



*FACULTAD DE CIENCIAS  
NATURALES Y EXACTAS*

***Selección de hongos lipolíticos aislados  
de áreas contaminadas con desechos  
oleosos en una refinadora de aceite  
vegetal***

***Tesis presentada en opción al Título  
Académico de Máster en Biotecnología  
(Mención Industrial)***

*Autor:*

*Lic. Andrea Caridad Alfonseca Ladrón de  
Guevara*

*Tutor (es):*

*Dr. C. Manuel de Jesús Serrat Diaz*

*Dr.C. Luis Beltrán Ramos Sánchez*

2017



Facultad de Ciencias Naturales y Exactas  
Centro de Estudios de Biotecnología Industrial  
Departamento de Biología

# **SELECCIÓN DE HONGOS LIPOLÍTICOS AISLADOS DE ÁREAS CONTAMINADAS CON DESECHOS OLEOSOS EN UNA REFINADORA DE ACEITE VEGETAL**

Tesis en opción al título académico de:

**MASTER EN BIOTECNOLOGÍA**

**MENCIÓN INDUSTRIAL**

**Autora:**

**Lic. Andrea Alfonseca Ladrón de Guevara**

**Tutores:**

**Dr. C. Manuel de Jesús Serrat Díaz**

**Dr. C. Luis Beltrán Ramos Sánchez**

**Santiago de Cuba, 2017**

# *Dedicatoria*



*A mami por todo su amor*  
*A papi por su cariño y comprensión*  
*A Nanda por ser diferente pero sobre todo por ser especial*  
*A mis abuelos Dania, Douglas, Angelina, Carlos y Caridad*  
*A Dios por guiar mis pasos y mostrarme la luz cuando solo vi oscuridad*

*Agradecimientos*



*Es difícil agradecer a todas las personas que formaron parte de la realización de esta tesis y que contribuyeron a mi crecimiento personal y profesional en estos tres años.*

*A mis padres Tamara y Jorge, a mis hermanos Angelina, Kiki y Nanda, a mis tíos por ser sencillamente mi familia.*

*A mis abuelos por estar a mi lado a pesar de todo.*

*A mi tutor (papá Manuel) gracias por acogerme como su pupila, por estar siempre a mi lado y por enseñarme a amar y a sentir pasión en todas las cosas que hago.*

*A mis compañeros del CÉBI: Yane, Leonor, tía Miladis, Anita, Fluguito, Daniel, Karelina, Odalis, Isabel, Migdalia, Gabriel, mamá Irasema, Yanet, Daisa y a los profesores Morris, Yaixa, Nora, Catalina, gracias por todo lo aprendido, pero sobre todo por haberme acogido como un miembro más de ese colectivo.*

*A mis colegas de la 9na Edición: Esti, Taniyurqueis, Cristobal, Keli, Yadira, Argenis, Carlos, Juan Carlos, Osmar, Marileysis, Taimí gracias por las horas de estudio y por todos los buenos momentos compartidos.*

*A mis compañeros del departamento de Biología: Disney, Miladis, Carmen y Anolandis. A los profesores: Onaylis, Joaquín, Ania, Mixeyita, Bigan, Efrén, Lianne, Danielito, Adrcian Trapero, Bernardo, por estar siempre dispuestos a hacer de mí una mejor bióloga.*

*Es imposible no agradecer a la primera persona que guió mis pasos dentro del laboratorio, que me enseñó confianza y responsabilidad cuando aún era una estudiante de 4to año de la carrera: A Katya muchas gracias.*

*A mi gente de la hora del café: Abdiel, Janna, Susana, Mario, Lisandra Javier, Pedro Alejandro, Juanca, gracias por las risas y los buenos ratos.*

*A mis amigos Angel, David, Devin, Cinara, Alejandro, Reidel, José Carlos gracias por los años de amistad.*

*A Ale por su paciencia y amor.*

*A los frikis (Chino, Yenila, Eduardo, Javier, Adriana, Jesús, Gonzalo) gracias por las frikifiestas, y los frikichismes, las comidas y los buenos momentos pero sobre todo gracias por regalarme mi bien más preciado: su amistad.*

*A Dios gracias por la fe y la esperanza.*

*A todas las personas que contribuyeron en la realización de esta tesis de una forma u otra Muchas Gracias.*

*Exergo*



*“Bueno es ir a la lucha con determinación, abrazar la vida y vivir con pasión. Perder con clase y vencer con osadía, porque el mundo pertenece a quien se atreve y la vida es mucho más para ser insignificante”*

*Charles Chaplin*

# *Resumen*



Las lipasas constituyen una alternativa promisoría para el reemplazo de la catálisis química en la síntesis del biodiesel. En particular, las lipasas fúngicas son las más utilizadas debido a su menor costo y a su mayor estabilidad operacional. El presente trabajo estuvo dirigido hacia la búsqueda de nuevas cepas fúngicas productoras de lipasas, asociados a sitios contaminados con residuos del procesamiento de aceites vegetales. Se aislaron 40 cepas de microorganismos con actividad lipolítica provenientes de hábitats contaminados en una refinadora de aceite vegetal, con predominio de los hongos filamentosos sobre las levaduras. La evaluación cualitativa de la actividad lipolítica de los aislados fúngicos en medios conteniendo rodamina B y Tween+CaCl<sub>2</sub>, destacó 12 cepas, todas de hongos filamentosos y con predominio de aislados procedentes de muestras sólidas, por presentar resultados significativamente superiores al resto. La caracterización cinética corroboró la existencia de dos máximos de acumulación de lipasas, a las 48 y 120 horas, correspondiendo el primero con la fase de catabolismo del sustrato y la segunda con el metabolismo secundario. Se seleccionaron dos cepas, MS2-8 y MA5-35, con actividad lipolítica superior a las 500 U/l y concentraciones de biomasa de 20 mg/ml en ambos casos. Estos resultados sirven de base para estudios futuros encaminados a la obtención y aplicación de las lipasas en la síntesis del biodiesel.

**Palabras clave:** hongos filamentosos, lipasas, biodiesel, aceite de soya

# *Abstract*



Lipases are a promising alternative for the replacement of chemical catalysis in the biodiesel synthesis. In particular, fungal lipases are the most used because of their lower cost and greater operational stability. The present work was aimed towards the search for new lipase-producing fungal strains, associated with sites contaminated with residues from the processing of vegetable oils. . 40 fungal strains with lipolytic activity were isolated from contaminated habitats from vegetable oil refiner, with the predominance of filamentous fungi over yeasts. The qualitative evaluation of the lipolytic activity of the fungal isolates in media containing rhodamine B and Tween + CaCl<sub>2</sub> highlighted 12 strains, all of them with filamentous fungi and with predominance of isolates from solid samples, as they presented results significantly superior to the rest. The kinetic characterization corroborated the existence of two lipase accumulation maxima, at 48 and 120 hours, the first corresponding to the catabolism phase of the substrate and the second with the secondary metabolism. Two strains, MS2-8 and MA5-35, with lipolytic activity higher than 500 U/l and biomass concentrations of 20 mg/ml were selected. These results are the basis to future studies aimed at obtaining and applying lipases in the synthesis of biodiesel.

**Key words:** filamentous fungi, lipases, biodiesel, soybean oil

# *Índice*



<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	6
1.1 Las Enzimas .....	6
1.1.1 Producción de enzimas microbianas .....	8
1.2 Microorganismos lipolíticos .....	9
1.2.1 Hongos.....	11
1.3 Métodos de aislamiento .....	12
1.4 Factores que influyen en la producción de lipasas .....	13
1.5 Métodos para evaluar la actividad enzimática de lipasas .....	14
1.5.1 Evaluación de la actividad lipolítica por técnicas cualitativas .....	14
1.6 Las lipasas.....	15
1.6.1 Aplicaciones de las lipasas.....	17
1.7 Biodiesel.....	19
1.7.1 Métodos de producción del biodiesel.....	20
1.7.2 Reacción de transesterificación.....	20
1.7.3 Catalizador enzimático .....	21
1.8 Lipasas y Biodiesel .....	23
1.8.1 Perspectivas de las lipasas .....	24
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	26
2.1 Recolección y naturaleza de las Muestras .....	26
2.2 Medios de Cultivo .....	27
2.3 Soluciones .....	28
2.4 Aislamiento, selección y purificación de microorganismos con actividad lipolítica ...	29
2.5 Evaluación cualitativa de la actividad lipolítica .....	30
2.6 Evaluación cuantitativa de la actividad lipolítica extracelular en medio líquido .....	31

2.7 Caracterización de la cinética de la fermentación del proceso de producción de lipasas en medio líquido por las cepas seleccionadas .....	32
2.7.1 Determinación de pH.....	33
2.7.2 Determinación del peso seco de la biomasa .....	33
2.7.3 Determinación de la actividad enzimática lipolítica .....	34
2.7.4 Determinación de grasa residual en los medios de cultivo .....	35
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>36</b>
3.1 Aislamiento, selección y purificación de microorganismos con actividad lipolítica ...	36
3.2 Evaluación cualitativa de la actividad lipolítica. ....	39
3.3 Evaluación cuantitativa de la actividad lipolítica extracelular en medio líquido .....	42
3.4 Caracterización de la cinética de la fermentación del proceso de producción de lipasas en medio líquido por las cepas seleccionadas .....	47
3.4.1 Crecimiento microbiano y variación del pH durante la fermentación.....	47
3.4.2 Cinética de la producción de lipasas. ....	50
3.4.2.1 Relación entre el consumo de sustrato y la producción de lipasas. ....	55
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>58</b>
<b>RECOMENDACIONES .....</b>	<b>59</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>60</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>67</b>
Anexo 1: Hoja técnica aceite de soya. ....	67

# *Introducción*



Desde el advenimiento de la era industrial a fines del siglo XIX, el consumo de energía fósil no deja de aumentar de manera exponencial. Según datos de la Agencia Internacional de Energía (AIE), el consumo mundial de petróleo asciende actualmente a más 86 millones de barriles diarios, lo cual ha generado una dependencia energética creciente de los países no productores de este rubro.

En los últimos años el panorama energético mundial ha variado notablemente como consecuencia de la tendencia creciente hacia la sustitución de los combustibles fósiles por biocombustibles. La alarmante disminución de las reservas de energía fósil y las crecientes preocupaciones sobre los daños que causan al planeta las emisiones de gases de efecto invernadero han sido los móviles impulsores principales de estos cambios en la matriz energética. Alrededor del 98% de las emisiones de dióxido de carbono son producto de la combustión de combustibles fósiles, por lo que los biocombustibles líquidos y gaseosos se han hecho más atractivos debido a sus beneficios medioambientales (Dincer, 2008).

Entre los biocombustibles líquidos de mayor uso en la actualidad se encuentra el biodiesel, el cual se define como un combustible formado por ésteres monoalquílicos de ácidos grasos de cadena larga derivados de aceites vegetales o grasas animales (Borges & Díaz, 2012). El biodiesel no requiere ninguna modificación ni ajustes de los componentes del sistema de alimentación de los motores o el sistema de almacenamiento de combustible (Gerhard, Van Gerpen, & Krahl, 2005). Además, puede usarse puro como reemplazo o como combustible mixto, en proporciones apropiadas con el diesel de petróleo. Otra ventaja del biodiesel es que es sintetizado de fuentes renovables, principalmente de aceites vegetales no comestibles, contribuyendo muy poco al aumento de la proporción del anhídrido carbónico atmosférico debido a que las plantas, durante su crecimiento, lo consumen de la atmósfera mediante la fotosíntesis, devolviéndolo a ésta en el momento de la combustión del biocombustible. Según la "Comisión Europea de Biodiesel" el uso de este combustible permite reducir entre un 65 y un 95% las emisiones de anhídrido carbónico respecto al petrodiesel. Además, el

biodiesel permite la reducción de emisiones de partículas finas y de contaminantes como el monóxido de carbono, el dióxido de azufre y los óxidos de nitrógeno (Dincer, 2008; Sagar, Soni, Mathur, & Sharma, 2009).

El biodiesel se produce tradicionalmente mediante la reacción de transesterificación de los triglicéridos con metanol o, en menor medida, etanol. Esta reacción tiene lugar en presencia de un exceso considerable del alcohol y es catalizada industrialmente mediante la adición de carbonato o hidróxido de sodio (Soares, Ferreira, Guilherme, Mitchella, & Krieger, 2013). Este proceso produce, por cada molécula de triglicérido, tres moléculas de ésteres metílicos o etílicos, según el alcohol usado y una molécula de glicerol, compuesto este fatal para los motores. Para eliminar el glicerol del biocombustible se usan grandes cantidades de agua, la cual se recupera contaminada por el hidróxido o carbonato sódico usados para la catálisis (Borges & Díaz, 2012). Debido a las legislaciones de protección ambiental, estos desechos deben tratarse antes de su remoción de la planta industrial, aumentando así de manera significativa los costos de producción del biocombustible (Borugadda & Goud, 2012).

En los últimos años, la utilización de enzimas como biocatalizadores en procesos químicos ha aumentado considerablemente debido a sus incuestionables ventajas con respecto a los catalizadores químicos convencionales. Las enzimas son selectivas y específicas, presentan condiciones de trabajo de fácil manejo (temperatura, presión y pH cercanos a los ambientales) y en las reacciones por ellas catalizadas usualmente no se forman productos secundarios, típicos de procesos químicos, con lo cual se reducen las etapas de purificación del producto deseado y se facilita la recuperación del biocatalizador (Dalla-Vecchia, Nascimento, & Soldi, 2004).

Una alternativa prometedora al uso de esta catálisis en ambiente básico consiste en el uso de biocatalizadores enzimáticos como las lipasas. Las lipasas (EC.3.1.1.3) son una clase de serina hidrolasas que pertenecen a la superfamilia  $\alpha/\beta$  hidrolasas (González, Rodríguez, & Del Monte, 2010). Desde un punto de vista fisiológico, estas enzimas catalizan las reacciones de catabolismo de triglicéridos en ácidos grasos y glicerol, ocupando un lugar central en el metabolismo de los

lípidos. *In vitro*, las lipasas pueden actuar como modificadores de triacilglicéridos catalizando, además de la hidrólisis, diferentes reacciones sintéticas como son las de esterificación y transesterificación (González et al., 2010). El empleo de la catálisis enzimática en la obtención de biodiesel, además de las ventajas inherentes a cualquier biocatalizador, evita el uso del carbonato o hidróxido de sodio, reduce drásticamente el consumo de agua y puede suprimirse completamente la formación de glicerol como producto de la reacción (González et al., 2010).

Las lipasas obtenidas a partir de microorganismos, principalmente hongos, son más utilizadas que las aisladas de plantas o de origen animal debido a sus menores costos de producción y a que presentan una mayor estabilidad y actividad durante la reacción. Sin embargo, a pesar de las grandes ventajas que tiene la aplicación de las lipasas en diferentes tipos de industrias, incluida la del biodiesel, sus altos costos de producción limitan su uso (Aceves & Castañeda, 2012). En este sentido la exploración de nuevos microorganismos productores de estas enzimas constituye un tema de intensa actividad en la actualidad, debido a la gran versatilidad de las lipasas microbianas.

En atención de lo antes expuesto, el presente trabajo se dirige hacia la búsqueda de nuevas cepas de hongos filamentosos y levaduras productores de lipasas, asociados a ecosistemas poco estudiados como son los sitios contaminados con residuos del procesamiento de aceites vegetales, que sirvan de base a estudios futuros encaminados a la producción industrial de lipasas por fermentación y a su evaluación como biocatalizadores para la obtención de biodiesel.

La presente investigación pertenece al proyecto "Desarrollo de una tecnología a escala piloto para la producción de biodiesel de residuos agroindustriales lignocelulósicos", el cual forma parte del Programa Nacional de Ciencia y Técnica "Desarrollo de Fuentes Renovables de Energía" y en el que participa el Centro de Estudios de Biotecnología Industrial.

**Problema:**

- ¿Es viable la selección de cepas fúngicas lipolíticas aisladas a partir de hábitats contaminados con residuales oleosos, capaces de producir y acumular lipasas extracelulares potencialmente útiles para su uso en procesos productivos?

**Hipótesis:**

- Si se establece una estrategia adecuada para el aislamiento y selección de hongos lipolíticos a partir de hábitats contaminados con residuales oleosos entonces será posible disponer de cepas productoras de lipasa extracelular potencialmente útiles para su uso en procesos productivos.

