciones realizadas. Esto es atribuible a la diferencia en la agitación debida a la ubicación de la barra imantada dentro del campo magnético, lo cual repercute directamente sobre la extensión de la superficie de interfase disponible, en la que actúa la lipasa (figuras 16 y 17)

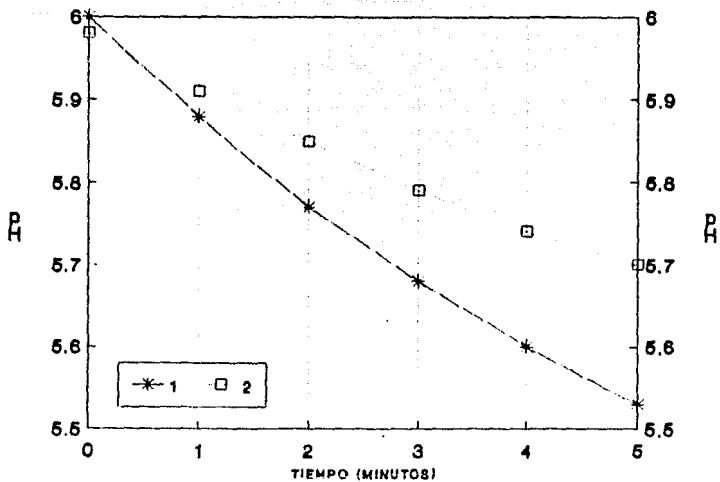


FIGURA 16.- Efecto de la agitación sobre la cinética de hidrólisis al determinar actividad lipolítica. La variación en la agitación se provocó colocando en lugares diferentes (1 y 2) el tubo de ensayo con el sistema de reacción sobre la plancha de agitación magnética. Registro expresado en unidades de pH.

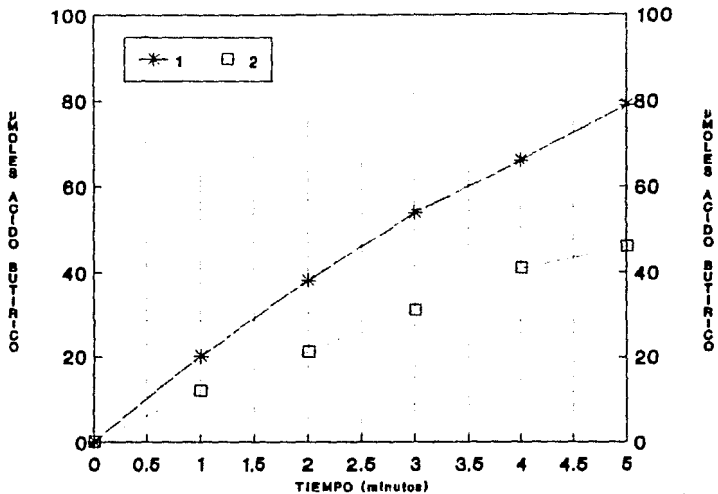


FIGURA 17.- Idem. Registro expresado en micromoles totales/ml.

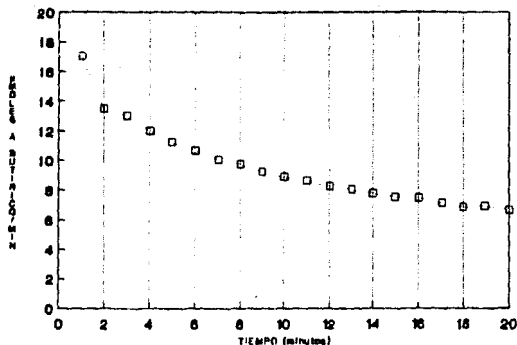


FIGURA 18.- Determinación de velocidad enzimática de una muestra de caldo de fermentación con alta actividad lipolítica. (Micromoles de ácido butírico liberados/ml caldo/minuto). Método de Hofelmann modificado.

2.- La velocidad inicial de la enzima se mantiene por muy poco tiempo (a lo más 5 minutos). Por ello, se recomienda tomar la lectura de pH a tiempos cortos, verificando en cada ensayo, mediante lecturas periódicas, que la enzima se encuentren velocidad inicial. Se recomienda hacer regresión lineal aleatoriamente al 10% de las muestra procesadas, para dar confiabilidad a las determinaciones efectuadas (figura 18).

3.- Cuando la actividad enzimática es alta, basta un minuto de reacción para hacer la medición con confiabilidad .

Por el contrario, cuando la actividad enzimática es baja, no basta un minuto de reacción para detectar cambios importantes en el pH. En esos casos, se puede de dejar transcurrir la reacción durante 3 minutos. Si en ese lapso de tiempo el cambio de pH no es aún importante, la actividad se reporta como no detectada.

El tiempo de incubación mayor incide ligeramente de una manera negativa sobre la estabilidad de la enzima (cfr. punto #10), pero se tolera este inconveniente a cambio de detectar una respuesta positiva relativamente confiable.

4.- Cuando se usan 0.5 ml de caldo se obtiene mas de la mitad de la actividad obtenida al usar 1.0 ml del mismo. Por tanto, conviene usar 0.5 ml en vez de 1.0 ml con el fin de aumentar el valor absoluto de la actividad detectada (figura 19). Ademas, asi se puede hacer la determinacion dos veces, sin modificar el volumen de muestreo acostumbrado.

Esto podria explicarse en terminos de superficie de reaccion limitante, de modo que no toda la actividad de la enzima presente se puede expresar. Se usa el termino "superficie" y no "cantidad" limitante, porque la cantidad de tributirina presente es tal que, segun la estequiometria de la reaccion, podrian liberarse de 3 mil a 10 mil micromoles de acido butirico -dependiendo de que haya o no especificidad posicional-, y ni con los caldos de fermentacion mas activos se liberan mas de 300 micromoles. Cabe comentar que, sin embargo, el sistema es capaz de detectar actividades muy altas, tal como la que exhibe la Palatase M1000L, fabricada por Novo Industries Inc., que con 1.0 ml en 5 minutos causa una disminucion en el pH de 6.0 a 4.45, lo que representa mas de 900 μ moles/ml.

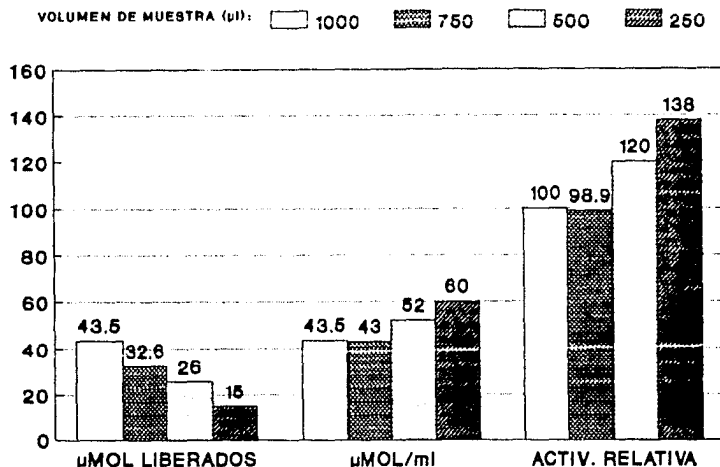


FIGURA 19.- Efecto del volumen de caldo en el sistema de determinacion de actividad lipolitica sobre la respuesta detectada.

5.- Se evaluo la reproducibilidad de la determinacion utilizando tanto pipeta serologica como automatica. El coeficiente de variacion cuando se usan 0.5 ml de muestra, es de 9.9% si se emplea pipeta serologica, y de 3.7% si se emplea automatica (n = 10). La reproducibilidad es buena (por ser superior al 90%) en ambos casos. Se prefiere, obviamente, recurrir a la pipeta automatica si las condiciones de trabajo lo permiten.

6.- No solo es necesario que el sustrato suspendido en el amortiguador este a la temperatura de reaccion en el momento en que se añade el caldo enzimatico. Para que los resultados sean reproducibles, el tamaño de las gotas de tributirina en la emulsion debe ser muy semejante entre prueba y prueba. Ello se logra si se usa solo un lugar en el baño, se fija la velocidad de agitacion en la plancha, y se agita la emulsion un tiempo constante (un minuto, por ejemplo) antes de adicionar la enzima.

7.- Saad *et al.* (1990) informa que la temperatura optima de la lipasa de *Penicillium caseicola* (o *Penicillium candidum*) es 35°C (Figura 20). Lopez (1989) determinó la temperatura optima de la lipasa de *P. candidum* obtenida por fermentación semisólida, y encontro que es 38°C. En nuestro sistema de reaccion no se detectaron diferencias significativas en la actividad de lipasa a 35 y 37°C.

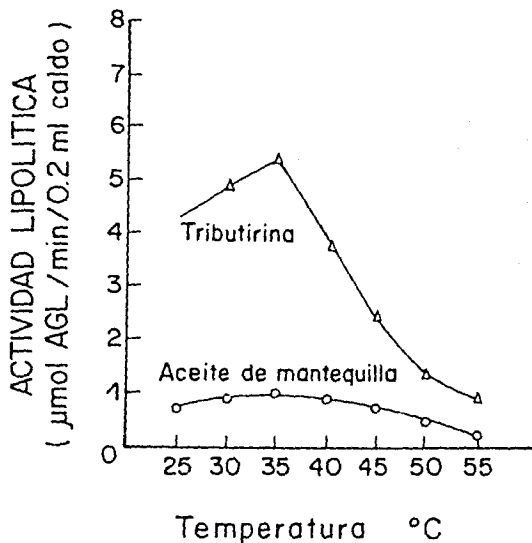


FIGURA 20.- Efecto de la temperatura sobre la actividad de lipasa de *P. caseicola* con tributirina y aceite de mantequilla como sustratos. Mezcla de reaccion: 5 ml de solución con 0.2 ml de caldo, 10% de lípido, 10% de goma arábica, CaCl₂ 2mM; pH 9.0 (Saad *et al.*, 1990).

2

8.- A pH 5.8, el 89.31% del ácido butírico se encuentra disociado, y a pH 6.0 el 100% (Lambert y Lenoir, 1979). Por tanto, desde este punto de vista, es correcto iniciar la medición a pH 6.0, y el pH final debe ser menor o igual a 5.8 (figura 21).

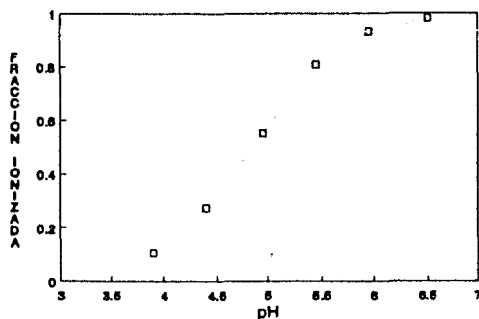


FIGURA 21.- Proporción de ácido butírico ionizado en el rango de pH de trabajo. Para calcular el factor de corrección, se usó el pKa del ácido butírico a 30°C. (Lamberet y Lenoir, 1976).

9.- Se determinó la estabilidad de la enzima a los valores de pH de trabajo alcanzados a diferentes tiempos de reacción, a saber: 1, 3, 5 y 15 minutos (figura 22). El pH mínimo alcanzado por muestras con alta actividad lipolítica es ordinariamente superior a 5.9 en 1 minuto de reacción; 5.80 en 3 minutos, 5.5 en 5 minutos, y 5.3 en 15 minutos. Por tanto, se determinó de la manera convencional la actividad residual de la enzima después de ser incubada durante el tiempo indicado al pH correspondiente.

Se concluye que:

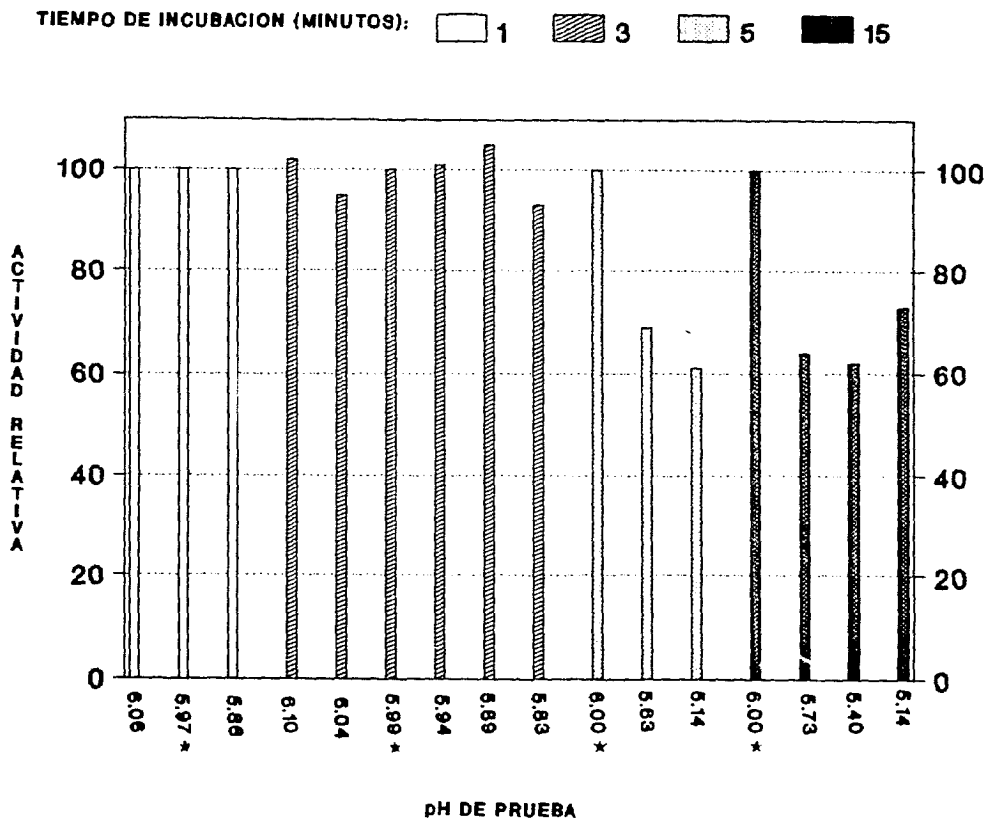
a) Cuando la determinación se hace en un minuto, la actividad de la enzima no se ve disminuida a causa del pH. Es decir, la estabilidad de la enzima a ese pH durante ese tiempo es buena (se mantiene el 100% de la actividad)

b) Cuando la determinación se hace en tres minutos, si el pH llega a 5.83, la actividad puede bajar, un 7% como máximo. Esto es coherente con lo reportado por Saad *et al.* (1990), quienes mencionan que el pH óptimo de la lipasa de *P. caseicolum* es 9.0 (figura 23). Este 10% no se toma en cuenta en los cálculos de estabilidad contenidos en el resto del presente informe.

c) Cuando la determinación se hace en 5 ó 15 minutos, además de que la enzima no está en velocidad inicial, la actividad se ve disminuida hasta en un 60 ó 70% a causa de la acidez generada *in situ*.

Una recomendación para trabajos posteriores es determinar pH óptimo de actividad a la enzima y, en adelante, determinar actividad lipolítica rutinariamente a ese pH con un amortiguador adecuado. Así, aumentará la sensibilidad del método, probablemente de manera significativa.

FIGURA22. Estabilidad de la lipasa de *P. candidum* al pH. La muestra fue incubada con el amortiguador durante el tiempo señalado. Posteriormente se ajustó el pH a 6.0, se adicionó el sustrato emulsificado y se determinó la actividad lipolítica.
(x = Control)



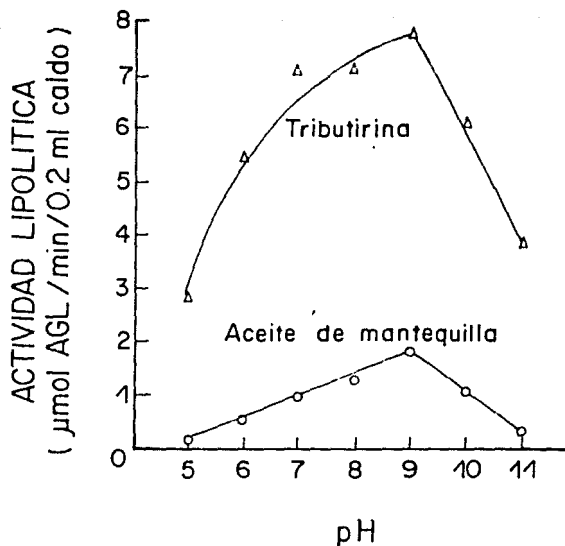


Figura 23.- Efecto del pH sobre la actividad de lipasa de *P. caseicola* con tributirina y aceite de mantequilla como sustratos. (Saad et al., 1990).

10.- Se recomienda el uso de un control interno para poder comparar resultados de muestras analizadas con diferentes lotes de reactivos, y/o en diferentes días. Una opción es utilizar alguna solución de lipasa comercial. Por supuesto, la lipasa comercial utilizada deberá renovarse con regularidad, dado que, naturalmente, su actividad disminuye al envejecer.

P A R T E 2 :

D E D U C C I O N D E U N M O D E L O M A T E M A T I C O
P A R A C A L C U L A R L A A C T I V I D A D L I P O L I T I C A D E U N C A L D O D E F E R M E N T A C I O N

U T I L I Z A N D O E L M E T O D O D E H O F E L M A N N et al. M O D I F I C A D O

La curva de calibración convencional se elabora vertiendo 12.5 ml de amortiguador de succinatos 0.02 M pH = 6.0 en tubos de ensayo, y agregándole de 0 a 200 μ l de solución stock de ácido butírico (con una concentración de 400 μ mol/ml), y agua destilada, para completar un volumen final de 13.5 ml. Se mide el pH a la solución de cada tubo y se grafica. Una curva construida de este modo se muestra en la figura 25.

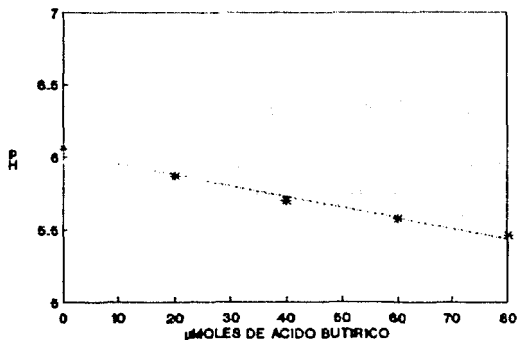


Figura 25.- Curva de calibración de ácido butírico en amortiguador de succinatos 0.02 M pH = 6.0 (puntos por triplicado).

La curva se puede representar mediante la ecuación de una recta, dado que el pH final es función de la cantidad de ácido butírico en el sistema:

$$\text{pH final} = m (\mu\text{mol ácido butírico}) + \text{pH inicial} \quad (1)$$

donde:

- pH final = lectura directa del potenciómetro al sistema con ácido butírico
- pH inicial = lectura directa del potenciómetro al sistema sin ácido butírico
- m = pendiente de la curva de calibración

Dado que el pH de las muestras de caldos de fermentación es con frecuencia distinto de 6.0 y la capacidad amortiguadora del sistema de reacción es baja, fue necesario elaborar curvas de calibración partiendo de diferentes valores de pH inicial. Un ejemplo de tales curvas se muestra en las figuras 26 y 27.

Como se puede apreciar, la linealidad intra-curva es muy buena (los coeficientes de correlación son superiores al 0.99 en todos los casos!).

Sin embargo, la pendiente de las cinco curvas no es idéntica. Analizando los datos, se encuentra una clara correlación entre la pendiente mostrada y el pH inicial. Tal correlación se grafica en la figura 28 y se puede representar mediante la ecuación de una recta

$$y = mx + b \quad (2)$$

donde:

y = pendiente mostrada por la curva de calibración,

x = pH inicial,

m = pendiente de la recta, esto es, razón de cambio de las 5 pendientes

b = intercepto (dato que carece de significado físico, ya que en las condiciones de trabajo no se parte de pH 0 en ningún caso)

Al resolver la ecuación 2 para los datos de la figura 26 encontramos que:

$$y = (-7.408851 \times 10^{-3})(\text{pH inicial}) + 0.0383442 \quad (3)$$

Así las cosas, al sustituir en (1) esta fórmula para calcular la pendiente mostrada por la curva de calibración encontramos que:

$$\text{pH final} = [(-7.4 \times 10^{-3})(\text{pH inicial}) + 0.03](\mu\text{mol}) + \text{pH inicial}$$

y, reorganizando:

$$\mu\text{mol} = \frac{\text{pH final} - \text{pH inicial}}{(-7.408851 \times 10^{-3})(\text{pH inicial}) + 0.0383442} \quad (4)$$

Dado que la determinación de actividad se hace con 0.5 ml, y se desea expresar el valor en $\mu\text{mol/ml}$, el valor final de μmol se multiplica por 2.