**Objetivo General:**

- Seleccionar hongos lipolíticos a partir de hábitats contaminados con desechos oleosos en una refinadora de aceite vegetal con capacidad para la producción de lipasas extracelulares en medio líquido.

**Objetivos específicos:**

- Aislar hongos y levaduras con actividad lipolítica a partir de hábitats contaminados con residuos oleosos en una refinadora de aceite vegetal.
- Evaluar de forma cualitativa la actividad lipolítica de los hongos y levaduras aislados.
- Cuantificar la actividad lipolítica extracelular de las cepas con mejores resultados en los ensayos cualitativos
- Caracterizar la cinética de la fermentación del proceso de producción de lipasas en medio líquido para las cepas seleccionadas

**Justificación del trabajo:**

**Ambiental:** Las lipasas como biocatalizadores enzimáticos constituyen una alternativa sostenible al uso de catalizadores químicos en la reacción de transesterificación implicada en la producción de biodiesel. Las enzimas operan en

condiciones de trabajo de fácil manejo (temperatura, presión y pH cercanos a los ambientales), evitando condiciones extremas de reacción, nocivas al medio ambiente. El empleo de la catálisis enzimática en la obtención de biodiesel, además, evita el uso de agentes cáusticos (carbonato o hidróxido de sodio) y reduce drásticamente el consumo de agua.

**Económica:** Los biocatalizadores enzimáticos como las lipasas permiten, por un lado, no tener que acudir a más reactivos químicos costosos (álcalis) y reduce significativamente el consumo de agua en el proceso. Al evitarse la formación de glicerol durante la síntesis enzimática del biodiesel se obtiene un enorme beneficio en la preservación de la vida útil de los motores de combustión interna, los cuales son seriamente afectados por la presencia de esta sustancia en el biocombustible.

**Bioteconológica:** La selección de nuevos microorganismos productores de lipasa, constituye no solo una fuente potencial de biocatalizador para la industria del biodiesel, sino también para un amplio campo de aplicaciones dentro de la síntesis química.

**Social:** el empleo de lipasa como catalizadores enzimáticos contribuye a mejorar el proceso de producción de biodiesel sustituyendo a los catalizadores químicos y por tanto a los residuos que estos puedan liberar. Los biocombustibles han tenido un impacto positivo en la salud de las personas, ya que reducen la emisión de los gases del efecto invernadero.

*Revisión  
Bibliográfica*



## 1.1 Las Enzimas

Todos los procesos de la vida, ya sea vegetal, animal o microbiana, dependen para el crecimiento y mantenimiento celular de una compleja red de reacciones químicas catalizadas por enzimas, también existen ácidos ribonucleicos con capacidad catalítica llamados ribosimas. Las enzimas, son sustancias de naturaleza proteica que catalizan reacciones químicas en los sistemas biológicos siempre que sea termodinámicamente posible es decir aumentan la rapidez de una reacción química sin sufrir un cambio químico permanente en si mismas, por lo cual, también son conocidas como biocatalizadores. Estas disminuyen la energía de activación de las reacciones que catalizan, de forma que se acelera la tasa de reacción (Vera, 2007). Las enzimas se han utilizado extensamente como catalizadores industriales y la tendencia actual es su uso en procesos de la denominada industria verde en la que se refleja la necesidad de disponer de estrategias que ayuden a conseguir el desarrollo sostenible y a reconducir los patrones actuales de consumo y producción hacia vías más sostenibles a largo plazo, respetando al mismo tiempo las restricciones de los recursos y sin perder de vista los límites de capacidad. Estos catalizadores poseen las siguientes características:

- Son de acción específica, y por lo tanto minimizan la aparición de reacciones secundarias indeseables.
- Son relativamente baratos y pueden catalizar reacciones bajo condiciones no tan exigentes.
- Son eficaces para las conversiones químicas (biocatálisis).
- Pueden ser producidos a gran escala por fermentación a partir de azúcares comunes y otros sustratos renovables.
- Pueden ser modificados y mejorados para adaptarse a una determinada aplicación.
- Son seguros y aceptables para aplicaciones en procesos de alimentos y tratamientos medicinales.

Las enzimas, sin embargo, a su vez exhiben muchas propiedades que difieren de los catalizadores en general (Morales & Muñoz, 2005). Tres propiedades importantes son:

- Su alto poder catalítico. La rapidez de ciertas reacciones es más alta en presencia de enzimas que en ausencia de ellas, las enzimas tienen capacidad para funcionar como catalizadores en un intervalo moderado de temperatura, pH y presión.
- Su especificidad. La mayoría de las enzimas, a diferencia de los catalizadores químicos, son altamente específicas en cuanto a la naturaleza del sustrato que utilizan y al tipo de reacción que catalizan lo que significa que la conversión del sustrato en producto, es catalizada por determinada enzima. De hecho, varias enzimas exhiben especificidad absoluta, lo cual quiere decir que solo actúan sobre determinado sustrato para formar un producto único.
- Regulación de la actividad enzimática. A diferencia de la catálisis química, la actividad enzimática puede regularse mediante iones o moléculas pequeñas.

Actualmente se han aislado y caracterizado más de 3,000 enzimas diferentes, sin embargo al menos 100 nunca se han utilizado en aplicaciones industriales. El mercado mundial de enzimas industriales superó los 3.5 mil millones de dólares al año en 2010 y estaba creciendo a un ritmo del 5-8 % anual. Más del 50 % de las ventas provienen de las enzimas proteolíticas para su uso en la industria de los detergentes, láctea y de cuero (Straathof, Panke, & Schmid, 2002). Las carbohidrasas, principalmente las amilasas, isomerasas, pectinasas, celulasas, y hemicelulasas que se utilizan en la elaboración de la cerveza, el etanol combustible, el almidón e industrias textiles, representan casi el 40 % del total del mercado enzimático. Las lipasas, fitasas, oxidorreductasas, y otras enzimas altamente especializadas conforman el resto de las ventas totales de dicho mercado. Si bien los mercados han madurado en regiones de América del Norte y Europa Occidental, incluyendo América Latina y Asia todavía se está experimentando un fuerte crecimiento impulsado por la demanda de la

alimentación de los animales, de los textiles, detergentes y las industrias de procesamiento de granos. Los principales productores de enzimas en todo el mundo son Novozymes A/S y Genencor, ahora parte de DuPont (Linton, Stone, & Wise, 2008).

Las enzimas son clasificadas y codificadas por la NC-IUBMB (Nomenclatura Comité of the Internacional Union of Biochemistry and Molecular Biology) de acuerdo con la reacción catalizada. La nomenclatura utiliza una abreviación E.C. (Enzyme Comisión) seguido de hasta 4 dígitos referentes a la clase y subclase a la que pertenece la enzima. Lipasa es el nombre genérico para un grupo de enzimas pertenecientes a la clase hidrolasa (E.C. 3.1) y que actúan sobre ligaciones éster (E.C. 3.1.1). Dentro de este grupo, destacan las “verdaderas lipasas” conocidas químicamente como triacilglicerol lipasas (E.C. 3.1.1.3), cuya definición clásica describe a estas enzimas como glicerol éster hidrolasas que actúan sobre ligaciones éster presentes en acilgliceroles, liberando ácidos grasos y glicerol, constituyendo esta enzima lipasa una clase especial de carboxil éster hidrolasas (carboxilesterasas) (Soares et al., 2013). El interés en el estudio de las lipasas ha crecido significativamente en años recientes debido al potencial que las lipasas poseen como biocatalizadores en medios orgánicos

### **1.1.1 Producción de enzimas microbianas**

Las enzimas han sido empleadas en la industria desde hace muchos años. Hay tres fuentes de enzimas: células animales, vegetales y microbianas. En años pasados, las plantas y los animales fueron las fuentes tradicionales de enzimas, pero dados los avances recientes de la biotecnología, probablemente el futuro está en los sistemas microbianos (Morales & Muñoz, 2005). Las razones son:

- Los sistemas de producción microbianos pueden mantenerse bajo estrecho control.
- Las concentraciones de enzimas y, por lo tanto, la productividad, se pueden manipular en forma genética y ambiental.

- El aumento progresivo y la alimentación del sistema no presentan el mismo problema logístico que una fuente derivada de la agricultura.
- El grado inherente de flexibilidad en el proceso por la gran variedad de actividades catalíticas de que disponen.
- Las enzimas microbianas pueden obtenerse en cantidades abundantes, económicas, de forma regular y calidad uniforme.

El primer aspecto a considerar en la producción de enzimas microbianas es la selección del microorganismo adecuado. Es aquí donde se tiene el mayor impacto de los avances recientes de la biotecnología (Morales & Muñoz, 2005). Las características deseables de un microorganismo son:

- El microorganismo no debe ser patógeno, ni estar asociado con la producción de toxinas.
- En principio, es preferible que la enzima sea producida extracelularmente debido a que evita la costosa etapa de recuperación y purificación.
- La enzima debe ser producida con altos rendimientos.
- El costo de producción debe ser razonable lo que implica que el microorganismo pueda crecer rápidamente, consumiendo los sustratos totalmente y con pocos requerimientos específicos.
- La selección del microorganismo puede hacerse en términos de las características deseadas para la enzima. Un ejemplo es la selección de microorganismos termofílos, con objeto de obtener enzimas termoestables.
- Se debe estudiar previamente el comportamiento del microorganismo; generalmente, la temperatura y el pH óptimo de crecimiento del microorganismo productor coinciden con los de producción de la enzima, es decir existen enzimas perfectamente asociadas al crecimiento del microorganismo, otras no (Morales & Muñoz, 2005).

## 1.2 Microorganismos lipolíticos

Las lipasas son sintetizadas por microorganismos principalmente en presencia de inductores como los lípidos. Se ha documentado que los aceites naturales como el

aceite de soya, los ácidos y ésteres grasos como los jabones, los esteroides como el colesterol, las sales biliares y detergentes se comportan como inductores. Así mismo los niveles de producción de lipasas microbianas varían significativamente entre las diferentes especies de microorganismos (Rosas, 2015).

Los microorganismos lipolíticos han sido estudiados inicialmente por Huss, en 1908, quien aisló como el causante de la rancidez de la leche a una bacteria a la que denominó *Bactridium lipolyticum*. Muchos microorganismos como hongos filamentosos, bacterias y levaduras son conocidas como buenos productores de lipasas. Se ha reportado el aislamiento primario de microorganismos lipolíticos a partir de efluentes de curtiembres. Para la Biodegradación de aceites se puede usar biosurfactantes y/o microorganismos biodegradadores. Los biosurfactantes disminuyen la tensión superficial de las interfases aceite / agua, permitiendo su separación en fases distintas y la posterior recuperación de los hidrocarburos. Si se diseña para los microorganismos biodegradadores la correcta combinación de nutrientes y oxígeno permitirá romper las cadenas químicas de hidrocarburo y desactivar sus propiedades (L.I. Mendoza, 2010).

Actualmente, muchos microorganismos son conocidos como buenos productores de lipasas que catalizan la hidrólisis de aceites y grasas. Estas enzimas son producidas intra-y extracelularmente en diversos microorganismos como hongos, bacterias y levaduras. Algunos géneros de bacterias particularmente conocidos por producir lipasas son: *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Moraxella* y *Staphylococcus*; entre los hongos tenemos a *Rhizopus*, *Geotricum*, *Aspergillus*, *Mucor* y *Penicillium*; y entre las levaduras resaltan *Candida*, *Rhodotorula* y *Hansenula*. Sin embargo, la propiedad de lipólisis está extendida en la naturaleza y no limitada a estos microorganismos (APHA., 2001) y su producción depende mucho de los factores ambientales, tales como temperatura, pH, sales minerales, fuentes de carbono, nitrógeno y de oxígeno (Aceves & Castañeda, 2012).

A pesar del gran número de microorganismos productores de lipasas, sólo algunas especies de bacterias se han evaluado para la producción de las mismas.. Entre las levaduras, el género *Cándida* es el que presenta una mayor producción de lipasas siendo las producidas por *C. rugosa* las que se han convertido en unas de

las más utilizadas por la industria, debido a su alta actividad en procesos tanto de hidrólisis como de síntesis (Rosas, 2015).

### 1.2.1 Hongos

Los hongos constituyen un grupo muy numeroso de microorganismos que presentan una amplia distribución en la naturaleza; actualmente se encuentran 72 000 especies, pero se calcula que existen más de 1.5 millones. Tienen una infinidad de formas y tamaños y pueden encontrarse en las condiciones ambientales más variadas. Aprovechan los nutrientes más simples contribuyendo a la descomposición de la materia orgánica y participando en los ciclos biológicos (Rosas, 2015). Son organismos de vida libre con una distribución amplia en el planeta, por lo tanto, se encuentran representantes de estos en condiciones climáticas extremas como las temperaturas árticas de menos 30°C y tan elevadas como 70°C, sin embargo, cada género, o incluso cada especie, presentan temperaturas en el cual su desarrollo es óptimo. Los hongos obtienen los nutrientes por absorción y tienen un metabolismo quimioheterótrofo, ya que obtiene la energía y el carbono de compuestos orgánicos. Los hongos en la naturaleza se encuentran asociados con la materia orgánica en descomposición, participando en los ciclos naturales del reciclado del carbono y otros elementos naturales o como patógenos oportunistas de los animales y plantas. Los hongos pueden degradar una gran cantidad de componentes, para lo que disponen de potentes exoenzimas que en algunos casos pueden servirles como factores de virulencia en el hospedador (Rosas, 2015).

Dentro de los más investigados destacan: *Fusarium solani* (Maia et al., 2001), *Penicillium restrictum* (Gombert, Pinto, Castilho, & Freire, 1999), *Penicillium citrinum* (Miranda et al., 1999), *Penicillium chrysogenum* (Ferrer, Plou, Nuero, Reyes, & Ballesteros, 2000), *Rhizopus arrhizus* (Elibol & Ozer, 2002; Mahadik, Puntambekar, Bastawde, Khire, & Gorhale, 2002), *Rhizopus oligosporus* (Ul-Haq, Idrees, & Rajoka, 2002), *Aspergillus Níger* (Mahadik et al., 2002) *Candida rugosa* (Benjamin & Pandey, 2001), *Yarrowia lipolítica* (Domínguez, Costas, Longo,

Longo, & Sanromán, 2003), *Rhizomucor pusillus* y *Rhizopus rhizopodiformis* (Elibol & Ozer, 2002; Mahadik et al., 2002).

Los principales productores de lipasas comerciales son principalmente hongos y levaduras de géneros como *Rhizopus sp.*, *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, siendo las lipasas de *Rhizopus* y *Aspergillus* los catalizadores más atractivos para la modificación de lípidos (Adak & Banerjee, 2013). Se han aislado más de 30 lipasas de cepas de *Rhizopus* y muchas de ellas ya han sido caracterizadas. Las lipasas de *Rhizopus* están relacionadas con las lipasas de *Rhizomucor miehei* (existe una homología >55%), las cuales, presentan una alta especificidad en la posición 1,3 de triacilglicéridos, permitiéndoles alta versatilidad en la modificación de lípidos (Rivera & Garcia, 2007). A partir de *Rhizopus oryzae* NRRL 3562, se ha aislado una lipasa con características industrialmente importantes tales como la estabilidad en presencia de metales, tensoactivos y disolventes, especialmente disolventes polares, demostrando así ser una enzima robusta adecuada para aplicaciones variadas, incluyendo transesterificación, formulación de detergentes, etc. (Adak & Banerjee, 2013).

### 1.3 Métodos de aislamiento

Los criterios para la detección de microorganismos lipolíticos son dependientes de factores como el crecimiento de los microorganismos, la producción y/o liberación de lipasas, la actividad y especificidad del sustrato de la lipasa y sensibilidad de detección de la actividad de lipasa. Un gran número de sustratos han sido usados para la detección de microorganismos lipolíticos, entre estos sustratos están las grasas animales y aceites vegetales, también triglicéridos sintéticos como tributirin y trioleína, y otros ésteres sintéticos como los Tween (ésteres de sorbitan polioxietileno) y ésteres de metilumbeliferil (Shelley, Deeth, & Mac Rae, 1987). Existen métodos usando tintes indicadores, siendo los más populares: Victoria Blue, Night Blue y Nile Blue Sulphate. También se han desarrollado métodos directos como la observación de zonas claras y turbias alrededor de la

colonia, o la formación de cristales dentro de gotitas del sustrato sobre la superficie del agar (Shelley et al., 1987).