Finalmente, ya que la lectura del pH final se realiza después de que la reacción transcurrió durante un minuto, las unidades resultantes de nuestro cálculo son $\mu\text{mol/ml/min}$, lo que corresponde a unidades internacionales de actividad enzimática, lipolítica en este caso (LU).

Nos encontramos así con que:

$$\text{LU} = \frac{(2)(\text{pH final} - \text{pH inicial})}{(-7.408851 \times 10^{-3})(\text{pH inicial}) + 0.0383442} \quad (5)$$

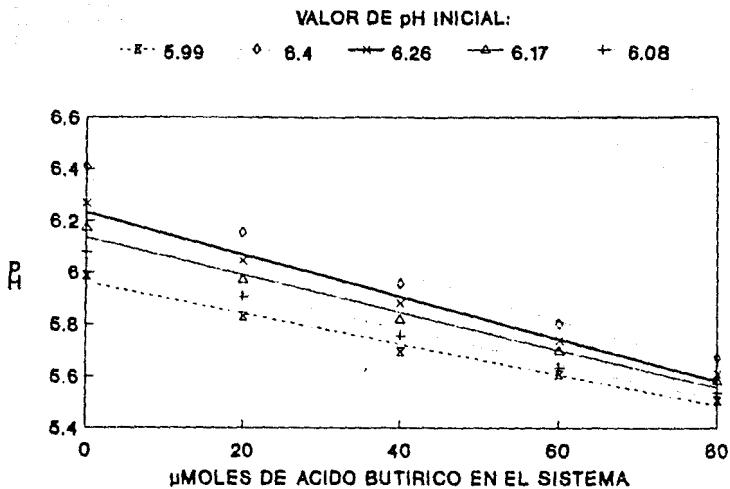


FIGURA 26.- Curva de calibración para la determinación de actividad lipolítica. pH inicial variable. Puntos por triplicado.

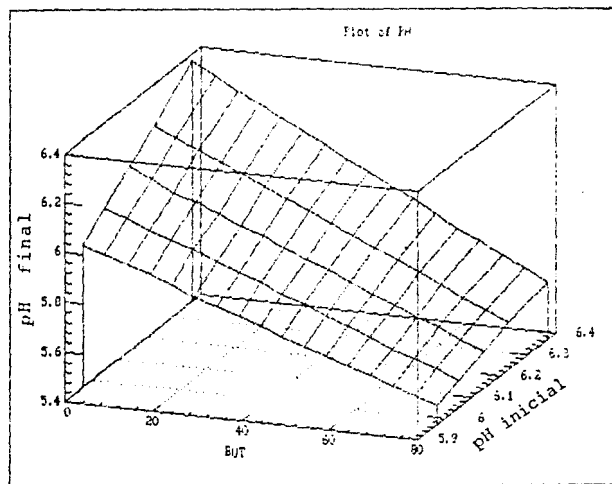


FIGURA 27.- Curva de calibración de actividad lipolítica con pH inicial variable. Gráfica superficie de respuesta. BUT= μmol ácido butírico/ ml muestra.

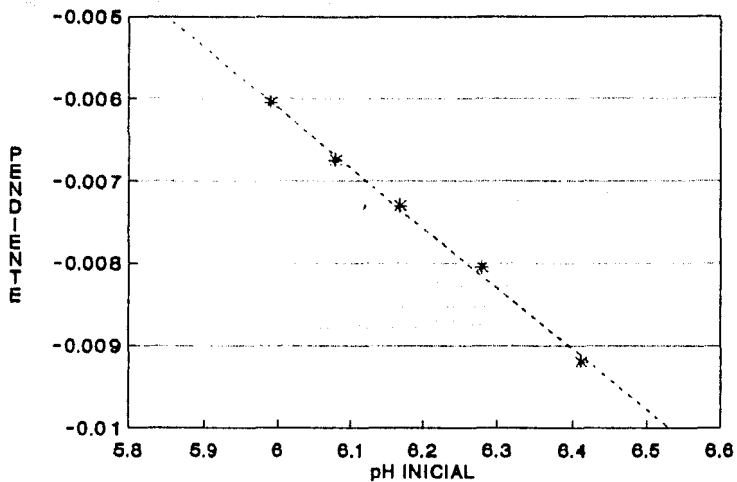


FIGURA 28.- Comportamiento de la pendiente de las curvas de calibración al variar el pH inicial.

APENDICE 2

DETERMINACION DE LAS CONDICIONES DE REACCION PARA DETECTAR

ACTIVIDAD LIPOLITICA POR MEDIO DE UN ENSAYO EN PLACA

Se probaron diversos sustratos, métodos de emulsificación y colorantes que reaccionarían con los productos de reacción.

Los sustratos probados fueron: tributirina, trioléina y aceite de oliva, todos al 2.5%, obteniéndose resultados semejantes. Se decidió usar el aceite por ser el sustrato de menor costo.

Se corroboró la necesidad de utilizar algún agente emulsificante, como el triton X-100. Este agente estabiliza la emulsión: sin él la actividad no se puede detectar, pues no se obtiene un tamaño de partícula pequeño.

Se emulsificó con homogenizador de pistilo o con sonicador. La emulsión hecha con sonicador tenía el tamaño de partícula menor, por lo que se esperaba una mejor interacción con la enzima. Sin embargo, con ambos métodos se obtuvo un halo claramente definido y, ya que se tenía disponible en el laboratorio en el que se trabajaba, se decidió utilizar el homogenizador de pistilo de forma rutinaria.

Los colorantes probados fueron rodamina 6G y rodamina B al 0.005 y 0.15%. Con rodamina B se obtuvieron halos de hidrólisis con los tres sustratos, mientras que con rodamina 6G, sólo con trioléina y aceite de oliva, y no con tributirina. En cuanto a la concentración del colorante, tanto 0.05% como 0.15% facilitan la visualización del halo.

Por otra parte, se probaron diversos tiempos de lavado del gel procedente de la electroforesis con SDS. El tiempo y número de lavados, así como el volumen de solución de lavado debe de variar en función del espesor y tamaño del gel. Se encontró que para recuperar la actividad enzimática de un gel de 40 x 50 x 0.75 mm son suficientes tres lavados con 100 ml de solución al 1% de triton X-100 en amortiguador de succinatos 0.02 M pH 6.0, cada uno con duración de 40 a 45 minutos. Si el tiempo de los lavados es menor (por ejemplo 30 minutos), la actividad enzimática no se detecta.

Para determinar cuánta actividad enzimática se debía tener en la muestra de modo que la banda fuera detectable y que estuviera bien enfocada, se hicieron varias corridas de prueba, y se concluyó que la banda se detecta bien cuando se aplican aproximadamente 30 o 40 μ g de proteína procedente de algún caldo de fermentación que muestre una actividad de 40 LU, (la descripción de la preparación de las muestras se incluye en la sección 6.5.4.3). En todas las corridas se aplicó 1 μ l de lipasa comercial (Palatase M 1000 LU), que contiene 2 μ g de proteína/ μ l solución, como control positivo.

APENDICE 3

TRATAMIENTO ESTADISTICO DE LOS DATOS EXPERIMENTALES

EXPERIMENTO 7.2.3 EFECTO DE DIVERSOS ACEITES VEGETALES SOBRE
LA PRODUCCION DE LIPASA

ARCHIVO: ACEITEE	FILE: ACEITES		
TRATAMIENTO	Row TX4	AE4	C4
1.- Oliva	1 1	3.13	4.6
2.- Girasol	2 1	4.23	3.9
3.- Maiz	3 1	6.57	4.6
4.- Cártamo	4 2	4.70	5.4
5.- Sova	5 2	5.06	5.0
	6 2	4.54	6.1
	7 3	3.68	6.9
	8 3	3.29	7.2
	9 3	4.11	6.6
	10 4	4.82	5.6
	11 4	5.02	5.9
	12 4	5.02	5.4
	13 5	3.39	5.7
	14 5	3.19	6.4
	15 5	3.18	7.2
SIMBOLOGIA			
TX = Tratamiento			
AE = Actividad específica			
C = Crecimiento			

One-Way Analysis of Variance

Data: AE4

Level codes: TX4

Labels:

Range test: LSD

Confidence level: 95

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
Between groups	6.6565067	4	1.6641267	2.481	.1111
Within groups	6.7061333	10	.6706133		
Total (corrected)	13.362640	14			

0 missing value(s) have been excluded.

Table of means for AE4 by TX4

Level	Count	Average	Std. Error (internal)	Std. Error (pooled s)	95 Percent LSD intervals for mean	
1	3	4.6433333	1.0143197	.4727978	3.8982265	5.3884401
2	3	4.7666667	.1537675	.4727978	4.0215599	5.5117735
3	3	3.6933333	.2366075	.4727978	2.9462265	4.4384401
4	3	4.9533333	.0666667	.4727978	4.2062265	5.6984401
5	3	3.2533333	.0663943	.4727978	2.5062265	3.9984401
Total	15	4.2620000	.2114416	.2114416	3.9267781	4.5952219

Multiple range analysis for AE4 by TX4

Method: 95 Percent LSD Intervals			
Level	Count	Average	Homogeneous Groups
5	3	3.2533333	*
3	3	3.6933333	**
1	3	4.6433333	**
2	3	4.7666667	*
4	3	4.9533333	*

Interpretación de la comparación múltiple de medias LSD (multiple range analysis LSD):

Se forman grupos homogéneos con los tratamientos entre los cuales no hay diferencia significativa. Cada grupo se marca con una columna vertical de asteriscos (*).

Hay diferencia significativa entre aquellos tratamientos pertenecientes a diferentes grupos homogéneos, siempre y cuando no se traslapen entre sí.