Los Tweens han sido probados como sustrato para lipasas de diferentes microorganismos. Los tweens son altamente solubles y son ésteres de ácidos grasos de un polioxialquileno derivado de sorbitan; ellos difieren solamente en el particular componente de ácido graso. Tween 40 es un éster de ácido palmítico, Tween 60 es un éster de ácido esteárico y Tween 80 es un éster de ácido oléico. Los Tweens son estables en diluciones alcalinas y soluciones ácidas minerales. Además de ser virtualmente neutros y no-volátiles tanto como estables al calor (Sierra, 1956). Si los microorganismos son probados con los Tweens como sustrato y tienen una actividad lipolítica, entonces un halo opaco puede ser observado alrededor de la colonia. Cuando se estudió microscópicamente estos halos opacos arrojaron consistencia de cristales. Los diferentes Tweens pueden ser distinguidos uno de otro por sus cristales característicos formados en los halos (Sierra, 1956). Las ventajas de los Tweens son:

- Provee un contacto óptimo entre las células y el sustrato.
- Puede ser usado para ensayos de especificidad de sustratos, porque es conocida su composición.
- Se observan directamente zonas visibles de hidrólisis, así se evita el uso de tintes potencialmente tóxicos.

En contraste, la principal desventaja de los Tweens es que las enzimas que la hidrolizan pueden ser más bien estererasas que verdaderas lipasas. Púés, al separar enzimas esterolíticas de cultivos bacterianos usando gel de electroforesis se comparó la capacidad de ellas para diversos sustratos. Se concluyó que no hubo una relación entre la capacidad de las enzimas para hidrolizar a los tween solubles y su capacidad para la lipólisis de grasa de manteca (O'Donnell, 1975).

#### **1.4 Factores que influyen en la producción de lipasas**

Existen diferentes factores que pueden tanto inhibir como inducir la producción de lipasas, los cuales pueden variar según el microorganismo, entre estos factores se

encuentra la fuente de nitrógeno, que generalmente es de tipo orgánico como extracto de levadura, peptona y triptona, o de tipo inorgánico como el cloruro de amonio y fosfato hidrógeno diamonio. Entre los factores inhibitorios más comunes se encuentran la presencia de azúcares, iones metálicos y sales, por su parte algunos sustratos lipídicos pueden inducir dicha producción (Hong-wei, Jun H, Xiao, & Ying-min, 2009).

Otro tipo de factores que influyen son el pH y la temperatura. Se ha reportado que la mayoría de los microorganismos presentan una mayor producción de enzima a pH 7.0, mientras que aunque la temperatura puede o no estar relacionada, se ha observado que estas enzimas generalmente están activas en un rango entre 20-45°C (Hong-wei et al., 2009).

## **1.5 Métodos para evaluar la actividad enzimática de lipasas**

Los métodos para seleccionar microorganismos productores de lipasas han ido evolucionando, ya que debido a las amplias condiciones en las cuales las lipasas son activas y en las cuales pueden llevar a cabo diversas reacciones, estos ensayos varían en términos de sus principios básicos: selección de sustrato, sensibilidad y aplicación (R. Gupta, Rathi, Gupta, & Bradoo, 2003).

La actividad lipolítica se puede determinar por la generación de los ácidos grasos libres, triglicéridos y desaparición del sustrato. Para ello, existen diferentes métodos que permiten evaluar esta actividad, ya sean cuantitativos como los colorimétricos, fluorimétricos, y de titulación, y cualitativos como la formación de halos de hidrólisis en medio sólido, entre otros (Hassan, Shah, & Hameed, 2009).

### **1.5.1 Evaluación de la actividad lipolítica por técnicas cualitativas**

Una de las técnicas cualitativas para evaluar la presencia de enzimas lipolíticas es la formación de zonas de aclaramiento generadas por la hidrólisis del sustrato en el agar. Para la verificación de la presencia de la enzima se puede utilizar Rodamina B, colorante fluorescente que al producirse la hidrólisis del sustrato

genera una coloración rosada en el halo, visible por medio de lámpara de luz ultravioleta (Ertuğrul, Dönmez, & Takaç, 2009; Hassan et al., 2009).

Para seleccionar los microorganismos productores de lipasas, el ensayo en placa con Rodamina B tiene la ventaja de ser insensible a los cambios de pH del medio. La Rodamina B es un colorante del grupo xanteno que es usado como estándar en la fluorescencia y al ser visto bajo luz ultravioleta (UV) fluoresce. El principio de este ensayo se basa en la hidrólisis de los triglicéridos presentes en el aceite, de esta manera los ácidos grasos forman un complejo con la Rodamina B que al ser visto bajo luz UV, se puede apreciar la pérdida de la fluorescencia del colorante y de esta manera se pueden observar y determinar las colonias de microorganismos que producen estas enzimas (Sandoval & Marty, 2007), El ensayo en placa con Rodamina B indica la presencia de actividad lipolítica y ayuda a hacer una selección rápida de microorganismos productores de lipasas.

## 1.6 Las lipasas

Las lipasas (glicerol-éster hidrolasas; EC 3.1.1.3) son parte de la familia de las hidrolasas las cuales catalizan la hidrólisis de triglicéridos en la interface lípido-agua, estas biomoléculas orgánicas están ampliamente distribuidas en la tierra. Las lipasas se han utilizado desde hace más de 300 años, sin embargo, su capacidad para catalizar la hidrólisis y sintetizar esteres ha sido reconocida apenas hace algunos años (González et al., 2010).

Las lipasas representan un grupo de enzimas que tiene la capacidad de hidrolizar triacilgliceroles en una interfase agua- aceite. Hacen parte de la clasificación de hidrolasas de ésteres carboxílicos y tienen por clasificación internacional: Glicerol – éster – hidrolasa. El origen de las lipasas puede ser: bacteriano, fúngico, pancreático, hepático y gástrico. Por su origen y propiedades diversas las Lipasas pueden catalizar la hidrólisis de un gran número de ésteres carboxílicos, aunque muestran una gran especificidad hacia los sustratos glicéricos. Son además, enzimas capaces de catalizar reacciones de transesterificación, aminólisis, esterificación, transferencia de acilos y tiotransesterificaciones, siempre que el

sustrato sea el adecuado y las condiciones óptimas (Liu, Li, Wanga, & Chen, 2014).

En investigaciones realizadas con lipasas de tipo microbiano se encontró que la enzima tiene una actividad óptima entre 35 °C y 40 °C y que un aumento de ésta ocasiona una disminución en la conversión hacia los ésteres y una desestabilización de la enzima. La especificidad de las lipasas puede depender de:

- El tipo y la selectividad con respecto a un tipo de ácido graso dado.
- El poder de hidrolizar preferiblemente los enlaces éster de la posición externa.

Las lipasas han sido extensamente caracterizadas con respecto a su capacidad de hidrólisis y síntesis, además de su enantioselectividad a través de sustratos artificiales, tales como ácidos carboxílicos, alcoholes y aminos.

Las lipasas microbianas presentan una serie de ventajas comparadas a las de origen animal y vegetal, una vez que las enzimas son extracelulares en su gran mayoría, son fácilmente separadas del micelio por filtración o centrifugación (Jesus, Branco, Sant'Anna Jr., Freire, & Silva Jr., 1999). Las lipasas poseen alta velocidad de síntesis y alto rendimiento de conversión de sustrato en producto (Leal, Cammarota, Freire, & Sant'anna, 2002). La lipasa de *Penicillium restrictum* mostró un alto nivel de actividad catalítica hacia los triglicéridos de cadena larga y mediana (Jesus et al., 1999). La hidrólisis de aceite de palma ha sido investigada para la obtención de mono y diacilgliceroles empleando preparaciones de lipasas de fuentes microbianas (*Candida rugosa*), vegetal (germen de trigo) y animal (páncreas de cerdo). Entre estas lipasas, las tasas de conversión de hidrólisis más elevadas fueron obtenidas con la lipasa de *Candida rugosa*, con actividad óptima a 37°C y pH: 7.5 (Khor, Tan, & Chua, 1986). La estabilidad de lipasas microbianas en presencia de solventes orgánicos es una característica que ha sido ampliamente investigada, pues ello puede posibilitar la realización de reacciones donde el agua no es un buen solvente (Maia et al., 2001). La actividad de la lipasa de *R. oryzae* micelio se ha estudiado en solventes hidrofóbicos como: alcanos, acetona, éter y cloroalcanos (Abigor et al., 2000). Varios tipos de alcoholes de

cadena primario, secundario, recta y ramificada pueden ser empleadas en transesterificación usando lipasas como catalizadores. La conversión del aceite de semilla de palma a alquil ésteres usando lipasas de *P. cepacia* con etanol genera altas concentraciones de 72%, mientras solo el 15% de metilesteres fue obtenido con metanol: metanólisis (Abigor et al., 2000). Las lipasas son enzimas termoestables (Sharma, Chisti, & Banerjee, 2001). Además, presentan versatilidad y simplicidad en la manipulación ambiental y genética de su capacidad productiva (Sharma et al., 2001).

### 1.6.1 Aplicaciones de las lipasas

Este tipo de enzimas son de importancia en la industria por sus múltiples aplicaciones debido a que llevan a cabo la degradación de sustratos con alto contenido graso así como en reacciones de esterificación en la industria alimenticia, farmacéutica y cosmética. Las lipasas han sido encontradas en muchas especies de animales, plantas y microorganismos. Sin embargo, las lipasas microbianas son mucho más versátiles y presentan características interesantes como estabilidad en solventes orgánicos, actividad bajo diversas condiciones y alta especificidad de sustrato. Las lipasas son sintetizadas por los microorganismos preferencialmente en presencia de inductores como son los lípidos. Estas moléculas y otras sustancias presentes en los residuos agroindustriales permiten el crecimiento de los microorganismos y actúan como sustancias inductoras para la producción de lipasas microbianas. Entre los lípidos que han demostrado ser inductores de lipasas se encuentran el aceite de soya, el colesterol, las sales biliares, los detergentes, por lo cual estas sustancias se emplean para la producción de lipasas de origen microbiano (González et al., 2010).

Sin embargo, se han desarrollado un gran número de aplicaciones en la industria algunas de estas son:

- Hidrólisis de grasas y aceites. El uso de las lipasas como catalizadores en la hidrólisis de aceites y grasas para producir ácidos grasos y glicerol, se da

a nivel industrial debido a que la catálisis enzimática proporciona mayores rendimientos en comparación con los métodos convencionales mejorando propiedades como el olor y el color de los productos además de reducir costos en el proceso.

- Interesterificación de grasas y aceites. La interesterificación es un proceso usado en la industria de grasas y aceites para modificar la composición y mejorar las propiedades físicas de las mezclas de triglicéridos. Las lipasas microbianas son usadas como catalizadores en las reacciones de interesterificación reemplazando los catalizadores químicos, esto se debe a que la reacción de las lipasas es reversible dándose la hidrólisis y la resíntesis de glicéridos cuando las lipasas son incubadas con grasas y aceites. La habilidad para producir mezclas de triglicéridos usando lipasas es de gran interés para la industria de grasas y aceites, debido a que estas mejoran la calidad y optimizan el proceso reduciendo los costos.
- Esterificación de ácidos grasos. La reversibilidad de la reacción de la lipasa permite que estas enzimas sean usadas como catalizadores en la formación de esteres a partir de alcoholes y ácidos grasos obteniendo un mayor rendimiento en la reacción.
- Desarrollo de aroma y sabor en los productos lácteos. El desarrollo del sabor y aroma de algunos productos lácteos se le atribuye a la acción de las lipasas sobre la grasa de la leche. Estas enzimas lipolíticas son usadas para potenciar la formación del aroma y sabor en los quesos y en la mantequilla.
- Productos de aseo y limpieza. Uno de los aditivos importantes que se encuentran en los detergentes son las enzimas, que se usan para atacar ciertos sustratos específicos. Las lipasas se usan para degradar restos de sustratos lípidos que son los que comúnmente se adhieren a la ropa.
- Otros usos. Las lipasas asociadas con cultivos bacterianos para eliminar los depósitos de grasa presentes en las paredes de las tuberías que transportan el efluente. El empleo de lipasas microbianas inmovilizadas en la obtención de antiinflamatorios no esteroídes, en el tratamiento de

residuos y aguas residuales, como aditivo en alimentos para animales domésticos y en la producción del sustituto de cocoa (Irazoqui, 2002).

## 1.7 Biodiesel

El uso del biodiesel se remonta desde que Rudolph Diesel en 1911 utilizó el aceite vegetal como combustible, pero su uso directo en los motores provocó los siguientes problemas (Canakci, 2007; Pinto et al., 2005)

- Formación de coque (hulla) en inyectores.
- Espesamiento o gelificación de aceite y lubricantes por contaminación de aceites vegetales.
- Alta viscosidad (11 a 17 veces más alta que el diesel).
- Formación de gomas.
- Baja volatilidad provocando depósitos en máquinas por las características incorrectas de vaporización e incompleta combustión.

Tomando en cuenta estos factores y problemas se llegó al biodiesel, que es un biocombustible derivado de aceites vegetales, grasas animales o aceites vegetales de desecho que puede ser utilizado como sustituto o aditivo del diesel convencional, representando una alternativa al uso de los combustibles fósiles (Canakci, 2007). El biodiesel es una fuente de energía limpia, renovable, de calidad y económicamente viable que además contribuye a la conservación del medio ambiente (Zheng, Kates, Dube, & McLean, 2006).

La ASTM (American Society for Testing and Material Standard), define al biodiesel como ésteres monoalquílicos de ácidos grasos de cadena larga derivados de lípidos renovables tales como aceites vegetales o grasas de animales y que se emplean en motores de ignición de compresión. El biodiesel tiene una muy buena biodegradabilidad (25 mg/l día), en comparación con el diesel fósil (12 mg/l-día). El biodiesel, tanto en agua como en suelos se degrada a los 30 días aproximadamente.

### 1.7.1 Métodos de producción del biodiesel

En diversos estudios se ha reportado que el biodiesel se puede producir por diferentes métodos como son (Lew, Hemanathan, & Vasudeo, 2014; Pinto et al., 2005; Ranganathan, Narasimhan, & Muthukumar, 2008):

- Pirólisis. Es el cambio químico causado por la aplicación de energía térmica en la presencia de aire o nitrógeno. El resultado de la pirólisis de triglicéridos es un producto con cantidades inaceptables de cenizas, depósitos de carbón, alto punto de fluidez, otros componentes como: alcanos, alquenos, alcadienos, aromáticos y ácidos carboxílicos.
- Microemulsificación. Se realiza mezclando aceites vegetales, ésteres y co-solventes (agente de dispersión); con alcohol (metanol, etanol y 1-butanol) o surfactantes mezclados o no con diesel, con el objetivo de disminuir la viscosidad de los aceites, aunque ésta queda por arriba de la máxima especificada por la ASTM.
- Transesterificación. Llamada también alcoholisis, ésta reacción consiste en hacer reaccionar triacilglicerol con alcoholes de cadena corta en presencia de catalizadores. Los catalizadores pueden ser ácidos, bases y enzimas. Actualmente el catalizador utilizado a nivel industrial es el alcalino. Con esta reacción se reduce el peso molecular, la viscosidad y se mejora la volatilidad ya que el aceite conformado principalmente de triglicéridos se fracciona en una mezcla de ésteres alquílicos.

Éste proceso es el que ofrece una producción de biodiesel sustentable, más factible y amigable con el medio ambiente y el mismo proceso de producción, razón por la que se describe con más detalle. Desde la reacción de transesterificación, la recuperación del glicerol (co-producto) y la simple purificación de los metil ésteres producidos (Lew et al., 2014).

### 1.7.2 Reacción de transesterificación

El biodiesel se obtiene por medio de la reacción de transesterificación de aceites vegetales, aceites de desecho o grasas animales que reaccionan con un alcohol

de cadena corta y que con ayuda de un catalizador, nos produce ésteres de alquilo y glicerol (Canakci, 2007). Estos productos se obtienen por el intercambio del grupo alcoxi (RO) de un éster por otro alcohol. En la Figura 1 se observa la reacción de transesterificación con metanol, en donde R1, R2 y R3 representan las cadenas alifáticas que conforman el triglicérido y en los productos los distintos metil ésteres formados a partir de los ácidos grasos que conforman al triglicérido.

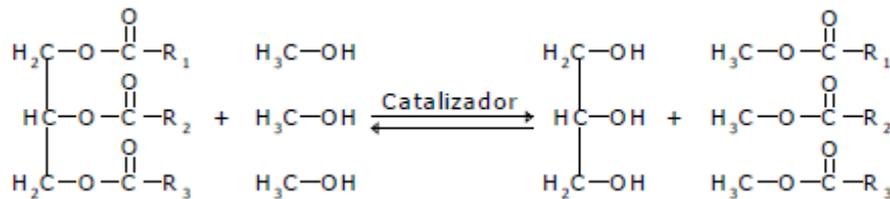


Figura 1: Reacción de transesterificación

Durante la reacción de transesterificación, los enlaces éster se van rompiendo y se van sustituyendo por el grupo hidroxilo del alcohol de cadena corta, de esta manera se van obteniendo intermediarios como: diglicéridos, monoglicéridos, glicerol y los ésteres de alquilo (biodiesel) según sea el alcohol usado (Pinto et al., 2005). A nivel industrial, el proceso de transesterificación depende de diferentes factores, los más importantes son: el tipo y concentración del catalizador, tipo de alcohol, razón molar de alcohol con el aceite, temperatura de reacción, presencia de ácidos grasos libres, contenido de agua e intensidad de agitación (Lew et al., 2014).

### 1.7.3 Catalizador enzimático

Actualmente el uso de biocatalizadores ha ido en aumento debido a la rapidez, altas eficiencias y condiciones suaves para llevar a cabo reacciones químicas. En el proceso de transesterificación, las enzimas utilizadas como catalizador, son las lipasas (Triacilglicerolacilhidrolasas, EC 3.1.1.3). Estas enzimas son producidas por la mayoría de los organismos y para aplicación industrial se obtienen a partir de microorganismos fácilmente manipulables, principalmente hongos y

bacterias(N. Gupta, Rathi, Rajni, Goswami, & Gupta, 2005; Pinto et al., 2005). Una característica muy importante de las lipasas, es la capacidad que tienen de llevar a cabo reacciones en la interfase de o en un medio orgánico y acuoso (N. Gupta et al., 2005; Pinto et al., 2005). En la Tabla 1 se presentan algunos microorganismos productores de lipasas, que son citadas en trabajos enfocados a la producción de biodiesel, así como también los aceites, y las temperaturas a las que se llevaron a cabo las reacciones de transesterificación.

Tabla 1: Microorganismos productores de lipasas citados en investigaciones enfocados en la producción de biodiesel

Microorganismos productores de lipasas	Aceites								Temperatura °C				
	Soya	Canola	Olivo	Vegetal	Girasol	Palma	Jatropha	AD <sup>1</sup>	30	35	40	45	50
<i>Candida antártica</i>	X	X	X	X				X		X	X		
<i>Candida lipolítica</i>	X												
<i>Candida rugosa</i>	X						X	X		X			
<i>Choromobacterium viscosum</i>							X				X		
<i>Klebisella oxytoca</i>	X												
<i>Penicillium camembertii</i>	X												
<i>Pseudomonas cepacia</i>													
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	X						X			X			
<i>Rhizomucormiehei</i>				X	X	X			X	X	X		
<i>Thermomyces lanuginosa</i>	X				X				X		X		X

<sup>1</sup>AD. Aceite Vegetal de desecho

Fuente: (N. Gupta et al., 2005; Pinto et al., 2005)

Finalmente se puntualizan las ventajas de utilizar catalizador enzimático sobre ácidos y alcalinos:

- A diferencia del método alcalino donde puede llevarse a cabo la saponificación por la presencia del NaOH, agua y ácidos grasos libres (Canakci, 2007; Manguesh, Kulkarni, & Dalai, 2006) en el proceso enzimático no se presenta este problema porque se lleva a cabo la transesterificación de estos ácidos grasos libres presentes en mayor

proporción en aceites de desecho comparados con los aceites vírgenes (Fjerbaek, Christensen, & Norddahl, 2009; Manguesh et al., 2006).

- Al realizar la transesterificación con catalizador enzimático en comparación con el químico, se elimina la presencia de material inorgánico disminuyendo el número de etapas de separación y la cantidad de agua de desecho del proceso es menor (Fjerbaek et al., 2009; Pinto et al., 2005).
- Las enzimas utilizadas como catalizador se pueden reutilizar para llevar a cabo posteriores reacciones de transesterificación.
- La temperatura requerida para llevar a cabo la reacción de transesterificación es menor en comparación de los métodos químicos (Zheng et al., 2006).

Y las desventajas al utilizar el método enzimático, son:

- El costo de la lipasa es aún elevado por lo que aumenta el costo de producción del biodiesel (Fjerbaek et al., 2009).
- La enzima puede ser inhibida principalmente por el uso de metanol y la presencia de glicerol, provocando una baja eficiencia en la producción (Fjerbaek et al., 2009).
- El tiempo de reacción de transesterificación por medio de algunas enzimas es más largo para poder obtener altos rendimientos de transesterificación en comparación con el proceso alcalino (Fjerbaek et al., 2009).

## 1.8 Lipasas y Biodiesel

Se han probado tres lipasas provenientes de *Chromobacterium viscosum*, *Candida rugosa* y de páncreas porcino, los cuales fueron investigadas para una reacción de transesterificación de aceite de *Jatropha* en un sistema libre de solventes para producir Biodiesel, solamente la lipasa de *Chromobacterium viscosum* fue encontrada dar rendimiento apreciable (Shah, Sharma, & Gupta, 2004).

Las semillas de *Jatropha* (Euphorbiaceae), la cual es un género que comprende 70 especies que crecen en ciudades tropicales y subtropicales, son reportados que contiene actividad de lipasas, las cuales podrían catalizar reacciones de

transesterificación. Es interesante mencionar también que el aceite de semillas de *Jatropha* fue usado durante la segunda guerra mundial como combustible sustituto al diesel. Últimamente, sus mezclas con combustible diesel han sido probadas (Veerabhadrapa, Shivakumar, & Devappa, 2014).

### 1.8.1 Perspectivas de las lipasas

Las aplicaciones comerciales de las lipasas reportan que estas enzimas aisladas o purificadas poseen un número de propiedades que tornan su uso atractivo como catalizador en biotransformación, tales como alta eficiencia catalítica (pueden elevar la velocidad de reacción de 10<sup>8</sup> a 10<sup>12</sup> veces), selectividad, actuación en condiciones blandas de temperatura (30 a 70°C) y en presión atmosférica (Novo Nordisk, 1995). El aislamiento y selección de microorganismos lipolíticos es un primer paso importante en la posterior purificación y aplicación de la tecnología enzimática de lipasas capaces de catalizar procesos como la transesterificación de triglicéridos presentes en aceites y grasas y su bioconversión en Biodiesel. (Lew et al., 2014), sostiene que las enzimas extracelulares o intracelulares empleadas en la Bioconversión deben ser purificadas por procedimientos que pueden ser demasiados complejos para usos prácticos. Además, que las enzimas recuperadas a través de tales operaciones son generalmente inestables y caras. Sin embargo, mediante ingeniería genética se ha logrado que la lipasa cDNA de *Fusarium heterosporum* incrementase su producción por encima de tres veces de la cepa original usando *Saccharomyces cerevisiae* como hospedero (L.I. Mendoza, 2010). Siendo así, los avances registrados en la tecnología de ADN permitirán a los productores de enzimas colocar en el mercado lipasas microbianas con actividad bien elevada, a un costo más accesible (L.I. Mendoza, Lino, Leon, & Santiago, 2012).

Por lo tanto, sigue siendo una alternativa interesante la utilización de catálisis enzimática usando lipasas para la obtención de productos por transformación microbiana y que sean de uso energético como el Biodiesel, contribuiría también a resolver problemas ambientales, sociales y económicos como son: la

contaminación derivada del diesel de petróleo cuya combustión genera emisiones nocivas al medio ambiente y la salud (monóxido de carbono, dióxido de azufre, óxidos de nitrógeno, dióxido de azufre, hidrocarburos, y aldehídos); en lo social, el consumo arraigado hacia los combustibles de origen fósil, cuyo agotamiento ya predecible generará malestar en el consumidor final; y en lo económico, nuestra matriz energética se diversificaría y por lo tanto no dependeríamos de manera importante de las súbitas fluctuaciones del precio del petróleo que es manejado internacionalmente por la Organización de los Países Exportadores de Petróleo (OPEC) (L.I. Mendoza et al., 2012).

*© Materiales y  
© Métodos*



## 2.1 Recolección y naturaleza de las Muestras

Las colectas se realizaron en la Empresa Productora y Refinadora de Aceites *Ecasol*, situada en Carretera de Mar Verde, Km 4½, Santiago de Cuba. Las muestras colectadas consistieron de material sólido (suelo o sedimento) o líquido (aguas residuales), contaminados con residuos del procesamiento del aceite vegetal. Estas se tomaron con material estéril (vasos de precipitados, para las muestras líquidas y espátulas para las sólidas) y se trasvasaron inmediatamente a tubos plásticos estériles de 50 ml de capacidad, provistos de tapa. Se tomaron siete muestras, cuyas características se describen a continuación (Figura 2):



Figura 2. Representación de las diferentes áreas muestreadas en la refinadora de aceite vegetal.

### Muestras sólidas:

- Muestra 1 (M1): sedimento depositado en las paredes de una de las cunetas de desagüe del punto de recepción del aceite crudo.
- Muestra 2 (M2): suelo superficial perteneciente a un área contaminada con residuales oleosos, provenientes de las tuberías del punto de recepción del crudo.

- Muestra 3 (M3): sedimento depositado en las paredes de un tragante receptor de una trampa de vapor, situado próximo al punto de recepción del crudo y con signos evidentes de contaminación con grasas.
- Muestra 4 (M4): sedimento depositado en la canaleta donde se vierte el *jaboncillo*, residual líquido generado por la fábrica, con alto contenido de aceite, jabón y gomas.

Muestras líquidas:

- Muestra 5 (M5): agua residual con alto contenido de grasas, la cual circula por una de las cunetas de desagüe situadas en las proximidades del punto de recepción del crudo.
- Muestra 6 (M6): agua residual con bajo contenido de grasas, la cual circula por una de las cunetas de desagüe situadas en las proximidades del punto de recepción del crudo.
- Muestra 7 (M7): residual líquido industrial *jaboncillo*, tomado directamente a la salida de la tubería de descarga.

Las muestras se trasladaron al laboratorio de Tecnología Enzimática del Centro de Estudios de Biotecnología Industrial de la Facultad de Ciencias Naturales y Exactas de la Universidad de Oriente y se conservaron a 4 °C.

## 2.2 Medios de Cultivo

Como medio general para la conservación y propagación de los cultivos de hongos filamentosos y levaduras se utilizó el medio Extracto de levadura – Peptona – Glucosa (YPD), el cual presentó la siguiente composición (en g/l): Extracto de levadura 10, peptona 20, glucosa 20. La variante sólida (agarizada) de este medio (YPDA) se preparó adicionando agar bacteriológico a 15 g/l.

El medio selectivo utilizado para el enriquecimiento y posterior aislamiento de hongos filamentosos y levaduras se conformó a base de una emulsión de aceite de soya en Tween 80 como única fuente de carbono y energía y el antibiótico tetraciclina para prevenir el crecimiento bacteriano. Su composición (en g/l, a menos que se indique otra cosa) fue la que sigue:  $K_2HPO_4$  2.5,  $(NH_4)_2SO_4$  1.3,

urea 1.3,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5, extracto de levadura 0.5, emulsión de aceite de soya 20% (v/v) y tetraciclina 50 mg/l. El pH se ajustó 6 con NaOH 1 mol/l. Para la variante sólida del medio se adicionó agar bacteriológico 15 g/l.

La urea y la tetraciclina se adicionaron al medio estéril a partir de soluciones stock 50X y 1000X, respectivamente. Ambas se esterilizaron por filtración a través de filtros bacteriológicos (0.22  $\mu\text{m}$ ) y se conservaron en frascos ámbar en congelación (-20 °C). La emulsión de aceite de soya se preparó emulsionando aceite de soya al 5% (v/v) en una solución acuosa de Tween 80 0.1%. Esta se esterilizó por separado en autoclave a 121 °C (1 atm) durante 20 minutos y se añadió al medio mineral en el momento de la inoculación de la muestra.

Para el ensayo cualitativo de la actividad lipolítica se emplearon los siguientes medios, cuya composición (en g/l, a menos que se indique otra cosa) fue:

- Medio conteniendo Tween 80 y  $\text{CaCl}_2$ :  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  2.5,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1.3, urea 1.3,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5, extracto de levadura 0.5, Tween 80 1% (v/v),  $\text{CaCl}_2$  0.5, agar bacteriológico 15. El pH se ajustó a 6 con NaOH 1 mol/L.
- Medio conteniendo aceite de soya y rodamina B:  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  2.5,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1.3, urea 1.3,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5, extracto de levadura 0.5, emulsión de aceite de soya 20% (v/v), rodamina B 10 mg/l y agar bacteriológico 15. El pH se ajustó a 6 con NaOH 1 mol/L. La rodamina B se adicionó a partir de una solución stock a 1mg/ml (100X), la cual se esterilizó por filtración y se añadió al medio mineral en el momento de la inoculación de la muestra.

Todos los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave a 121<sup>0</sup>C (1 atm) durante 20 minutos.

### 2.3 Soluciones

- Tween 80 0.1% (v/v) (estéril).
- Buffer acetato de cobre – piridina (pH=6). Se disolvieron 5 g de acetato de cobre en 80 ml de agua destilada, se ajustó el pH a 6 usando piridina y se llevó a un volumen de 100ml con agua destilada.
- Solución estándar stock (10X) de ácido palmítico en isooctano 50  $\mu\text{mol/ml}$ .

- Solución de aceite de soya en isooctano 60% (v/v). Se mezclaron 60 ml de aceite de soya y 40 ml de isooctano hasta obtener una solución homogénea.
- Emulsión de aceite de soya 25% (v/v): Se mezcló 1 volumen de aceite de soya refinado (comercial) con 3 volúmenes de una solución acuosa de goma arábiga 7 % (m/v). Se mezclaron con agitación vigorosa en vortex durante 2 minutos y seguidamente la emulsión se sometió a homogenización con ultrasonidos por espacio de 3 min, a 22 KHz y 50 W. Durante la aplicación del ultrasonido la emulsión se mantuvo en baño de hielo. La emulsión así obtenida se esterilizó a 121 °C durante 20 minutos.
- Hidróxido de potasio etanólico 3% (m/v). Se disolvieron 3 g de KOH en 100 ml de etanol comercial (96% m/v).
- Ácido clorhídrico 3 mol/l. Se adicionan 25 ml de ácido clorhídrico (conc.) a 75 ml de agua destilada y se homogeniza bien.
- Buffer fosfato de sodio 0.4 mol/l, pH 7.0 (estéril).
- Buffer acetato de sodio 0.4 mol/l, pH 4.8 (estéril).

## 2.4 Aislamiento, selección y purificación de microorganismos con actividad lipolítica

Para las muestras sólidas se tomó, bajo condiciones asépticas, con ayuda de una cucharilla estéril, aproximadamente 1 g de cada una y se llevaron a matraces que contenían 40 ml de Tween 80 0.1%. Los matraces se agitaron en zaranda durante 2 horas a 150 rpm. Posteriormente se tomaron 2,5 ml de cada una de las muestras sólidas resuspendidas en Tween 80, así como de las muestras líquidas y se añadieron a matraces de 250 ml que contenían 40 ml del medio selectivo a base de aceite de soya como única fuente carbono y energía, para favorecer el crecimiento de microorganismos y se incubaron en agitación en zaranda durante 72 horas. Transcurrido este tiempo se realizaron diluciones seriadas (de  $10^{-1}$  hasta  $10^{-6}$ ) de cada uno de los cultivos y se efectuó la siembra por diseminación en placas Petri conteniendo la variante sólida del mismo medio de cultivo. La siembra

se realizó por duplicado. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 7 días, excepto para el caso de la muestra M4, la cual se incubó a 42 °C por proceder de un sitio expuesto a temperaturas elevadas (trampa de vapor). Se realizaron observaciones del crecimiento cada 24 horas (Paskevicius, 2001).

Se seleccionaron colonias pertenecientes a los diferentes tipos morfológicos presentes y cuya morfología se correspondió con las características de hongos filamentosos y levaduras, verificándose mediante observación al microscopio la correspondencia con el grupo microbiano esperado. Las colonias seleccionadas se purificaron mediante la técnica de agotamiento en placas. A los cultivos purificados se les comprobó la similitud de los caracteres morfológicos con respecto a los de las colonias originalmente aisladas. Los cultivos purificados se conservaron en cuñas de medio YPDA a 4 °C (Kurtzman, Fell, & Boekhout, 2011).