Se puede decir, con el 95% de probabilidad de acertar que, para este caso (actividad específica vs tratamiento), los grupos homogéneos son:

- a) Soya, maíz, oliva.
- b) Maíz, oliva, girasol, cártamo.

One-Way Analysis of Variance

Data: C4

Level codes: TX4

Labels:

Range test: LSD

Confidence level: 95

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
Between groups	11.333333	4	2.833333	11.905	.0008
Within groups	2.380000	10	.2380000		
Total (corrected)	13.713333	14			

0 missing value(s) have been excluded.

Table of means for C4 by TX4

Level	Count	Average	Std. Error (internal)	Std. Error (pooled s)	95 Percent LSD intervals for mean	
1	3	4.3666667	.2333333	.2816617	3.9227812	4.8105521
2	3	5.5000000	.3214550	.2816617	5.0561145	5.9438855
3	3	6.9000000	.1732051	.2816617	6.4561145	7.3438855
4	3	5.6333333	.1452966	.2816617	5.1894479	6.0772188
5	3	6.4333333	.4333333	.2816617	5.9894479	6.8772188
Total	15	5.7666667	.1259630	.1259630	5.5681551	5.9651783

Multiple range analysis for C4 by TX4

Method: 95 Percent LSD Intervals

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
1	3	4.3666667	*
2	3	5.5000000	*
4	3	5.6333333	**
5	3	6.4333333	**
3	3	6.9000000	*

Interpretación de la comparación múltiple de medias LSD (multiple range analysis LSD):

Se forman grupos homogéneos con los tratamientos entre los cuales no hay diferencia significativa. Cada grupo se marca con una columna vertical de *.

Hay diferencia significativa entre aquellos tratamientos pertenecientes a diferentes grupos homogéneos, siempre y cuando no se traslapen entre sí.

Se puede decir, con el 95% de probabilidad de acertar que, para este caso (crecimiento vs tratamiento), los grupos homogéneos son:

- a) Oliva
- b) Girasol, cártamo.
- c) Cártamo, soya.
- d) Soya, maíz.

EXPERIMENTO 7.2.5 DEFINICION DEL METABOLITO RESPONSABLE DEL
FENOMENO DE INDUCCION

ARCHIVO: DUSTI

File: SUBSTR

TRATAMIENTOS:

row TX3 AE3 C3

1.- Tributina	1	1	3.1	3.6
2.- Triplutina	2	1	3.0	3.6
3.- Tripletina	3	2	1.8	3.8
4.- Triolena	4	2	1.4	5.1
5.- Butilato	5	3	0.0	3.6
6.- Capilato	6	3	1.3	4.6
7.- Palmitato	7	4	4.8	4.6
8.- Estearato	8	4	4.6	4.2
9.- Oleato	9	5	0.4	2.8
10.- Glicerol	10	5	1.3	5.1
11.- Control positivo	11	6	0.0	0.2
12.- Control negativo	12	6	0.1	0.3
	13	7	1.8	1.2
	14	7	0.7	3.9
	15	8	1.5	2.1
	16	8	0.9	2.3
	17	9	4.1	5.0
	18	9	3.5	4.2
	19	10	0.9	2.3
	20	10	0.8	4.2
	21	11	4.2	3.9
	22	11	5.4	4.6
	23	12	0.9	3.2
	24	12	0.9	4.6

SIMBOLOGIA

TX = Tratamiento
AE = Actividad Especifica
C = Control

One-Way Analysis of Variance

Data: AE3

Level codes: TX3

Labels:

Range test: LSD

Confidence level: 95

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
Between groups	58.780333	11	5.3443939	27.525	.0000
Within groups	2.330000	12	.1941667		
Total (corrected)	61.110333	23			

0 missing value(s) have been excluded.

Table of means for AE3 by TX3

Level	Count	Average	Std. Error (internal)	Std. Error (pooled s)	95 Percent LSD intervals for mean	
1	2	3.0500000	.0500000	.3115820	2.5698362	3.5301638
2	2	1.6000000	.2000000	.3115820	1.1198362	2.0801638
3	2	1.0500000	.2500000	.3115820	.5698362	1.5301638
4	2	4.7000000	.1000000	.3115820	4.2198362	5.1801638
5	2	.8500000	.4500000	.3115820	.3698362	1.3301638
6	2	.0500000	.0500000	.3115820	-.4301638	.5301638
7	2	1.2500000	.5500000	.3115820	.7698362	1.7301638
8	2	1.2000000	.3000000	.3115820	.7198362	1.6801638
9	2	3.8000000	.3000000	.3115820	3.3198362	4.2801638
10	2	.8500000	.0500000	.3115820	.3698362	1.3301638
11	2	4.8000000	.6000000	.3115820	4.3198362	5.2801638
12	2	.9000000	.0000000	.3115820	.4198362	1.3801638
Total	24	2.0083333	.0899460	.0899460	1.8697220	2.1469447

Multiple range analysis for AE3 by TX3

Method: 95 Percent LSD Intervals			
Level	Count	Average	Homogeneous Groups
6	2	.0500000	*
5	2	.8500000	**
10	2	.8500000	**
12	2	.9000000	**
3	2	1.0500000	*
8	2	1.2000000	*
7	2	1.2500000	*
2	2	1.6000000	*
1	2	3.0500000	*
9	2	3.8000000	**
4	2	4.7000000	**
11	2	4.8000000	*

Interpretación de la comparación múltiple de medias LSD
(multiple range analysis LSD):

Se puede decir, con el 95% de probabilidad de acertar que,
para este caso (actividad específica vs tratamiento), los grupos
homogéneos son:

- a) Caprilato, butirato, glicerol, control negativo.
- b) Butirato, glicerol, control negativo, triestearina, estearato, palmitato, tripalmitina.
- c) Tributirina, oleato.
- d) oleato, triolefina.
- e) triolefina, control positivo.

One-Way Analysis of Variance

Data: C3

Level codes: TX3

Labels:

Range test: LSD

Confidence level: 95

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
Between groups	36.575000	11	3.3250000	4.314	.0092
Within groups	9.250000	12	.7708333		
Total (corrected)	45.825000	23			

0 missing value(s) have been excluded.

Table of means for C3 by TX3

Level	Count	Average	Std. Error (internal)	Std. Error (pooled s)	95 Percent LSD intervals for mean	
1	2	3.6000000	.0000000	.6208194	2.6432856	4.5567144
2	2	4.4500000	.6500000	.6208194	3.4932856	5.4087144
3	2	4.1000000	.5000000	.6208194	3.1432856	5.0567144
4	2	4.4000000	.2000000	.6208194	3.4432856	5.3567144
5	2	3.9500000	1.1500000	.6208194	2.9932856	4.9067144
6	2	.2500000	.0500000	.6208194	-.7067144	1.2067144
7	2	2.1500000	.9500000	.6208194	1.1932856	3.1067144
8	2	2.2000000	.1000000	.6208194	1.2432856	3.1567144
9	2	4.6000000	.4000000	.6208194	3.6432856	5.5567144
10	2	3.2500000	.9500000	.6208194	2.2932856	4.2067144
11	2	4.2500000	.3500000	.6208194	3.2932856	5.2067144
12	2	3.9000000	.7000000	.6208194	2.9432856	4.8567144
Total	24	3.4250000	.1792151	.1792151	3.1488203	3.7011797

Multiple range analysis for C3 by TX3

Method: 95 Percent LSD Intervals			
Level	Count	Average	Homogeneous Groups
6	2	2.2500000	*
7	2	2.1500000	**
8	2	2.2000000	**
10	2	3.2500000	***
1	2	3.6000000	***
12	2	3.0000000	***
5	2	3.9500000	***
3	2	4.1000000	**
11	2	4.2500000	*
4	2	4.4000000	*
2	2	4.4500000	*
9	2	4.6000000	*

Interpretación de la comparación múltiple de medias LSD (multiple range analysis LSD):

Se forman grupos homogéneos con los tratamientos entre los cuales no hay diferencia significativa. Cada grupo se marca con una columna vertical de *.

Hay diferencia significativa entre aquellos tratamientos pertenecientes a diferentes grupos homogéneos, siempre y cuando no se traslapen entre sí.

Se puede decir, con el 95% de probabilidad de acertar que, para este caso (crecimiento vs tratamiento), los grupos homogéneos son:

- a) Caprilato, palmitato.
- b) Palmitato, estearato, glicerol, tributirina, control negativo, butirato.
- c) Estearato, glicerol, tributirina, control negativo, butirato, triestearina.
- d) Glicerol, tributirina, control negativo, butirato, triestearina, control positivo, trioleína, tripalmitina, oleato.

EXPERIMENTO 7.2.6 EFECTO DEL TWEEN 80

ARCHIVO: TWEEN 2

TRATAMIENTO

File TWEEN2

	row	TRAT1	AESP1	CREC1
1.- Control con acete v sin tween	1	1	0.00	3.4
2.- Control con acete	2	1	0.00	2.4
3.- Control con tween	3	2	2.86	4.2
4.- Control con acete v tween	4	2	2.17	4.6
5	5	3	0.91	3.3
6	6	3	1.03	3.9
7	7	4	7.11	3.8
8	8	4	5.29	3.4

DIAGNOSTICO

TRAT1 = Tratamiento
 AESP1 = Actividad especifica
 CREC1 = Crecimiento

One-Way Analysis of Variance

Data: AESP1

Level codes: TRAT1

Labels:

Range test: LSD

Confidence level: 95

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
Between groups	44.512638	3	14.837546	31.213	.0031
Within groups	1.901450	4	.475362		
Total (corrected)	46.414088	7			

0 missing value(s) have been excluded.

Table of means for AESP1 by TRAT1

Level	Count	Average	Std. Error (internal)	Std. Error (pooled s)	95 Percent LSD intervals for mean	
1	2	.0000000	.0000000	.4875256	-.9574708	.9574708
2	2	2.5150000	.3450000	.4875256	1.5575292	3.4724708
3	2	.9700000	.0600000	.4875256	-.0125292	1.9274708
4	2	6.2000000	.9100000	.4875256	5.2425292	7.1574708
Total	8	2.4212500	.2437628	.2437628	1.9425146	2.8999854

Multiple range analysis for AESP1 by TRAT1

Method: 95 Percent LSD Intervals			
Level	Count	Average	Homogeneous Groups
1	2	.0000000	*
3	2	.9700000	**
2	2	2.5150000	*
4	2	6.2000000	*

Interpretación de la comparación múltiple de medias LSD (multiple range analysis LSD):

Se forman grupos homogéneos con los tratamientos entre los cuales no hay diferencia significativa. Cada grupo se marca con una columna vertical de *.