## 2.5 Evaluación cualitativa de la actividad lipolítica

Para este ensayo se utilizaron dos medios, uno a base de Tween 80 y  $\text{CaCl}_2$  y otro a base de aceite de soya y rodamina B, cuya composición se describió anteriormente. Los microorganismos purificados se sembraron con palillos estériles en placas Petri conteniendo los medios correspondientes y se incubaron a temperatura ambiente durante 4-7 días. Las cepas que resultaron positivas al ensayo cualitativo de actividad lipolítica en el medio que contenía Tween 80 y  $\text{CaCl}_2$  mostraron la presencia de un halo opaco (debido a la precipitación de la sal cálcica del ácido graso) o transparente (como consecuencia de su consumo) alrededor de la colonia. En tanto, en el medio conteniendo aceite de soya y rodamina B las cepas con actividad lipolítica presentaron un halo fluorescente anaranjado alrededor de la colonia cuando se expusieron a luz ultravioleta (350 nm) (Carissimi, Ottonelli, Furtado, Corbellini, & Scroferneker, 2007).

## 2.6 Evaluación cuantitativa de la actividad lipolítica extracelular en medio líquido

A las cepas que mostraron los mejores resultados en los ensayos cualitativos de actividad lipolítica se les realizó una evaluación cuantitativa de la actividad lipolítica extracelular en medio líquido. En la Figura 3 se muestra el diagrama de flujo seguido para la realización de esta determinación.

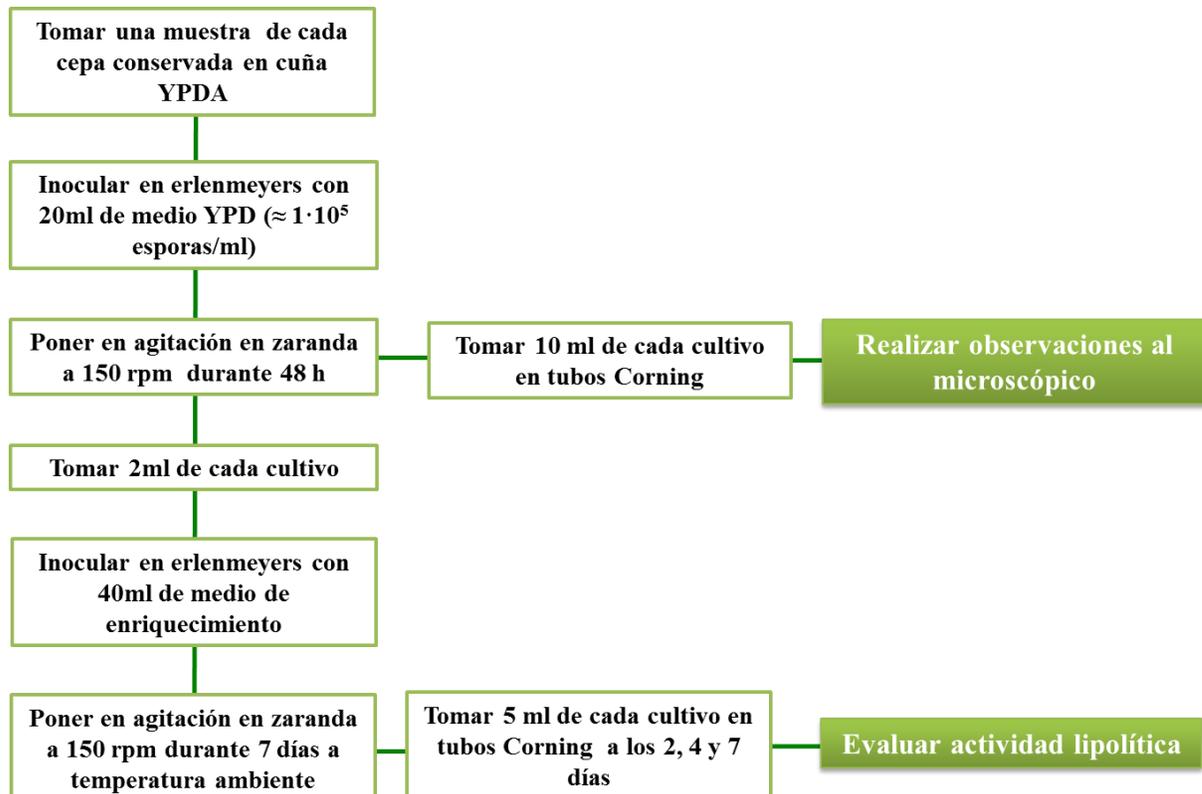


Figura 3: Esquema general de evaluación cuantitativa de actividad lipolítica en las cepas seleccionadas

Previo al ensayo enzimático, las muestras de los cultivos fúngicos se centrifugaron a  $6\ 000 \times g$  durante 15 min para separar el micelio del medio de cultivo. La actividad lipolítica se evaluó de acuerdo al método propuesto por Marseno *et al.* (1998), basado en la determinación colorimétrica del complejo cúprico de los ácidos grasos liberados, luego de su extracción con isooctano (Marsano, Indrati, & Ohta, 1998).

La mezcla de reacción estuvo conformada por 2 ml del sustrato y 500  $\mu$ l del crudo enzimático (sobrenadante de los cultivos), situados en tubos de ensayo de vidrio, provistos de tapa de rosca. La mezcla se agitó vigorosamente en zaranda (250 rpm) durante 1 hora a 30 °C y la reacción se detuvo añadiendo 100  $\mu$ l de HCl 6 mol/l. Posteriormente se tomó un 1 ml de la fase orgánica (superior) y se añadió a un tubo de ensayos que contenía 1 ml de isooctano y 400  $\mu$ l del buffer acetato de cobre – piridina se mezcló durante 5 segundos en vortex y se dejó en reposo por 10 minutos. Finalmente se midió la absorbancia de la fase orgánica (superior) en un espectrofotómetro a 715 nm contra un blanco de isooctano.

Para la cuantificación del contenido de ácidos grasos se utilizó una curva de calibración de ácido palmítico en el rango de 1-5  $\mu$ mol/ml en isooctano. En el ensayo colorimétrico se mezclaron 2 ml del patrón con 400  $\mu$ l del buffer acetato de cobre – piridina, la mezcla se agitó durante 5 segundos en vórtex y se dejó en reposo por 10 minutos y se leyó la absorbancia de la fase orgánica en un espectrofotómetro a 715 nm contra un blanco de isooctano. Una unidad de actividad enzimática lipasa se definió como la cantidad de enzima que produce 1  $\mu$ mol de ácidos grasos por minuto bajo las condiciones de ensayo establecidas.

## **2.7 Caracterización de la cinética de la fermentación del proceso de producción de lipasas en medio líquido por las cepas seleccionadas**

Las cepas seleccionadas en virtud de los resultados obtenidos en la evaluación cualitativa de la actividad lipolítica se sometieron a una segunda evaluación siguiendo la metodología descrita en el siguiente diagrama (figura 4).

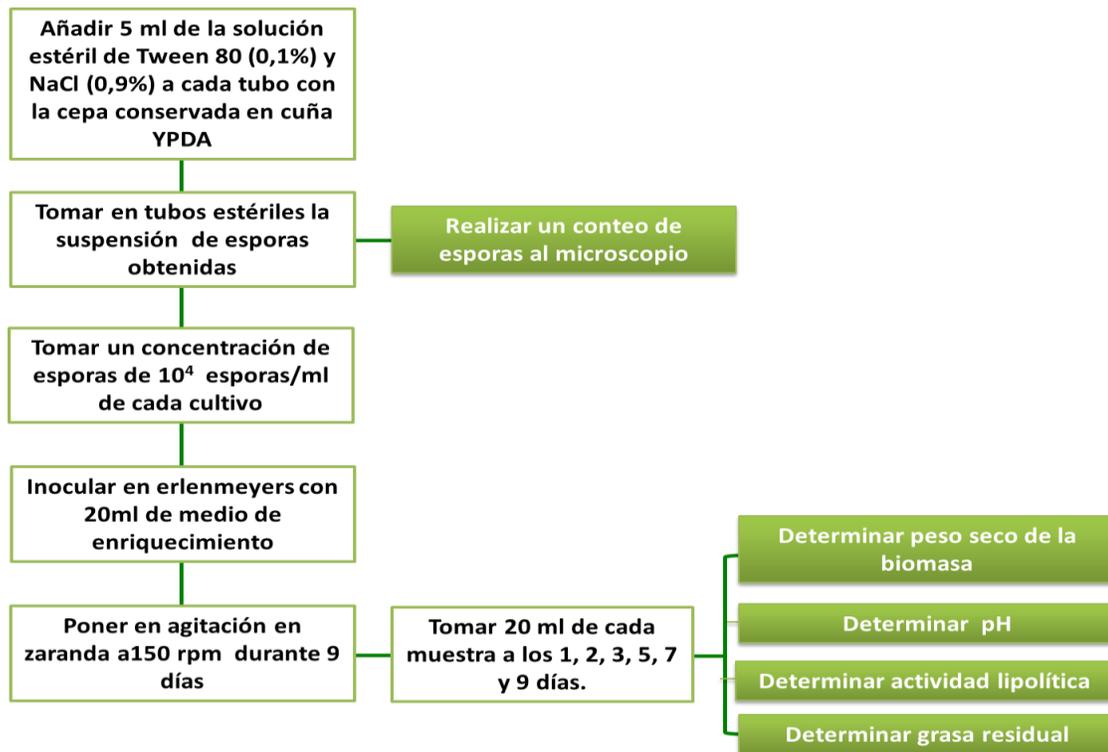


Figura 4: Esquema general de evaluación cuantitativa de actividad lipolítica en las cepas seleccionadas

Una vez tomadas las muestras de los cultivos, estas se centrifugaron durante 20 min a 10000 rpm, separándose dos fracciones: una sólida, tomada para cuantificar la biomasa y una líquida o crudo enzimático tomada para medir el pH y cuantificar los ácidos grasos residuales y la actividad lipolítica.

### 2.7.1 Determinación de pH

El pH se midió en un pH metro digital provisto de un electrodo combinado (Ingold, Suiza). El mismo se calibró previo a la mediciones con soluciones patrón de pH 4.00, 7.00 y 9.00. Las mediciones se realizaron a 25 °C.

### 2.7.2 Determinación del peso seco de la biomasa

La determinación del peso seco de la biomasa se llevó a cabo por el método gravimétrico. El método consiste en llevar la biomasa a peso constante en un

horno a 80 °C por 24 horas. Previo a la pesada de las muestras en la balanza analítica (Sartorius), estas se dejaron enfriar a temperatura ambiente en una desecadora.

### 2.7.3 Determinación de la actividad enzimática lipolítica

La determinación se realizó empleando como sustrato una emulsión de aceite vegetal en goma arábica (Colla et al., 2009). Para la cuantificación de los ácidos grasos liberados se utilizó el método colorimétrico de Marseno *et al.* (1998), basado en la determinación colorimétrica del complejo cúprico formado por los ácidos grasos, luego de su extracción con isooctano (Marsano et al., 1998). Se utilizó una curva patrón de ácido palmítico en isooctano 1-5  $\mu\text{mol/ml}$ . A continuación se describe la metodología seguida para el ensayo de actividad enzimática.

Para la determinación de actividad lipolítica de las cepas seleccionadas se añadieron 500  $\mu\text{L}$  de la emulsión de aceite de soya 25 % (v/v) en goma arábica 7% (m/v) a tubos de ensayos de vidrio, provistos de tapa de rosca. A cada tubo se le añadió 50  $\mu\text{L}$  del buffer acetato pH 4.8 o del buffer fosfato pH 7, según el pH deseado para la reacción enzimática y se mezcló bien durante 10 segundos en vortex. Posteriormente se incubó a 37 °C durante 10 min. Entonces se añadieron 250  $\mu\text{L}$  del crudo enzimático (sobrenadante de los cultivos), se mezcló inmediatamente en vortex durante 10 segundos y se incubó a 37 °C durante 25 min. Luego se añadieron 35  $\mu\text{L}$  de ácido clorhídrico 2 mol/L, se mezcló inmediatamente en vortex durante 10 segundos y se enfrió en baño de hielo durante 5 min para detener la reacción. Se añadió posteriormente 1 ml de isooctano, se agitó vigorosamente en vortex durante 2 minutos y se dejó reposar hasta lograr la separación de las fases (se centrifugó en caso necesario). Una vez separadas las fases se extrajeron cuidadosamente 800  $\mu\text{L}$  de la fase superior (orgánica) y se llevó a otro tubo de vidrio conteniendo 1200  $\mu\text{L}$  de isooctano. A este segundo tubo se añadieron 400  $\mu\text{L}$  buffer acetato de cobre – piridina y se agitó vigorosamente durante 5 segundos en vortex. La mezcla se dejó en reposo

por 10 minutos y se procedió a leer la absorbancia de la fracción de isooctano a 715 nm empleando isooctano como blanco. Una unidad de actividad enzimática lipasa se definió como la cantidad de enzima que produce 1  $\mu\text{mol}$  de ácidos grasos por minuto bajo las condiciones de ensayo establecidas.

#### **2.7.4 Determinación de grasa residual en los medios de cultivo**

El contenido de grasa residual en los medios de cultivo se estimó del contenido de ácidos grasos totales liberados luego de saponificación exhaustiva en presencia de KOH alcohólico, (McNeelly & Massion, 1972). Los ácidos grasos totales se cuantificaron según el método colorimétrico descrito por Marseno *et al.* (1998).

Para el ensayo se adicionaron 0.5 ml de la muestra del medio de cultivo libre de células, bien homogenizada, en tubos de ensayo. Luego se añadieron 1.5 ml de la solución de KOH al 3% en etanol y se homogenizó en vortex durante 5 segundos. Los tubos se calentaron durante 1 hora en baño de agua a 80 °C. Una vez transcurrido este tiempo, se destaparon los tubos, se añadió 1 ml de agua destilada, se homogenizó nuevamente y se calentó una vez más a 80 °C, ahora durante 10 minutos. Se adicionó posteriormente 300  $\mu\text{L}$  de la solución de HCl 3 mol/l, se homogenizó en vortex durante 5 segundos y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Luego se añadieron 2 ml de isooctano y se agitó vigorosamente en vortex durante 2 minutos. Posteriormente se tomaron alícuotas de la fase superior (isooctano) y se llevaron a tubos con isooctano de modo que se obtuvieran diluciones de 1/10 y 4/5 para un volumen final de 2ml. Se añadieron entonces a los tubos conteniendo las diluciones antes mencionadas 400  $\mu\text{L}$  del buffer acetato de cobre-piridina, se mezcló en vortex durante 5 segundos y se dejó reposar durante 10 minutos. La absorbancia de la fase orgánica se leyó a 715 nm frente a un blanco de isooctano. La concentración de ácidos grasos se estimó a partir de una curva patrón de ácido palmítico en isooctano de 1-5  $\mu\text{mol/ml}$ . La concentración másica de la grasa residual se calculó teniendo en cuenta que el equivalente de saponificación del aceite de soya es de 290.9 g/mol (ver Anexo 1).

*Resultados y  
Discusión*



### 3.1 Aislamiento, selección y purificación de microorganismos con actividad lipolítica

Durante el crecimiento de los microorganismos presentes en las distintas muestras colectadas en la fábrica refinadora de aceite de soya en el medio de cultivo selectivo utilizado, a base de aceite de soya como única fuente de carbono y energía, se apreciaron cambios cualitativos en el aspecto del medio, que evidenciaron el crecimiento microbiano y las transformaciones operadas en el sustrato. En particular, para el caso de las muestras M2 y M3, el medio se tornó a las 72 h de aspecto transparente, desapareciendo completamente el aspecto lechoso de la emulsión del aceite en agua; esto puso de manifiesto la ocurrencia de una degradación extensa del sustrato incorporado al medio. En todos los casos se observó un crecimiento microbiano profuso, predominado la existencia de biomasa filamentosa, de estructura difusa y compacta (*pellets*).

De las 7 muestras colectadas se aislaron un total de 40 cepas de microorganismos presuntamente lipolíticos, caracterizados por su capacidad de crecer utilizando aceite de soya como única fuente de carbono y energía. En la Figura 5 se presenta la distribución de aislados para cada una de las muestras.

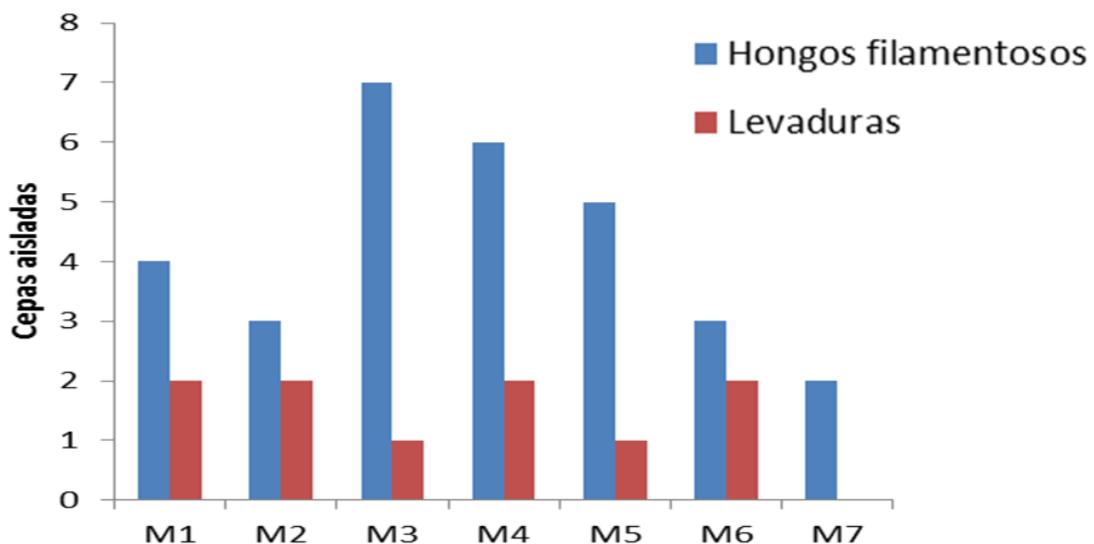


Figura 5: Total de cepas de hongos filamentosos y levaduras aislados para cada una de las muestras colectadas en la refinadora de aceite de soya.

De ellos, 30 presentaron colonias con características morfológicas que se corresponden con las de los hongos filamentosos y 10 con características morfológicas de levaduras, lo cual se comprobó con la observación al microscopio de cada uno de los aislados. En las observaciones microscópicas de los hongos filamentosos aislados se evidenció la presencia generalizada de hifas septadas; en tanto, las levaduras presentaron células ovoides y globosas, con presencia de gemación abundante.

De las cepas aisladas 8 pertenecen a la muestra 3 y 4 para un 20%, 6 a la muestra 1 y 5 para un 15%, 5 a la muestra 2 y 6 para un 12.5%, y 2 a la muestra 7 para un 5% respectivamente (Figura 6). Destacándose con el mayor número de aislados las muestras 3 y 4. Todas las cepas aisladas fueron purificadas y conservadas en cuñas en medio YPDA A 4°C (Figura 7).

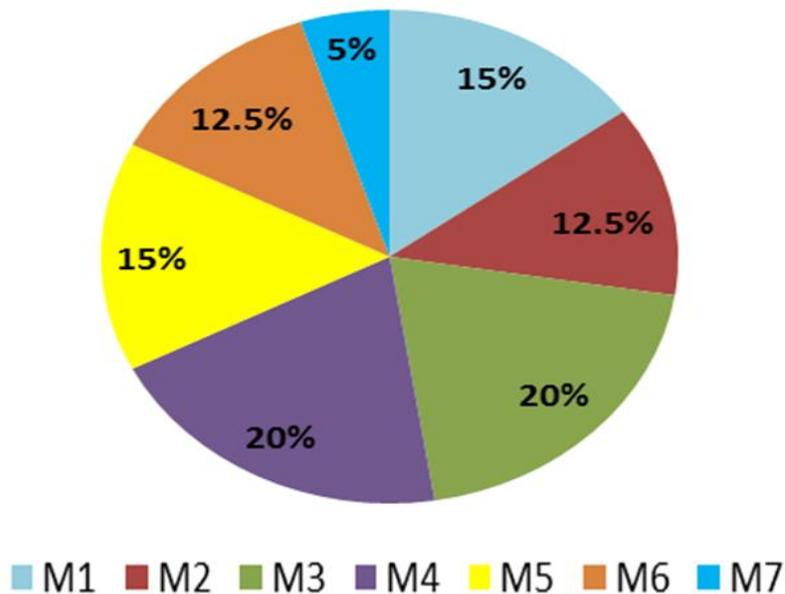


Figura 6: Distribución porcentual de cepas aisladas por cada una de las muestras colectadas.

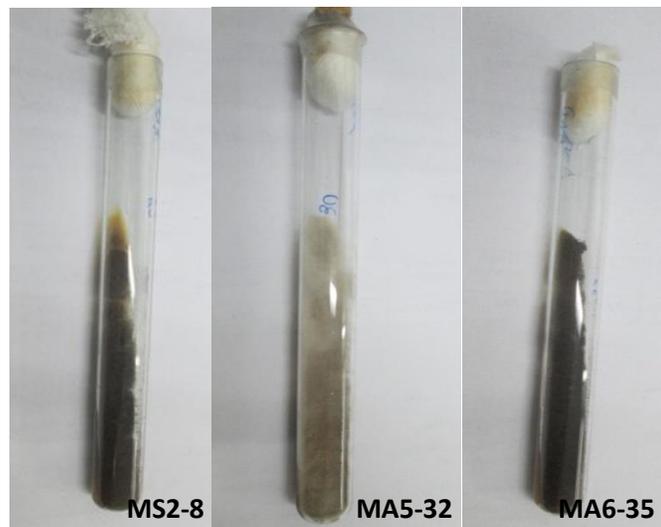


Figura 7: Cepas purificadas y conservadas en cuñas

Los resultados de los aislamientos obtenidos coinciden con los referidos por Aceves y Castañeda en 2012. Estos autores plantearon que los microorganismos con un alto potencial para producir lipasas pueden ser encontrados en diferentes hábitats naturales, principalmente en desechos o residuos de aceites vegetales, industrias de productos lácteos, suelos contaminados con aceites y alimentos deteriorados. Esto indica que el ambiente natural ofrece amplias posibilidades para aislar nuevos microorganismos productores de lipasas con propiedades novedosas. A partir de éstos ambientes se han aislado bacterias, hongos filamentosos, levaduras y actinomicetos, entre los que sobresalen los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Staphylococcus*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Candida*, *Aspergillus* y *Geotrichum* por su capacidad para producir lipasas extracelulares (Aceves & Castañeda, 2012).

La estrategia de aislamiento utilizada en este trabajo se centró en la búsqueda de hongos (hongos filamentosos o levaduras), por lo que durante el aislamiento se añadió al medio de cultivo el antibiótico de amplio espectro tetraciclina. Las lipasas de origen fúngico se prefieren, en lugar de las bacterianas, por su capacidad de actuar en rangos más amplios de temperatura durante el proceso catalítico y, sobre todo, debido a que su producción generalmente se efectúa en el medio extracelular. El mayor uso industrial de estas enzimas obedece, principalmente, a

que permiten reducir los costos de producción (Reinehr et al., 2014). La temperatura es una variable de máxima importancia a considerar en las reacciones enzimáticas, debido a su impacto sobre la estabilidad de las enzimas. Así, para el caso de las lipasas fúngicas, la temperatura óptima de acción catalítica suele estar entre los 40-60 °C, siendo capaces de conservar el 100% de actividad incluso después de 4 horas, permitiéndoles su versatilidad en aplicaciones dentro de diferentes áreas industriales (Rosas, 2015).

### 3.2 Evaluación cualitativa de la actividad lipolítica.

A las 40 cepas aisladas se le realizó la evaluación cualitativa de actividad lipolítica en placas Petri, utilizando las técnicas de crecimiento en medios con Rodamina B y Tween 80+CaCl<sub>2</sub>. En la Tabla 2 se presentan los resultados de los ensayos cualitativos de actividad lipolítica en los hongos filamentosos y levaduras aisladas, procedentes de los distintos lugares de colecta en la fábrica refinadora de aceite.

Tabla 2: Resultado de los ensayos cualitativos de actividad lipolítica para los diferentes aislados

Muestras	Cepas aisladas	Rodamina B	Tween 80 + CaCl <sub>2</sub>
M1	MS1-1	+++	++
	MS1-2	+	+
	MS1-3	+++	++
	MS1-4	+	+
	MS1-5	+++	++
	MS1-6	+	+
M2	MS2-7	+	+
	MS2-8	++	+++
	MS2-9	+	+
	MS2-10	++	++
	MS2-11	+++	++
M3	MS3-12	++	+++
	MS3-13	+	+
	MS3-14	+++	++
	MS3-15	++	+++
	MS3-16	+	+

	MS3-17	+	+
	MS3-18	+	+
	MS3-19	+	+
	MS4-20	+	+
	MS4-21	+	+
	MS4-22	+	+
<b>M4</b>	MS4-23	+	+
	MS4-24	+	+
	MS4-25	+	+
	MS4-26	+	+
	MS4-27	+	+
	ML5-28	+	+
	ML5-29	+	+
<b>M5</b>	ML5-30	+	+
	ML5-31	+	+
	ML5-32	+++	+++
	ML5-33	+	+
		ML6-34	+
	ML6-35	+++	+++
<b>M6</b>	ML6-36	+	+
	ML6-37	++	+++
	ML6-38	+	+
<b>M7</b>	ML7-39	+	+
	ML7-40	+	+

Leyenda:

- sin fluorescencia/ ausencia de halo de precipitación (o transparente)
- + halo fluorescente débil/ halo de precipitación (o transparente) poco definido
- ++ halo con fluorescencia de mediana intensidad/ halo de precipitación (o transparente) medianamente definido
- +++ halo con fluorescencia intensa/ halo de precipitación (o transparente) bien definido

Los resultados obtenidos indican que la actividad enzimática varía considerablemente entre las cepas aisladas. Sin embargo, los resultados obtenidos para una misma cepa en ambos ensayos son similares, lo cual indica la factibilidad de emplear indistintamente con uno u otro medio. Las cepas que mostraron mayor intensidad de fluorescencia e intensidad de los halos de

precipitación fueron MS1-1, MS1-3, MS1-5, MS2-8, MS2-10, MS2-11, MS3-12, MS3-14, MS3-15, ML5-32, ML6-35, ML6-37, las cuales se seleccionaron para la evaluación cuantitativa de la actividad enzimática lipolítica por el método espectrofotométrico.

Se destaca el hecho de que los aislados con mayor actividad lipolítica proceden principalmente de muestras sólidas. La adsorción de las grasas sobre la superficie de las partículas sólidas del polvo constituye un elemento que facilita la posterior instalación y colonización por los hongos, organismos estos naturalmente adaptados para el crecimiento sobre superficies sólidas. Al tratarse de un medio rico en grasas, se ve favorecido el crecimiento de aquellas estirpes lipolíticas. Por otro lado, la hidrólisis de las grasas conduce a la acidificación del medio, lo que unido a la baja actividad de agua característica de materiales sólidos ricos en grasas, crea un ambiente propicio para el desarrollo preponderante de hongos filamentosos con respecto a otros grupos microbianos. De este modo, el medio natural actúa como medio selectivo (Nwuche & Ogbonna, 2011).

Ertuğrul *et al.* (2009); Hassan *et al.* (2009) y Carissimi *et al.* (2007) plantearon que la actividad lipolítica puede ser determinada por diferentes métodos pero que los ensayos visuales como los colorimétricos y los fluorimétricos pueden ser usados en experimentos preliminares cuando aún no es necesaria la cuantificación. Estos mismos autores hacen referencia al uso de la rodamina B y el Tween 80 en este tipo de ensayos, evidenciando que los Tweens han sido probados como sustrato para lipasas de diferentes microorganismos y que estos son muy estables en diluciones alcalinas y soluciones ácidas minerales, de ahí que en la presente investigación se halla utilizado un medio de cultivo mineral (ajustado a pH 6) para los ensayos cualitativos de actividad lipolítica. De igual modo la literatura hace referencia a que si los microorganismos son probados con los Tweens como sustrato y tienen actividad lipolítica, entonces un halo opaco puede ser observado alrededor de la colonia, lo que coincide con las observaciones efectuadas en este trabajo para las cepas evaluadas (Carissimi *et al.*, 2007; Ertuğrul *et al.*, 2009; Hassan *et al.*, 2009).

Por otra parte, la detección de actividad lipolítica usando rodamina B tiene la ventaja de ser insensible a los cambios de pH del medio; este ensayo se basa en la interacción de la forma catiónica de la rodamina B con la forma aniónica de los ácidos grasos, conducente a la formación de complejos cuya estabilidad e intensidad de la fluorescencia es proporcionalmente inversa a la longitud de la cadena de los ácidos grasos. Carissimi *et al.* (2007) recomiendan el uso de este fluorocromo y no el del Azul Victoria, que es otro indicador de lipólisis, dado que este último puede ofrecer falsos positivos debido a la producción de ácidos durante el consumo de los carbohidratos por los microorganismos. Entre los hongos reportados evaluados por este método se encuentran *Rhizopus delemar*, *Mucor lipolyticus*, *M. hiemalis*, *M. javanicus*, *Geotrichum candidum*, *Penicillium cyclopium*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizopus oryzae*, *Aspergillus japonicus*, *A. oryzae* y *A. niger* (Carissimi *et al.*, 2007; Ertuğrul *et al.*, 2009; Hassan *et al.*, 2009).

### 3.3 Evaluación cuantitativa de la actividad lipolítica extracelular en medio líquido

Las cepas seleccionadas en virtud de los resultados obtenidos en la evaluación cualitativa de la actividad lipolítica se crecieron en un medio selectivo a base de aceite de soya emulsionado en presencia de Tween 80, como única fuente de carbono y energía; este medio fue el mismo usado en el proceso de aislamiento de las cepas, pero sin la adición del antibiótico. La existencia de crecimiento microbiano y su magnitud son una evidencia de la muy probable existencia de actividad lipolítica, toda vez que para que tenga lugar el uso de la grasa vegetal como sustrato, se requiere de la hidrólisis previa del mismo por intermedio de lipasas, para liberar los ácidos grasos constituyentes del triacilglicérido.

En la Tabla 3 se presentan las características observables más destacadas de los cultivos en el medio líquido selectivo. En la Figura 8 se ilustran estas observaciones a través de dos fotografías representativas de estas observaciones.

Tabla 3: Características destacadas de los cultivos en el medio líquido selectivo.

Cepas	Observaciones
MS1-1	Medio con crecimiento en forma de pellets
MS1-3	Medio con crecimiento en forma de pellet gigante
MS1-5	Medio con crecimiento en forma de pellets. Medio transparente
MS2-8	Medio con crecimiento en forma de pellets. Medio transparente
MS2-10	Medio con crecimiento en forma de pellets
MS2-11	Medio con crecimiento en forma de pellets
MS3-12	Medio con crecimiento en forma de pellets
MS3-14	Medio con crecimiento en forma de pellet gigante
MS3-15	Medio con crecimiento en forma de pellets
MA5-32	Medio con crecimiento en forma de pellets. Medio transparente
MA6-35	Medio con crecimiento en forma de pellets. Medio transparente
MA6-37	Medio con crecimiento en forma de pellets

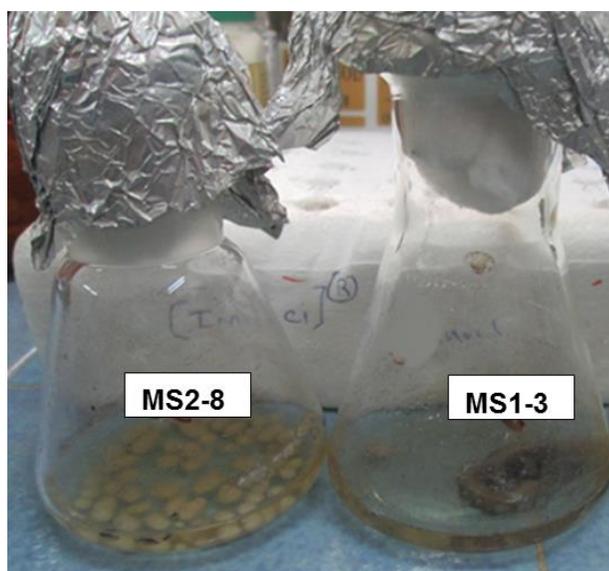


Figura 8: Crecimiento en forma de pellet y de pellet gigante de las muestras MS2-8 y MS1-3

En la estimación cuantitativa de la actividad enzimática según el método colorimétrico de Marsano et al (1998), resulta de vital importancia disponer de un patrón apropiado de ácido graso, que se adecue a los intereses particulares del

investigador. En este caso se disponía de ácido palmítico, un ácido graso saturado de 16 átomos de carbono, para el cual resultó necesario evaluar el rango de concentraciones para el cual cumple con la ley de Lambert-Beer, aspecto este indispensable para el ensayo colorimétrico. En la Figura 9 se presenta la curva de calibración del ácido palmítico para un rango de concentraciones de 1-5  $\mu\text{mol/ml}$ .