Hay diferencia significativa entre aquellos tratamientos pertenecientes a diferentes grupos homogéneos, siempre y cuando no se traslapen entre sí.

Se puede decir, con el 95% de probabilidad de acertar que, para este caso (actividad específica vs tratamiento), los grupos homogéneos son:

- a) Control negativo, tween.
- b) tween, aceite.
- c) tween con aceite.

One-Way Analysis of Variance

Data: CREC1

Level codes: TRAT1

Labels:

Range test: LSD

Confidence level: 95

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
Between groups	2.2550000	3	.7516667	3.579	.1249
Within groups	.8400000	4	.2100000		
Total (corrected)	3.0950000	7			

0 missing value(s) have been excluded.

Table of means for CREC1 by TRAT1

Level	Count	Average	Std. Error (internal)	Std. Error (pooled s)	95 Percent LSD intervals for mean	
1	2	2.9000000	.5000000	.3240370	2.2636109	3.5363891
2	2	4.4000000	.2000000	.3240370	3.7636109	5.0363891
3	2	3.6000000	.3000000	.3240370	2.9636109	4.2363891
4	2	3.6000000	.2000000	.3240370	2.9636109	4.2363891
Total	8	3.6250000	.1620185	.1620185	3.3068054	3.9431946

Multiple range analysis for CREC1 by TRAT1

Method: 95 Percent LSD Intervals	Level	Count	Average	Homogeneous Groups
	1	2	2.9000000	*
	3	2	3.6000000	**
	4	2	3.6000000	**
	2	2	4.4000000	*

Interpretación de la comparación múltiple de medias LSD (multiple range analysis LSD):

Se forman grupos homogéneos con los tratamientos entre los cuales no hay diferencia significativa. Cada grupo se marca con una columna vertical de *.

Hay diferencia significativa entre aquellos tratamientos pertenecientes a diferentes grupos homogéneos, siempre y cuando no se traslapen entre sí.

Se puede decir, con el 95% de probabilidad de acertar que, para este caso (crecimiento vs tratamiento), los grupos homogéneos son:

- a) Control negativo, tween, tween con aceite.
- b) Tween, tween con aceite, aceite.

EXPERIMENTO 7.2.7 EVALUACION DEL EFECTO DE LA PRESENCIA DE PRODUCTOS DE REACCION EN EL MEDIO DE CULTIVO SOBRE LA PRODUCCION DE LIPASA

ARCHIVO: PRODUCTO	File PRODUCTS
TRATAMIENTOS:	row TX2 AE2 C2
1.- Suflato	1. 1 5.4 4.3
2.- Capilato	2. 1 4.2 3.9
3.- Polulato	3. 2 0.0 0.4
4.- Estolato	4. 2 0.0 0.3
5.- Alolato	5. 3 5.4 4.7
6.- Allatol	6. 3 5.4 5.4
7.- Control positivo	7. 4 5.8 6.1
8.- Control negativo	8. 4 5.0 4.6
	9. 5 4.1 6.5
	10. 5 2.9 6.7
	11. 6 2.6 8.6
	12. 6 4.0 7.6
	13. 7 4.2 3.9
	14. 7 5.4 4.6
	15. 8 0.9 4.6
	16. 8 0.3 3.5

SINBOLOGIA

TX = Tratamiento
 AE = Actividad especifica
 C = Crecimiento

One-Way Analysis of Variance

Data: AE2

Level codes: TX2

Labels:

Range test: LSD

Confidence level: 95

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
Between groups	62.590000	7	8.9414286	19.651	.0002
Within groups	3.640000	8	.4550000		
Total (corrected)	66.230000	15			

0 missing value(s) have been excluded.

Table of means for AE2 by TX2

Level	Count	Average	Std. Error (internal)	Std. Error (pooled s)	95 Percent LSD intervals for mean	
1	2	4.8000000	.6000000	.4769696	4.0220399	5.5779601
2	2	.0000000	.0000000	.4769696	-.7779601	.7779601
3	2	5.4000000	.0000000	.4769696	4.6220399	6.1779601
4	2	5.4000000	.4000000	.4769696	4.6220399	6.1779601
5	2	3.5000000	.6000000	.4769696	2.7220399	4.2779601
6	2	3.3000000	.7000000	.4769696	2.5220399	4.0779601
7	2	4.8000000	.6000000	.4769696	4.0220399	5.5779601
8	2	.6000000	.3000000	.4769696	-.1779601	1.3779601
Total	16	3.4750000	.1686342	.1686342	3.0999496	3.7500504

Multiple range analysis for AE2 by TX2

Method: 95 Percent LSD Intervals			
Level	Count	Average	Homogeneous Groups
2	2	.0000000	*
8	2	.6000000	*
6	2	3.3000000	*
5	2	3.5000000	*
1	2	4.8000000	**
7	2	4.8000000	**
3	2	5.4000000	*
4	2	5.4000000	*

Interpretación de la comparación múltiple de medias LSD (multiple range analysis LSD):

Se forman grupos homogéneos con los tratamientos entre los cuales no hay diferencia significativa. Cada grupo se marca con una columna vertical de *.

Hay diferencia significativa entre aquellos tratamientos pertenecientes a diferentes grupos homogéneos, siempre y cuando no se traslapen entre sí.

Se puede decir, con el 95% de probabilidad de acertar que, para este caso (actividad específica vs tratamiento), los grupos homogéneos son:

- a) Caprilato, control negativo.
- b) Glicerol, oleato, butirato, control positivo.
- c) Butirato, control positivo, palmitato, estearato.

One-Way Analysis of Variance

Data: C2

Level codes: TX2

Labels:

Range test: LSD

Confidence level: 95

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
Between groups	71.229375	7	10.175625	28.816	.0000
Within groups	2.825000	8	.353125		
Total (corrected)	74.054375	15			

0 missing value(s) have been excluded

Table of means for C2 by TX2

Level	Count	Average	Std. Error (internal)	Std. Error (pooled s)	95 Percent LSD intervals for mean	
1	2	4.1000000	.2000000	.4201934	3.4146446	4.7853554
2	2	.3500000	.0500000	.4201934	-3.353554	1.0353554
3	2	5.0500000	.2500000	.4201934	4.3646446	5.7353554
4	2	5.3500000	.7500000	.4201934	4.8646446	6.0353554
5	2	6.6000000	.1000000	.4201934	5.9146446	7.2853554
6	2	8.1000000	.5000000	.4201934	7.4146446	8.7853554
7	2	4.2500000	.3500000	.4201934	3.5646446	4.9353554
8	2	4.0500000	.5500000	.4201934	3.3646446	4.7353554
Total	16	4.7312500	.1485608	.1485608	4.4889403	4.9735597

Multiple range analysis for C2 by TX2

Method: 95 Percent LSD Intervals

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
2	2	.3500000	*
8	2	4.0500000	*
1	2	4.1000000	*
7	2	4.2500000	*
3	2	5.0500000	**
4	2	5.3500000	**
5	2	6.6000000	*
6	2	8.1000000	*

Interpretación de la comparación múltiple de medias LSD (multiple range analysis LSD):

Se forman grupos homogéneos con los tratamientos entre los cuales no hay diferencia significativa. Cada grupo se marca con una columna vertical de *.

Hay diferencia significativa entre aquellos tratamientos pertenecientes a diferentes grupos homogéneos, siempre y cuando no se traslapen entre sí.

Se puede decir, con el 95% de probabilidad de acertar que, para este caso (crecimiento vs tratamiento), los grupos homogéneos son:

- a) Caprilato.
- b) control negativo, butirato, control positivo, palmitato, estearato.
- c) Estearato, oleato.
- d) Glicerol.

EXPERIMENTO 7.2.8 EFECTO DE LA FUENTE DE CARBONO SOBRE LA PRODUCCION DE LIPASA

ARCHIVO: CARBONO

File CARBONO

TRATAMIENTOS	row	TX5	AE5	C5
1.- Almidón	1	1	2.4	6.5
2.- Lactosa	2	1	3.9	7.2
3.- Maltodextrina	3	2	1.2	6.1
4.- Citrato	4	2	2.1	8.0
5.- Apetalo	5	3	3.4	5.7
6.- Xilosa	6	3	2.8	8.6
7.- Maltosa	7	4	4.7	3.0
8.- Glicerol	8	4	5.7	4.0
9.- Control positivo	9	5	1.1	3.8
10.- Control negativo	10	5	2.6	1.9
SINEOLOGIA	11	6	0.8	8.6
	12	6	0.4	9.8
	13	7	2.3	5.6
TX = Tratamiento	14	7	1.8	8.2
AE = Actividad especifica	15	8	0.5	9.2
C = Crecimiento	16	8	0.5	7.1
	17	9	4.2	3.9
	18	9	5.4	4.6
	19	10	0.3	3.2
	20	10	0.9	4.6

One-Way Analysis of Variance

Data: AE5

Level codes: TX5

Labels:

Range test: LSD

Confidence level: 95

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
Between groups	51.410000	9	5.7122222	12.865	.0002
Within groups	4.440000	10	.4440000		
Total (corrected)	55.850000	19			

0 missing value(s) have been excluded.

Table of means for AE5 by TX5

Level	Count	Average	Std. Error (internal)	Std. Error (pooled s)	95 Percent LSD intervals for mean	
1	2	3.1500000	.7500000	.4711688	2.4074605	3.8925395
2	2	1.6500000	.4500000	.4711688	.9074605	2.3925395
3	2	3.1000000	.3000000	.4711688	2.3574605	3.8425395
4	2	5.2000000	.5000000	.4711688	4.4574605	5.9425395
5	2	1.8500000	.7500000	.4711688	1.1074605	2.5925395
6	2	.6000000	.2000000	.4711688	-.1425395	1.3425395
7	2	2.0500000	.2500000	.4711688	1.3074605	2.7925395
8	2	.5000000	.0000000	.4711688	-.2425395	1.2425395
9	2	4.8000000	.6000000	.4711688	4.0574605	5.5425395
10	2	.6000000	.3000000	.4711688	-.1425395	1.3425395
Total	20	2.3500000	.1409966	.1409966	2.1151984	2.5848116

Multiple range analysis for AE5 by TX5

Method:	95 Percent	LSD	Interval	
Level	Count	Average	Homogeneous	Groups
8	2	.5000000	*	
10	2	.6000000	**	
6	2	.6000000	**	
2	2	1.6500000	***	
5	2	1.8500000	****	
7	2	2.0500000	***	
3	2	3.1000000	**	
1	2	3.1500000	*	
9	2	4.8000000	*	
4	2	5.2000000	*	

Interpretación de la comparación múltiple de medias LSD (multiple range analysis LSD):

Se forman grupos homogéneos con los tratamientos entre los cuales no hay diferencia significativa. Cada grupo se marca con una columna vertical de *.

Hay diferencia significativa entre aquellos tratamientos pertenecientes a diferentes grupos homogéneos, siempre y cuando no se traslapen entre sí.

Se puede decir, con el 95% de probabilidad de acertar que, para este caso (actividad específica vs tratamiento), los grupos homogéneos son:

- Glicérol, control negativo, xilosa, lactosa, acetato.
- Control negativo, xilosa, lactosa, acetato, maltosa.
- Lactosa, acetato, maltosa, maltodextrina.
- Acetato, maltosa, maltodextrina, almidón.
- Citrato, control positivo.

One-way Analysis of Variance

Data: C5

Level codes: TX5

Labels:

Range test: LSD

Confidence level: 95

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
Between groups	84.822000	9	9.4357778	5.864	.0053
Within groups	16.090000	10	1.6090000		
Total (corrected)	101.01200	19			

0 missing value(s) have been excluded.

Table of means for C5 by TX5

Level	Count	Average	Std. Error (internal)	Std. Error (pooled s)	95 Percent LSD intervals for mean	
1	2	6.8500000	.3500000	.8969392	5.4364666	8.263533
2	2	7.0500000	.9500000	.8969392	5.6364666	8.463533
3	2	7.1500000	1.4500000	.8969392	5.7364666	8.563533
4	2	3.5000000	.5000000	.8969392	2.0864666	4.913533
5	2	2.8500000	.9500000	.8969392	1.4364666	4.263533
6	2	9.2000000	.6000000	.8969392	7.7864666	10.613533
7	2	6.9000000	1.3000000	.8969392	5.4864666	8.313533
8	2	8.1500000	1.0500000	.8969392	6.7364666	9.563533
9	2	4.2500000	.3500000	.8969392	2.8364666	5.863533
10	2	3.9000000	.7000000	.8969392	2.4864666	5.313533
Total	20	5.9600000	.2036371	.2036371	5.5330015	6.426999

Multiple range analysis for C5 by TX5

Method:	95 Percent	LSD Intervals:	
Level	Count	Average	Homogeneous Groups
5	2	2.0500000	*
4	2	3.5000000	*
10	2	2.9000000	*
9	2	4.2500000	**
1	2	6.0500000	**
7	2	6.9000000	**
2	2	7.0500000	**
3	2	7.1500000	*
8	2	8.1500000	*
6	2	9.2000000	*

Interpretación de la comparación múltiple de medias LSD (multiple range analysis LSD):

Se forman grupos homogéneos con los tratamientos entre los cuales no hay diferencia significativa. Cada grupo se marca con una columna vertical de *.

Hay diferencia significativa entre aquellos tratamientos pertenecientes a diferentes grupos homogéneos, siempre y cuando no se traslapen entre sí.

Se puede decir, con el 95% de probabilidad de acertar que, para este caso (crecimiento vs tratamiento), los grupos homogéneos son:

- a) Acetato, citrato, control negativo, control positivo.
- b) Control positivo, almidón maltosa, lactosa.
- c) Almidón, maltosa, lactosa, maltodextrina, glicerol, xilosa.

PRUEBA DE BARTLETT PARA DETRMINAR SI EXISTE HOMOGENIEDAD DE VARIANZA

ARCHIVO	CONTRASTE	BARTLETT	F	GRADOS DE LIBERTAD	X ² TABLAS (0.01)
PRODUCTS	AE2 X TX2	1.11367	0.987063	7	18.475
	C2 X TX2	2.49038	0.622345		
CARBONO	AE5 X TX5	1.40012	0.963753	9	21.66
	C5 X TX5	1.48959	0.967538		
ACEITES	AE4 X TX4	7.22446	2.4394E-3	4	13.27
	C4 X TX4	1.36258	0.630697		
SUSTR	AE3 X TX3	2.83496	0.516064	11	24.72
	C3 X TX3	2.52271	0.614879		
TWEEN2	AESP1 X TRAT1	3.07747	0.210882	3	11.34
	CREC1 X TRAT1	1.35554	0.835327		

Modo de interpretar el análisis:

Si el valor de Bartlett calculado es menor que el valor de X² de tablas (0.01), la varianza es homogénea. La homogeneidad de varianza es una de las exigencias para la validez del análisis de varianza (Litle y Hills, 1978).

Si X^2 calculada < X^2 tablas, la varianza es homogénea

Si X^2 calculada > X^2 tablas, la varianza es heterogénea

Como puede verse, en todos los casos la varianza resultó homogénea.

APENDICE 4

REGISTRO DE DISTRIBUCION DE ACIDOS GRASOS EN VARIOS ACEITES VEGETALES

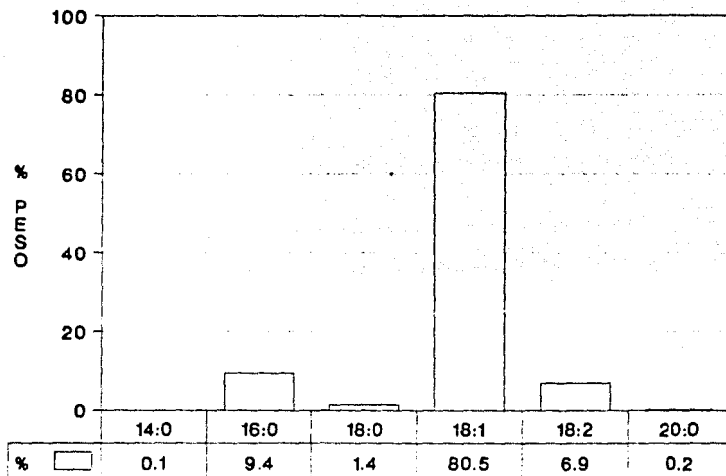


FIGURA 29.- Rango de distribución de ácidos grasos para el aceite de oliva de España (de el fruto de Olea europa). Reportado durante el período 1927 -1961 (Swern, 1979)

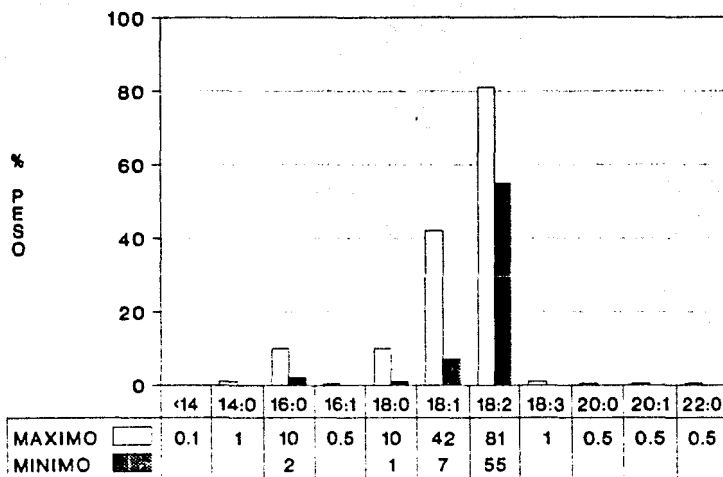


FIGURA 30.- Rango de distribución de ácidos grasos para el aceite de cártamo (de la semilla de *Cartamus tinctorius*), adoptado tentativamente por la FAO/World Health Organization Codex Alimentarius Committee on Fats and Oils (Swern, 1979).

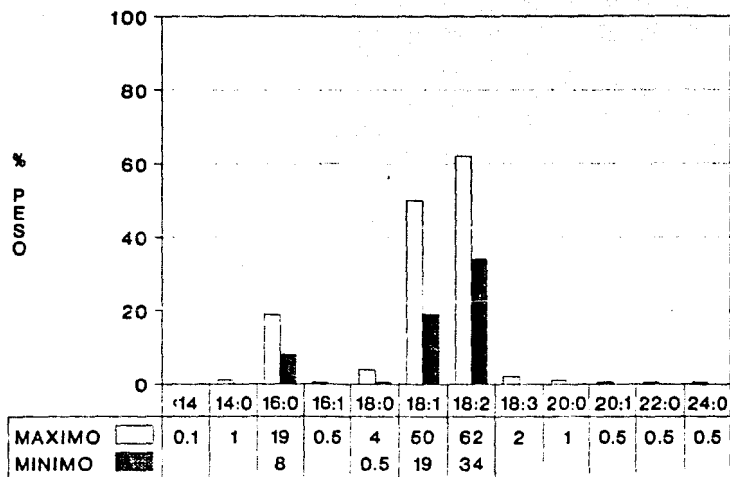


FIGURA 31.- Rango de distribución de ácidos grasos para el aceite de maíz (de la semilla de Zea mays), adoptado tentativamente por la FAO/World Health Organization Codex Alimentarius Committee on Fats and Oils (Swern, 1979).