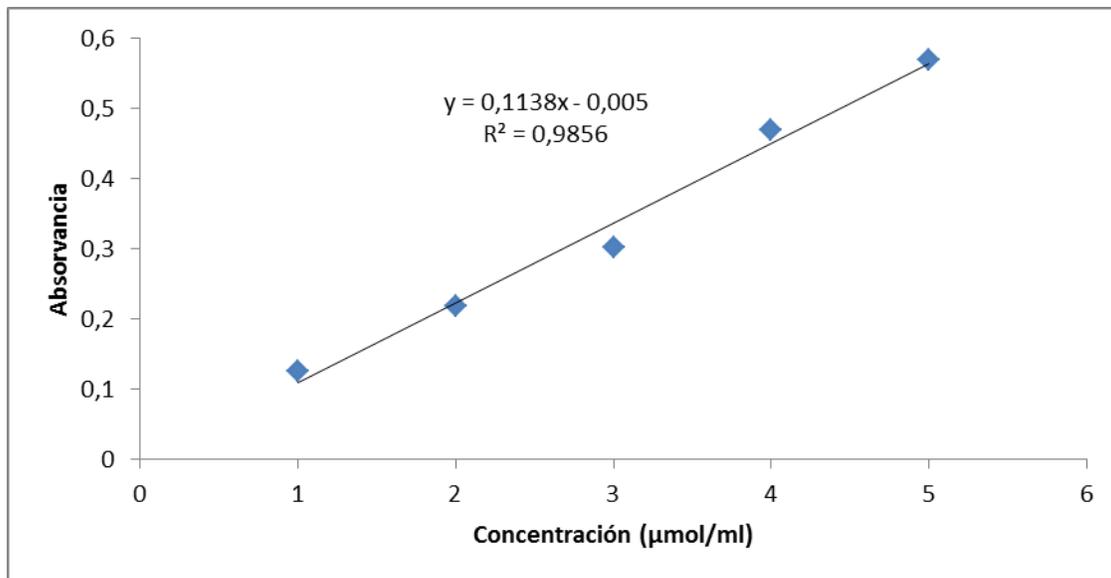


Figura 9: Curva patrón de ácido palmítico. Método de Marsano *et al.* (1998).

Según puede observarse en la Figura 9, el ácido palmítico presentó un incremento lineal en la absorbancia con el incremento de la concentración, para el rango evaluado. La linealidad de la curva patrón está avalada por un coeficiente de determinación  $r^2 > 0.97$ , lo que garantiza que el error en la estimación de la concentración a partir de esta curva sea inferior al 2%. Estos resultados son similares a los informados por Marsano *et al.* (1998). Por otro lado, el intercepto de la curva, igual a  $-0,005$ , resultó estadísticamente no significativo, por lo que puede afirmarse que el método empleado, basado en el patrón de ácido palmítico, cumple con la ley de Lambert-Beer y con los requerimientos establecidos para el análisis espectrofotométrico. De este modo, quedó establecido el método para cuantificar los ácidos grasos liberados del sustrato durante la reacción enzimática.

En la Figura 10 se muestran los resultados de la cuantificación de la actividad enzimática lipolítica extracelular, la cual se evaluó en tres momentos del cultivo (2, 4 y 7 días) para las cepas que presentaron mayor actividad lipolítica en los ensayos cualitativos. En todas las cepas se observó un comportamiento semejante, que sugiere la presencia de dos tipos de lipasas predominantes, cuyos acumulados máximos se presentaron al segundo y séptimo día, excepto las cepas MS3-12, ML5-32 y ML6-37 en las que se observó la existencia de un solo máximo de producción de lipasa. Las cepas con mayor actividad lipolítica fueron MS1-5, MS2-8, con valores de 240U/l, 225U/l, respectivamente.

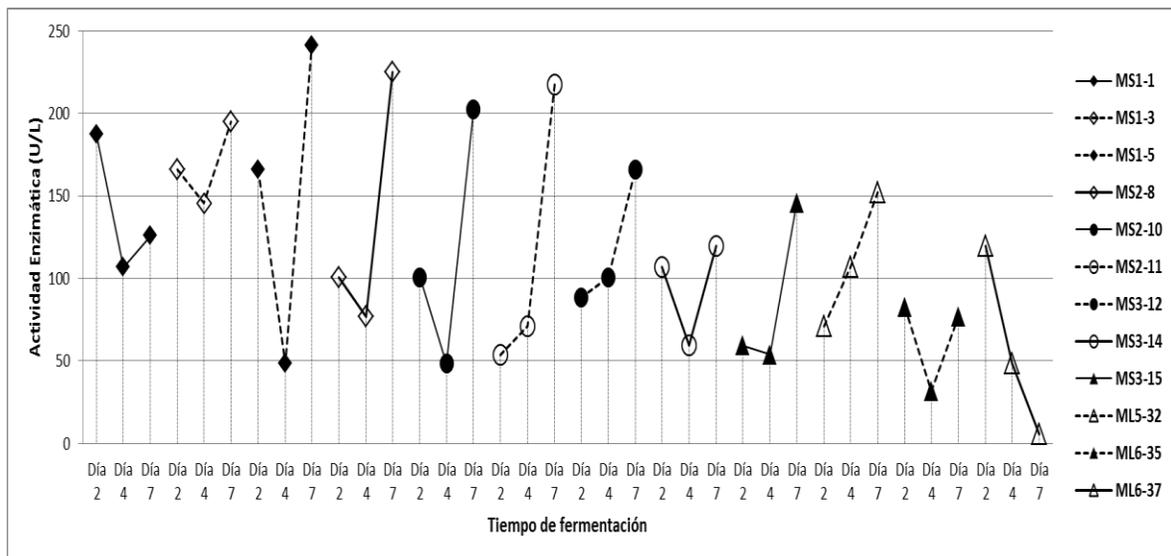


Figura 10: Evaluación cuantitativa de la producción de lipasa extracelular por las cepas seleccionadas a diferentes tiempos de fermentación.

Existen en la literatura diversos reportes de hongos filamentosos del género *Penicillium* como productores de lipasas. Miranda *et al.* (1999) aislaron una cepa de *Penicillium citrinum* encontrado como contaminante en aceite de oliva. *P. citrinum* presentó dos picos de actividad lipolítica, a las 25 y 120 h, concluyendo que este microorganismo produce dos tipos enzimas lipolíticas (Miranda *et al.*, 1999). Lima *et al.* (2003) hacen alusión también al género *Penicillium* como productor de varias lipasas; en el caso de la especie *P. aurantiogriseum* (*P.*

*cyclopium*) se ha reportado por varios autores la existencia de tres tipos de lipasas (Lima et al., 2003). Todos estos informes coinciden con los resultados obtenidos al evaluar cuantitativamente la producción de lipasas en los asilados seleccionados. Los caracteres morfológicos observados sugieren que algunos de los hongos filamentosos aislados en este trabajo pertenecen al género *Penicillium*.

En diversos estudios con cepas lipolíticas de hongos filamentosos se han obtenido valores de actividad enzimática similares a los obtenidos en la presente investigación, como los de Coca *et al.* (2001) donde exponen que las mejores cepas fueron las de *A. niger* y *A. fumigatus*, resultando las actividades enzimáticas 260 y 210 UI/L, respectivamente (Coca et al., 2001).

Existen dificultades prácticas para comparar los resultados publicados por diferentes autores con respecto a la producción de lipasas por microorganismos, debido a la diversidad de métodos utilizados para la cuantificación de la actividad enzimática y de los principios en que estos están basados. No obstante, los resultados obtenidos en esta investigación resultan promisorios en lo concerniente al potencial de las cepas seleccionadas para ser utilizadas en posteriores estudios dirigidos a optimizar la producción de las enzimas. Otro aspecto relevante a considerar en futuros estudios será la caracterización cinética de las enzimas frente a diferentes sustratos y bajo diferentes condiciones de reacción.

Las cepas que pasaron a la tercera fase del estudio fueron las cepas MS1-5, MS2-8 por presentar los valores más elevados de actividad enzimática extracelular, la cepa ML5-32 por el incremento lineal observado para la actividad enzimática en función del tiempo de fermentación (Fig. 10). También fue seleccionada la cepa ML6-35, caracterizada por presentar valores semejantes de actividad enzimática para los dos máximos observados, correspondientes a las dos posibles lipasas presentes (Fig. 10); la cepa MS3-14, aunque presentan un comportamiento similar, incluso con valores mayores de la actividad enzimática, se caracteriza por presentar un crecimiento en medio líquido en forma de pellet gigante (Fig. 8), característica desfavorable si se quiere llevar la producción de la enzima a escala industrial. Es necesario destacar que en las cuatro cepas seleccionadas se observó la degradación completa del aceite de soya incorporado como fuente de

carbono al medio de cultivo; esta observación sugiere la existencia de una elevada capacidad lipolítica y de aprovechamiento de grasas, aspectos estos que, combinados, resultan de gran importancia para un proceso industrial de obtención de estas enzimas, si se supone la posibilidad de utilizar residuos oleosos industriales en la formulación del medio de cultivo, como podría ser el caso del propio *jaboncillo* generado por las refinadoras de aceite vegetal. Todo esto contribuye, no solo a la economía del bioproceso, sino también a reducir el impacto ambiental ocasionado por las refinadoras de aceite.

### **3.4 Caracterización de la cinética de la fermentación del proceso de producción de lipasas en medio líquido por las cepas seleccionadas**

La obtención de enzimas microbianas por fermentación requiere del estudio a nivel de laboratorio de la cinética del bioproceso, con énfasis en las cinéticas del crecimiento, consumo del sustrato y formación del producto, aspectos estos de gran importancia para el diseño de las estrategias de cultivo a utilizar, así como para la determinación del volumen óptimo del biorreactor. Otras cuestiones no menos importantes están relacionadas con los indicadores de rendimiento, en particular los que conciernen al consumo de sustrato, la formación de biomasa y a la producción específica, todos ellos con gran impacto en la economía del bioproceso.

#### **3.4.1 Crecimiento microbiano y variación del pH durante la fermentación**

Durante el crecimiento los microorganismos pueden modificar el pH del medio de cultivo, normalmente haciéndolo disminuir, debido a las reacciones propias de cada proceso, por tal motivo es frecuente incluir en el medio de cultivo sustancias que actúen como tampón (buffer) a fin de evitar que el pH se aleje del óptimo. Muchos autores plantean que el pH también tiene un efecto marcado sobre el rendimiento y la velocidad de crecimiento. El pH para un organismo particular presenta un valor óptimo. En bacterias el pH óptimo se sitúa entre 6 y 8; en levaduras entre 4 y 6 y en mohos entre 3 y 7 de ahí que las variaciones de pH de

las cepas estudiadas no se alejan del rango de valores óptimos (Morales & Muñoz, 2005).

En el presente estudio el pH inicial del medio se ajustó a 6, teniendo en cuenta que este valor ha sido reportado como óptimo para la producción de lipasas en hongos filamentosos por varios autores (Paskevicius, 2001). En el medio se le adicionó  $K_2HPO_4$  y urea como agentes tampón, además de aportar macronutrientes al medio. En el caso de la producción de enzimas microbianas, como es el caso de las lipasas, el pH del medio no solo puede incidir en la regulación de su síntesis, sino que también puede afectar su estabilidad, ambos aspectos de importancia fundamental para garantizar el éxito del bioproceso.

En la Figura 11 se muestra las variaciones del pH del medio para las diferentes cepas, cuando crecen en medio mineral suplementado con aceite de soya como fuente de carbono y energía. En tres de las cepas, a excepción de la ML5-32, se observa una disminución importante del pH de 6 a 4 unidades, disminución esta que ocurre en paralelo con la disminución del contenido de grasa (sustrato) por los hongos. El consumo de triglicéridos usualmente está precedido por la hidrólisis catalizada por las lipasas, con la consiguiente liberación de los ácidos grasos y la acidificación del medio de cultivo. Una vez consumidos los ácidos grasos, es de esperar un incremento paulatino del pH, como se observa en todas las cepas estudiadas, debido a la hidrólisis de la urea (espontánea o catalizada por ureasas). La cepa ML5-32 presenta un comportamiento diferente a lo esperado, permaneciendo el pH prácticamente constante, con un ligero aumento.

Hiol & Deyris, (2002) estudiaron un hongo del fruto de la palma *Cameroonian* identificado como *Mucor sp*, con el fin de aislar y purificar la lipasa extracelular producida. El pH bajo el cual se estudió el crecimiento estuvo entre 5.0 y 9.0. Por otro lado, (Jonzo & Rugani, 2000), estudiaron el hongo *Rhizopus oryzae* aislado del fruto de palma *Cameroonian* igualmente con el objetivo de purificar y caracterizar la lipasa extracelular producida bajo valores de pH semejantes, evidenciando que los valores de pH observados para nuestros aislados se encuentran dentro del rango usualmente utilizado en la producción de lipasas fúngicas.

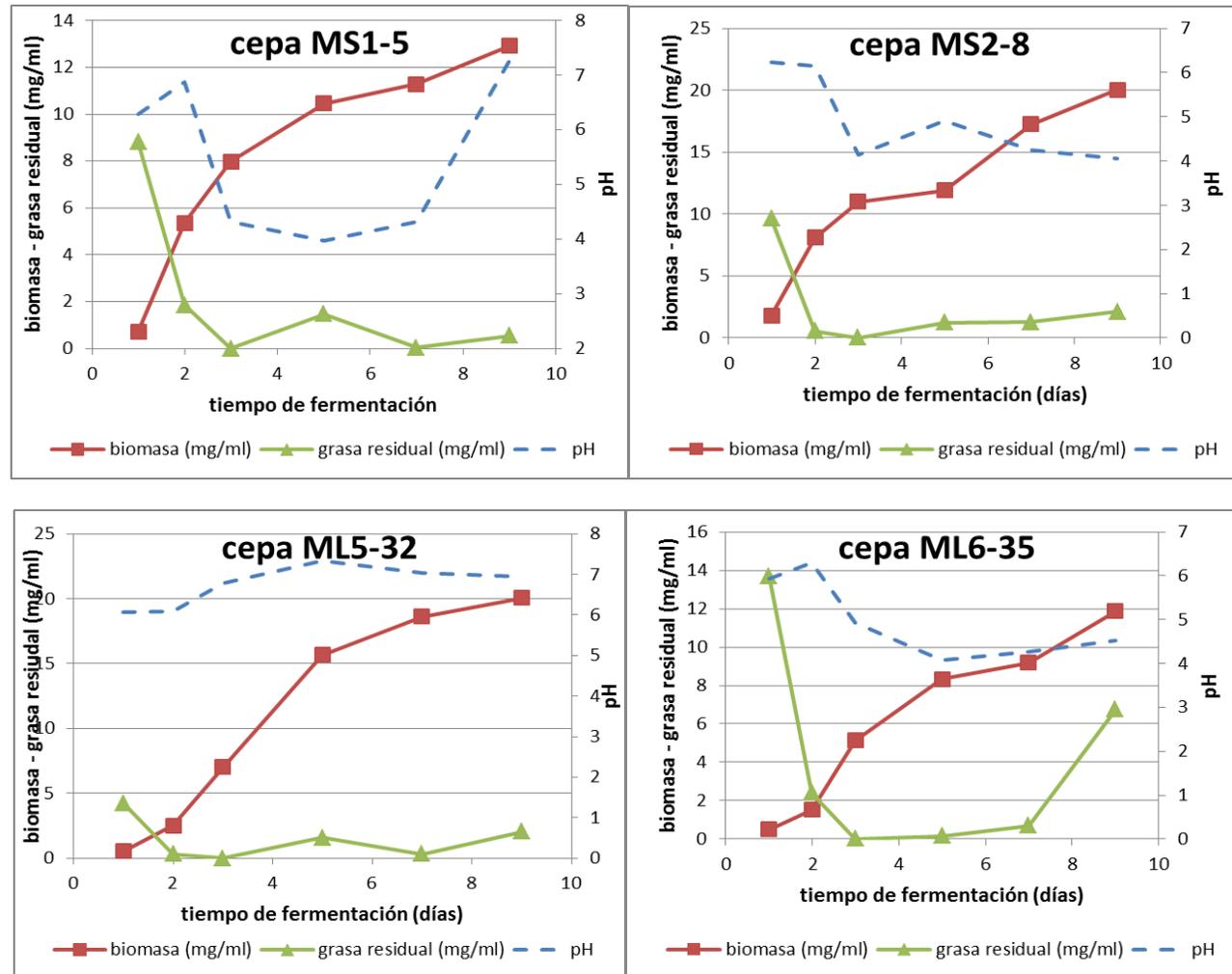


Figura11: Cinética del crecimiento, consumo de sustrato y pH para las cepas seleccionadas en medio mineral con aceite de soya como fuente de carbono.