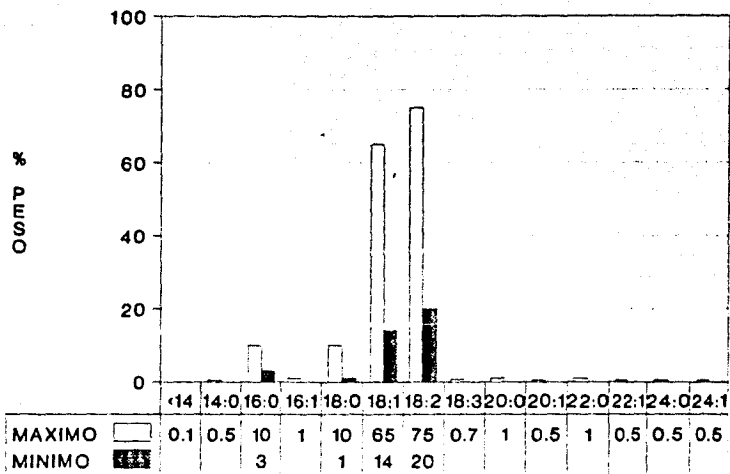


FIGURA 32.- Rango de distribución de ácidos grasos para el aceite de girasol (de la semilla de *Helianthus annuus*), adoptado tentativamente por la FAO/World Health Organization Codex Alimentarius Committee on Fats and Oils (Swern, 1979).

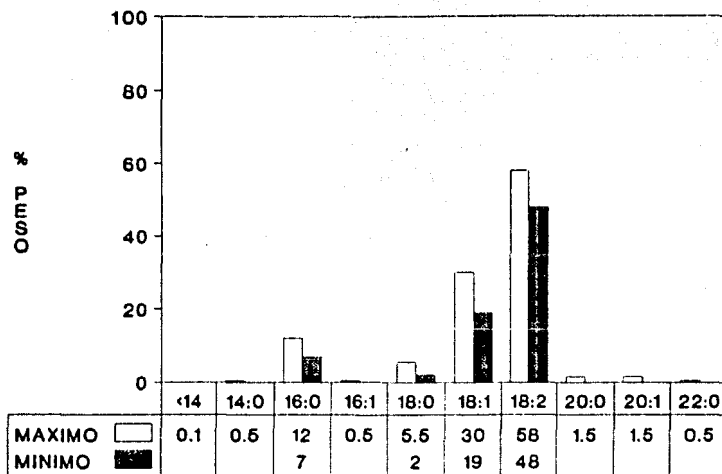


FIGURA 33.- Rango de distribución de ácidos grasos para el aceite de soya (de la semilla de Soja max), adoptado tentativamente por la FAO/World Health Organization Codex Alimentarius Committee on Fats and Oils (Swern, 1979).

B I B L I O G R A F I A

- Akhtar M.W. 1979. Lipase induction in fungi. & Professor M.I.D. Chughtai. Comm. vol. 115 - 123. *Abstract* Chemical Abstracts, 91(19), 5th November 1979, p246, no. 154361j. Columbus Ohio. USA.
- Anonimo. 1989. Chemical week. 145(18) November 1st, p25.
- Arends, I.N., Doroshov, V.V., Sverchkva, I.M. and G.D. Fedorova. 1986. Biosynthesis of lipase by Geotrichum candidum during submerged cultivation. Mikrobiologiya 22: 102-107.
- Arnold, R.G., Shahani, K.M. and B.K. Dwivedi. 1974. Application of lipolytic enzymes to flavor development in dairy products. Journal of Dairy Science 58(8): 1127-1143.
- Asther M., Corrieu G., Drapron R. and E. Odier. 1987. Effect of tween 80 and oleic acid on ligninase production by Phanerochaete chrysosporium INA-12. Enzyme Microb. Technol. 9: 245-249.
- Auberger, B., Lamberet, J. and J. Lenoir. 1985. Les activites enzymatiques de Penicillium camemberti. Sci. Aliments 5: 239-243.
- Bio-Rad. 1989. Biorad protein assay. LIT-33 89-0931 1089 USA 18pp.
- Bloquel R. and L.Veillet-Poncet. 1984. Factors contributing to production of microbial lipases. Microbiologie Aliments Nutrition 2: 179-185.
- Bedding, P. and M. John. Cleaning soft contact lenses. Pat Specif. (Aust). AU 628,853 (CI 602C13/00, 17 May 1983, Appl. 79/51, 885, 17 oct. 1979: 16 pp.
- Bulipeacu, L., Radu, G., Iliesu, N. and M. Grevenco. Pharmaceutical for treating intestinal disorders. Rev. RO 85,157 (CI. A61k37/48 128 de feb. 1985, Appl. 108,660, 21 sep. 1982: 2pp.
- Calvo, L. Cosmetics composition containing immobilized enzymes. U.S. us 4,556,554 (CI. 424-70; A61k7), 03 Dec. 1985, Appl. 269, 935 01 Jun. 1981: 5pp.
- Celerin, E.M. and C.L. Fergus. 1971. Effects of nutrients, temperature and relative humidity on germination and longevity of the ascospores of Cheatomium thermophile var. coprophile. Mycologia 63: 1030-1045.
- Chander, H., Batish, V.K. and D.K. Ghodekar. 1981., Factors affecting lipase production in Rhizopus nigricans. J. Dairy Sci. 64: 193-196.
- Chander, H. Batish, V.k., Sannabhadri, S. and R. Srinivasan. 1980. Factors affecting lipase production in Aspergillus wentii. J. Food. Sci. 45: 598-600.

- Chander, H., Sannabhadh, S., Elias, J. and B. Ranaganathan. 1977. Factors affecting lipase production by Penicillium chrysogenum. J. Food Sci. 42: 1677-1682.
- Cottle, W.E. 1987. Unraveling proteases roles. Biotechnology 5(2): 108-109.
- Crossman, T.L. Use of whey-derived products as cheese flavors agents of enhancers. U.S. us 4,500,549 (CI. 426-33; A23C21/02), 19 Feb. 1985, Appl. 472,735, 07 Mar 1983: 7pp.
- Darwish, S., Ezzat, M. and R. Mashaly. 1989. Accelerated ripening of Ras Cheese by using some enzymes and trace elements. Egyptian Journal of Dairy Science 17(2): 297-305.
- Del Rio, J.L., Serra P., Valero', Poch M., and C. Soia. 1990. Reaction scheme of lipase production by Candida rugosa growing on olive oil. Biotechnol. Letters 12(11) 835-838.
- Eitenahller, R.A. Vannand, J.R. and M. Shahani. 1970. Production and properties of Penicillium roqueforti lipases. J. Food Sci. 35: 130-133.
- Espinosa, E., Farres, A. and S. Sanchez. 1990. Nutritional factors affecting lipase production by Rhizopus delemar CDBB H313. Biotechnol. Letters. 12 (3) 209-214.
- Espinosa, E. 1990. (Ed). Mejoramiento de las condiciones de produccion de lipasa de Rhizopus delemar destinada a la modificacion de un sustrato lacteo. Tesis para obtener el grado de Maestria en Biotecnologia. UACPYP, CCH, Instituto de Investigaciones Biomedicas, UNAM, Mexico, D.F.
- Faith W. T., Neubeck C.E. and E.T. Reese. 1971. Production and applications of enzymes. Adv. Biochem. Eng. 1: 77-111.
- Fuji Oil Co. and Ltd., Cocoa butter substitute. Jpn kokai Tokkyo koho JP 81.163,196 (CI. C11C3/10), 15 Dec 1981, Appl. 80/67,555, 20 May 1980: opp .
- Gerhartz W. 1990. Enzymes in Industry. Production and Applications. VCH. Federal Republic of Germany. pp 89.
- Gillis, A. 1988. Research discovers new roles for lipases. J. Amer. Oil Chem. Soc. 65(6): 846-850.
- Godfrey, T. and J. Reichelt. 1983. Industrial Enzymology. The application of enzymes in industry. The Nature Press, USA, pp 1-5.
- Hegedus D.D. and G.G. Khachatourians. 1988. Production of an extracellular lipase by Beauveria bassiana. Biotech. Letters. 10(9) 637-642.

Hofelmann, M., Hartmann, J., Zink, A. and P. Schreyer. 1985. Isolation, purification and characterization of lipase isoenzymes from a technical Aspergillus niger enzyme. Journal of Food Science 50: 1721-1725.

Hofelmann, M., Kittsteiner-Eberl, R. and P. Schreyer. 1983. Ultrathin-layer agar gels: a novel print technique for ultrathin isoelectric focusing of enzymes. Analytical Biochemistry 128: 217-222.

Ibrahim, C. O. Hayashi, M. and S. Nagai. 1987. Purification and some properties of a thermostable lipase from Humicola lanuginosa No. 3 Agric. Biol. Chem. 51(1): 37-45.

Institute for Production and Development and Science. Rice cooking without prior washing. Jpn. Kokai Tokkyo Koho, JP 60 38,047 [85 58,047] (CI A23L1/10), 04 Apr 1985, 07 Sep 1983 7 pp.

Isobe K., Akiba T., and S. Yamaguchi. 1988. Crystallization and characterization of lipase from Penicillium cyclopium. Agric. Biol. Chem. 52(1) 41-47.

Jacobsen I. Jensen B., Olsen J. and Allermann K. 1989a. Extracellular and cell-bound lipase activity in relation to growth of Geotrichum candidum. Appl. Microbiol. Biotechnol. 32(3) 256-261.

Jacobsen I., Olsen J., Allermann K., Poulsen O.M. and J. Hau. 1989b. Production, partial purification, and immunochemical characterization of multiple forms of lipase of Geotrichum candidum. Enzyme Microb. Technol. 11(2) 90-95.

Kilara A. 1985. Enzyme-modified lipid food ingredients. Process Biochem. 19: 35-45.

Kornacki, K., Stepaniak, L., Adamiec, I., Grabska, J. and K. Wrona. 1980. Production of lipases and proteases by moulds of Penicillium roqueforti and Penicillium candidum under selected conditions of surface and submerged cultivation. Acta Alimentaria Hungarica 6(4): 281-287.

Kouker, G. and K.G. Jaeger. 1987. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. Applied and Environmental Microbiology 53(1): 211-213.

Lamberet, G. and Lenoir, J. 1976. Le caracteres du systeme lipolytique de l'espece Penicillium caseicola. Purification et proprietes de la lipase majeure. Le Lait 56: 622-644.

Little T.M. and F.J. Hills. 1978. Agricultural Experimentation Design and Analysis. Willey & Sons, USA. pp 48-51 y 140-147.

Lowry, O.H. Rosebrough N.J., Fair L. and Randall R.J. 1951. Protein measurement with foolin phenol reagent. J. Biol. Chem. 93: 265-275.

Lupova, L.M., Fedorova, L.G., Grebeshova, R.N., Arianina, Z.F., Anton, A.G., Belineki, A.L. and M.I. Alekseeva. Enzyme-containing detergent for presterilising treatment of medical instruments. U.S.S.R. SU 1,132,288 (Cl. C11P1/12), 07 Jan 1985, Appl. 3,278,102, 13 May 1982.

Macrae, A.R. Extracellular microbial lipases. 1987. In: Fogarty W. (Ed.) Microbial Enzymes and Biotechnology. Applied Science Publishers, London and New York: 225-249.

Macrae, A.R. 1989. The versatility of lipases for industrial uses. Trends in Biochemical Science 14(4): 125-126.

Macrae, A.R. and Hammond, R.C. 1985. Microbial lipases Biotechnol. Genet. Eng. Rev. 3: 193-217.

Matute Chevreuil P. J. 1992. Produccion y evaluacion de sistemas enzimaticos lipoliticos obtenidos por fermentacion en estado solido con Penicillium candidum y su aplicacion en la elaboracion de un ingrediente modificado enzimaticamente con sabor a queso. Tesis para obtener el titulo de Licenciado en Nutricion y Ciencia de los Alimentos en el area de Tecnologia de Alimentos. Universidad Iberoamericana, Mexico, D.F. pp 26-29 y 42.

Menassa, A. and G. Lamberet. 1982. Contribution a l'etude du systeme lipolytique de Penicillium roqueforti. Caracteres compares de deux activites exocellulaires. Le Lait 62: 32-40.

Montgomery D.C. 1984. Design and Analysis of Experiments. 2nd edition. John Wiley & Sons. pp 59-66.

Moskowitz G.J., Shen T., West I.R., Cassaigne R. and L.I. Feldman. 1977. Properties of the esterase produced by Mucor miehei to develop flavor in dairy products. J. Dairy Sci. 60: 1260-1265.

Muderhwa, J.M., Ratomabenina, R., Pina, M., Graille, J. and P. Galzy. 1986. Purification and properties of the lipases from Rhodototula pilimanae Hedrick and Burke. Appl. Microbiol. Biotechnol. 23: 348-354.

Muderhwa, M., Ratomabenina, R., Pina, M., Graille, J. and P. Galzy. 1985. Purification and properties of the lipase from Candida deformans (Zach) Langeron and Guerra. J. Amer. Oil Chem. Soc. 62: 1031-1036.

Nahas, E. 1988. Control of lipase production by Rhizopus oligosporus under various growth conditions. J. Gen. Microbiol. 134: 227-233.

Nakashima, T., Fukuda, H., Kyotani, S. and H. Morisawa. 1988. Culture conditions for intracellular lipase production by Rhizopus chinensis and its immobilization within biomass support particles. J. Ferment. Technol. 66: 441-448.

Novo Enzyme Information. 1987. Informacion de producto preliminar: Palatase M 1000 L. Un preparado de lipasa para reforzar el sabor de los productos alimentarios. IB number 325-E; initials NAL/J/P/EO; supercedes No. 325c-6b. 9 pp.

Okeke C.N. and H.C. Guhani. 1989. Lipases of Fonseca pegrosoli and Phialophora verrucosa. Antonie van Leeuwenhoek, 54(4) 317-324.

Okeke C.N. and B.N. Ogblo. 1990. The effect of cultural conditions on the production of lipase by Acromonium strictum. Biotechnol. Letters 12(10): 747-750.

Okumura S., Iwai M. and T.J. Tsujisaka. 1980. Purification and properties of the lipases from Penicillium cyclopium M1. J. Biochem 87: 205.

Orozco M.E., Nurko E. y A. Farres. 1989 Aplicaciones de las lipasas en la generacion de sabores lacteos. En: Farres A. y H. Carreño (Ed.) Biocnologia aplicada a la elaboracion de saborizantes. Sociedad Mexicana de Saboristas A.C. Mexico, D.F.

Pal, N., Das, S. and K. Kundu. 1978. Influence of culture and nutritional conditions on the production of lipase by submerged culture of Aspergillus niger. J. Ferment. Technol. 5(10) 593-598.

Parkinson, G. 1990. New uses are on the pipeline for enzymes. Chemical Engineering: 30-35.

Penz, P.J.. Stain remover and methods. Ger. Offen. DE 3,223,56B (Cl. C11D3/38b), 27 Dec 1982, Appl 24 Jun 1982: 10pp.

Petrovic S.E., Skrinjar M., Becarevic A., Vujicic I.F. and L. Banka. 1990. Effect of various carbon sources on microbial lipases biosynthesis. Biotechnol. Letters. 12(4) 299-304.

Pharmacia. 1984. Polyacrilamide gel electrophoresis laboratory techniques. Revised edition. Fehms i Lund. Swden. pp.

Pitt, J. 1979. (Ed) The genus Penicillium and its teleomorphic states Eupenicillium and Talaromyces Academic Press. London: 358-361.

Rekhina, N.I., Gorbunov, K.A., Novikova, M.V., Abramova, L.S., Agapoya, S.k. and I.D. Kozubenko. 1984. Production of fish protein preparations and fibrous protein based on them. In: B.y.k.o.v. VP edited by Technol. Rybn. Prod. Inst. Morks. Rybn. khoz. Okeanog, Moscow, USSR: 71-5.

Richards, E.G. and R. Lecanidov. 1974. (Ed) Electrophoresis and Isoelectric Focusing in polyacrilamide gels. de Gruyter Berlin: 16.

Rivera-Munoz, G., Tinoco-Valencia, J.R., Sanchez, S. and A. Farres. 1991. Production of microbial lipases in a solid state fermentation system. Biotechnol. Letters 13(4) 277-280.

Rivera Muñoz G. Desarrollo de un proceso biotecnológico para la producción de enzimas lipolíticas. tesis para obtener el grado de Doctor en Biotecnología, UACFYR, CCH, Instituto de Investigaciones Biológicas, UNAM, México, D.F. (en proceso).

Rose A.H. 1976. Chemical microbiology. An introduction to microbial physiology, 3rd. edition. Butterworths, England. p191.

Saad, A., Markakis, P. and C. Ramesh. 1990. Lipase of Penicillium caseicola. J. Agric. Chem. 28: 598-601.

Samad-NyA. Razak-CNA, Salleh-AB, Yunus-WMW, Ampon-k. Basri-M. 1989. A plate assay for primary screening of lipase activity. J. Microb. Methods 9(1): 51-56.

Samson R.A., Eckardt C., and R. Orth. 1977. The taxonomy of Penicillium species from fermented cheeses. Antonie van Leeuwenhoek 43: 341-350.

Sanchez, S. and A. Farres. 1987. Regulación de enzimas microbianas. en: Tecnología enzimática. Aplicaciones en alimentos y medicina. Lopez-Munguia, A. y Guintero, R. (editores). UNAM, México, D.F.: 37-46.

Seitz E.W. 1974. Industrial application of microbial lipases: a review. J. Amer. Oil Chem. Soc. 51: 12-16.

Shigematsu, H., Moridhita, I., Aoyanagi, Y. and Y. Kaburagi. Manufacture of tobacco flavorants from tobacco extracts. Jpn. Kokai Tokyo Koho JP 61 67,467 [86 67,469] (Cl. A24B3/12), 07 Apr 1986, Appl. 84/188, 775, 11 Sep. 1984: 9pp.

Solomons G.L. 1969. Materials and methods in fermentation. Academic Press. USA. p .

Stepaniak, L., Kornachi, K., Grabska, J., Rymaszewski, J. and G. Cichosz. 1980. Lipolytic and proteolytic activity of Penicillium roqueforti, Penicillium candidum and Penicillium camemberti strains. Acta Alimentaria Poionica 6(3): 155-163

Stryer L. 1988. Biochemistry, 3rd. edition. Freeman. USA. pp 427-433 y 469-478.

Strauch-Milstein M. M., 1989. Historia de la Biotecnología. Ciencia y Desarrollo 14(84):19-32

Swern, D. 1979. (Ed). Bailey's industrial oil and fat products. 4th edition. 1. John Willey and Sons. New York, Chichester: 368-403.

Sztajer, J., Maliszewska, I. and J. Wieczorek. 1988. Production of exogenous lipases by bacteria, fungi and actinomycetes. Enzyme Microb. Technol. 10: 492-497.

Tahoun, M.F. and H. A. Ali. 1986. Specificity and glyceride synthesis by mycelial lipases of Rhizopus delemar. Enzyme Microb. Technol. 8: 429-432.

Technology and Newsletter. 1989. Enzymes market study. Chemical Week, November 1 145(18):75.

Tinoco Valencia R. 1988. Produccion de lipasas microbianas en un sistema de fermentacion semisolido. Tesis para obtener el titulo de Biologo. Facultad de Ciencias, UNAM, Mexico, D.F.

Trommier Klaus Riedel and Werner. Descomposition of clarifier sludge and manure. Ger.(East) DD 149,057 (Cl.002F11/14). 24 Jun 1981, Appl. 212,681 02 May 1991: 5 pp.

Tueme J.J. 1988. Sabores. En: Avances en activos para la industria alimentaria. Programa Universitario de Alimentos, UNAM. 25-29 de julio de 1988.

Urata, K., Hirota, Y., Yokomichi, H. H. and Y. Kamara. 1988. Enzyme preparation for interesterification. United States Patent US 4,735,900 (En) [Priority JP 84-270317 (841221)] (Sao, Tokyo, Japan).

Vazquez D. 1981. Inhibidores de la sintesis de proteinas. Investigacion y Ciencia, edicion en Espanol de Scientific American. 62: 130-143.

Veeraragavan K., Colpitts I., and B.F. Gibbs. 1990. Purification and characterization of two distinct lipases from Geotrichum candidum. Biochim. Biophys. Acta 1044(1) 26-30.

West, S. 1988. How enzymes help the dairy industry. Food Manufacture 63(5): 29,31.

Yoshizumi, H., Amachi, T., Kusumi, T., Tanaka, T., and H. Ishigooka. Hair tonic to control dandruff and itching and stimulate hair growth. Eur. Pat. Appl. EP 117,867 (Cl.A61K7/06), 29 Aug 1984, JP Appl. 83/14, 556, 02 Feb 1983: 29pp.