En todas las cepas se observó un crecimiento continuo y en desaceleración, principalmente a partir del quinto día de fermentación, lo que se corresponde con el agotamiento del sustrato en el medio de cultivo (Figura 11). Se lograron concentraciones de biomasa entre 12 y 20 mg/ml, con rendimientos de crecimiento entre 0.65 y 1.076, satisfactorios para el proceso fermentativo, pues a mayor producción de biomasa mayor producción y productividad de enzima.

Esto indica que la composición del medio y la fuente de carbono utilizada (aceite de soya), resultaron óptimas para el crecimiento de los hongos filamentosos estudiados. Este resultado es de esperar si se tiene en cuenta que los aislados proceden de una refinadora de aceite de soya. Las cepas con mejor crecimiento fueron MS2-8 y ML5-32, con concentraciones de 20,02 y 20,05 mg/ml, respectivamente. Estos resultados de biomasa son mayores a los reportados para la producción de lipasas por *Aspergillus sp.* (9.7-16 mg/ml), (Coca et al., 2001).

### 3.4.2 Cinética de la producción de lipasas.

La actividad lipolítica fue evaluada a pH 4.8 y 7 (Figura 12) debido a que, al evaluarse cuantitativamente la actividad lipolítica extracelular, se encontró que todas las cepas manifestaban la existencia de dos máximos de acumulación de lipasas, los que probablemente corresponden a dos tipos de enzimas diferentes. En general, las lipasas fúngicas son más activas a pH entre 6 y 7, pero existen otras que son más activas a pH ácido, de modo que se justifica el interés en la investigación de evaluar los dos valores de pH.

Como puede verse en la Figura 12, una vez más las cepas mostraron dos picos de actividad lipolítica, confirmando la probable presencia de, al menos dos tipos de lipasas. Es necesario destacar que la cepa ML5-32 no presentó un comportamiento lineal, en cuanto a la acumulación de enzima en el tiempo, como se observó en el experimento de evaluación cuantitativa (Fig. 10), sino que, a diferencia del resto, la actividad lipolítica de la segunda lipasa es superior a la de la primera lipasa (para ambos pH) y durante la primera evaluación cuantitativa, al no tener la periodicidad de las mediciones de la segunda evaluación, arrojó una

aparente linealidad en el comportamiento de la actividad lipolítica. Las cepas seleccionadas con mayor actividad lipolítica fueron MA5-32 (a pH4.8) con un valor de actividad lipolítica de 729 U/l en su segundo pico de actividad y la cepa MS2-8 (a pH7) con un valor de actividad lipolítica de 545 U/l en el primer pico de actividad.

Muchos autores han demostrado la existencia de más de una lipasa en ciertas especie como *Candida antarctica*, que es una levadura *basidiomicética* aislada del lago Vanda en Antártida, la cual produce dos lipasas denominadas A y B (Ramos, Cujilema, Julian, Cordova, & Fickers, 2015). Estas lipasas se encuentran entre las lipasas más termoestables reportadas hasta el momento y se han encontrado numerosas aplicaciones para éstas. La lipasa A de *Candida antártica* (CalA) muestra una especificidad más amplia hacia alcoholes secundarios y terciarios estéricamente impedidos y un mejor reconocimiento de ácidos grasos *trans* en la hidrólisis de triacilglicéridos. La CalA también se ha utilizado para la síntesis asimétrica de aminoácidos y compuestos relacionados, debido a su quimioselectividad hacia grupos amino; sin embargo, la CalA es dependiente de calcio y posee baja actividad catalítica, por lo cual, se requieren en grandes concentraciones para catalizar reacciones. Por su parte, la lipasa B de *Candida antarctica* (CalB) con pH óptimo de 7,0 (estable en el intervalo de pH de 3,5-10,0). Es menos termoestable en comparación con CalA, pero posee mayor especificidad. Siendo principalmente activa hacia alcoholes primarios y es 1,3-específica hacia glicerol. La CalB es estereoselectiva para la posición Sn3 con respecto a los triglicéridos y cuando la longitud de la cadena del grupo acilo aumenta a 18 la preferencia cambia a la posición Sn1. Sus aplicaciones son amplias debido a su regio- y enantioselectividad, ambas, para hidrólisis y síntesis orgánica de mayor estabilidad y actividad catalítica hacia diferentes reacciones (Bornadel, Åkerman, Adlercreutz, Hatti-Kaul, & Borg, 2013).

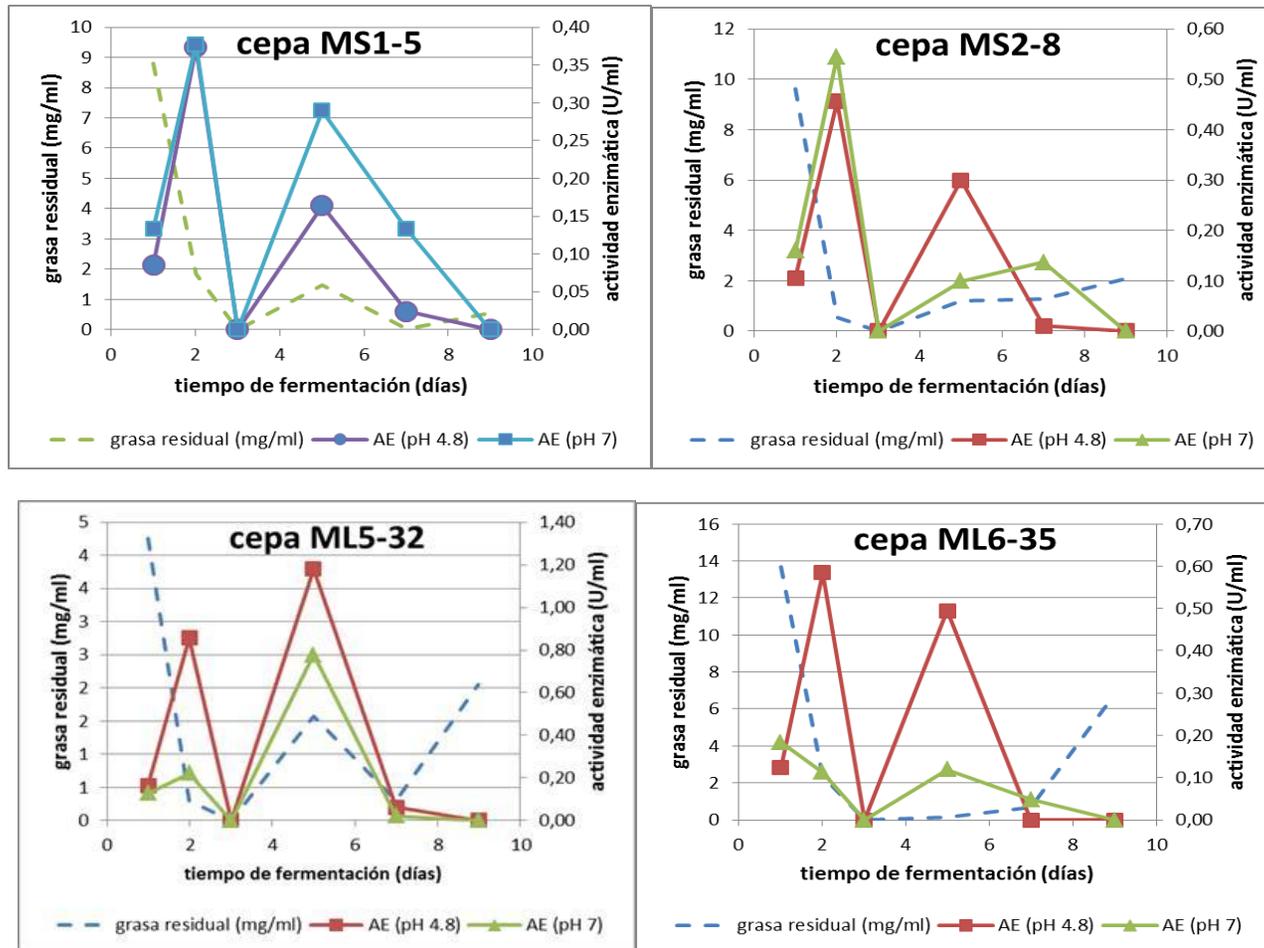


Figura 12: Cinética de consumo de sustrato y producción de lipasas por las cepas seleccionadas en medio mineral con aceite de soja como fuente de carbono.

También está el caso de *Yarrowia lipolytica*, que es una levadura GRAS “no convencional” que produce 8 lipasas, de las cuales una de ellas (LIP2), es excretada extracelularmente en grandes cantidades, desarrollándose métodos de cultivo y herramientas moleculares, así como técnicas de inmovilización para optimizar la actividad, selectividad y estabilidad (Ramos et al., 2015). La LIP2 de *Y. lipolítica* es una lipasa versátil que acepta diversos sustratos no naturales y el conocimiento adquirido sobre su estructura y propiedades es de gran utilidad en el desarrollo de nuevas variantes “a la medida” como biocatalizador en las reacciones síntesis de biodiesel, biopolímeros y ésteres bioactivos de ácido caféico, así como en la resolución de ésteres del ácido 2-bromo-arilacético (Rosas, 2015).

El pH óptimo para las lipasas se encuentra generalmente en el intervalo entre 7,0 y 9,0 cuando la actividad enzimática se ensaya frente a sus sustratos específicos, como el aceite de oliva, la tributirina, otros triacilglicéridos pequeños y la trioleína. No obstante, para algunas lipasas, el pH óptimo se encuentra en la región ácida. Asimismo, se han encontrado lipasas con la mayor actividad a valores de pH más alcalinos (González et al., 2010).

Se ha reportado en la literatura que la composición del medio es esencial para una mejor cuantificación de la actividad lipolítica y producción de biomasa de ahí que se recomiendan medios semejantes al utilizado en esta investigación. El desarrollo de nuevas tecnologías usando lipasas producidas por diferentes tipos de microorganismos ha representado un avance importante en un gran número de aplicaciones industriales llevaron a cabo un estudio sobre la producción de lipasa extracelular a partir de *Fusarium solani* cultivado en un medio compuesto de sulfato de magnesio, fosfato de potasio, nitrato de sodio y peptona, complementado con diferentes fuentes de carbono como: glucosa, aceite de oliva y mezcla glucosa - aceite de oliva, medio semejante al utilizado con la sustitución del aceite de oliva por aceite de soya; de ahí que este sea un medio de cultivo idóneo para la cuantificación de lipasa y la producción de biomasa (Morales & Muñoz, 2005).

Por otro lado, Fadiloglu y Erkmen (2002) estudiaron la producción de lipasas por microorganismos bajo diferentes condiciones de crecimiento; los mejores resultados en la producción de lipasa se obtuvieron con *Candida rugosa* creciendo durante 72 horas en un medio básico compuesto de sulfato de magnesio, fosfato de potasio y nitrato de sodio, suplementado con extracto de levadura, triptona y proteosa - peptona como fuentes de Nitrógeno y fructosa, lactosa, glucosa y aceite de oliva como fuentes de carbono (Morales & Muñoz, 2005). El mayor incremento en la actividad lipolítica fue obtenido con aceite de oliva en combinación con glucosa.

Recientemente se informó (Hiol & Deyris, 2002) del aislamiento de un microorganismo del fruto de palma, identificado como *Mucor sp*, para producir lipasas. El microorganismo fue cultivado en un medio compuesto de fosfato de potasio, fosfato de potasio dibásico, sulfato de magnesio, peptona y aceite de girasol. Se encontró un pH óptimo para la actividad de la lipasa en un valor de 7.0, alcanzándose la máxima actividad después de 6 días de incubación.

De forma similar se comporta la lipasa de *A. fumigatus* y *Aspergillus versicolor* la cual alcanza su máxima actividad pH 7,0 (Coca et al., 2001; Veerabhadrapa et al., 2014)

Los valores de actividad lipolítica de las cepas estudiadas utilizando como sustrato el aceite de soya (Tabla 4) son cercanos a los obtenidos por (Maia et al., 2001) para *Fusarium solani* utilizando diferentes sustratos (Tabla 5).

Tabla 4. Acumulados de actividad enzimática en los picos de máxima producción para las cepas estudiadas.

Cepas	48 horas		120 hora	
	pH4,8 AE(U/l)	pH7 AE(U/l)	pH4,8 AE(U/l)	pH7 AE(U/l)
MS1-5	374	377	164	290
MS2-8	456	545	300	99
ML5-32	580	151	730	481
ML5-35	584	112	49	119

Tabla 5. Actividad lipolítica de *Fusarium solani* crecido sobre diferentes sustratos.

Fuente de carbono 0.5% (v/v)	Actividad lipolítica (U/l)
Trioleína	778
Aceite de coco	231
Aceite de trigo	650
Aceite de palma	371
Aceite de oliva	507
Aceite de sésamo	889

Fuente: (Maia et al., 2001)

Además de los satisfactorios acumulados de actividad enzimática obtenidos bajo las condiciones de cultivo estudiadas, se obtuvieron producciones específicas de enzima entre 0.06 y 0.07 U/mg (a pH 7) y 0.06 y 0,23 U/mg (a pH 4.8), valores estos que se corresponden con niveles de síntesis de enzima adecuados para un bioproceso a escala industrial.

Los resultados obtenidos permiten inferir que las cepas seleccionadas presentan resultados aceptables para continuar con su estudio hacia un escalado de producción industrial de las mismas.

#### 3.4.2.1 Relación entre el consumo de sustrato y la producción de lipasas.

Todas las cepas del presente estudio mostraron resultados similares con respecto a la cinética de consumo del sustrato, evidenciando el consumo completo del sustrato por parte del microorganismo a las 72 horas de cultivo (Figuras 11 y 12), coincidiendo con los picos de la actividad lipolítica, que tienen lugar a las 48 h y a las 120 h, pasando por un mínimo a las 72 h, en cual no se detecta actividad enzimática. Esta relación íntima entre el consumo de sustrato y la acumulación de lipasas sugiere que el primer pico de producción enzimática corresponde a una enzima vinculada directamente al catabolismo del sustrato y, por ende, asociada al crecimiento y, como ocurre regularmente para estas enzimas, inducible por el sustrato.

A partir de las 72 h se comienzan a obtener concentraciones de ácidos grasos que no se corresponden con el sustrato añadido al medio de cultivo, el cual ya se había agotado, lo cual se comprobó visualmente al observarse un medio de cultivo

transparente, evidenciando el consumo total del sustrato. De esto podemos inferir que los ácidos grasos detectados a las 120 h pertenecen a compuestos del metabolismo secundario de los hongos y, por tanto, podría asumirse también que el segundo pico de actividad enzimática (Figura 12) corresponde a una segunda lipasa producto de este metabolismo secundario.

Muchos autores plantean que existen procesos metabólicos en la célula enfocados a la proliferación y crecimiento celular, que incluye todas las rutas bioquímicas e intermediarios (metabolitos primarios) relacionados con la obtención de energía, la reproducción celular y viabilidad. Estos intermediarios son producidos en la etapa activa de crecimiento o fase exponencial en la curva de crecimiento microbiano, siendo algunos de ellos ácidos orgánicos, vitaminas, aminoácidos, entre otros (Pares & Juárez, 2002; Reinhard & Arnold, 2008). Cortez et al. (2013) plantean que existen procesos metabólicos que incluyen al metabolismo secundario en el cual se producen compuestos que comúnmente son excretados al medio donde crece la célula y que no poseen una importancia vital para la misma, obteniéndose a partir de la energía, intermediarios o productos finales del metabolismo primario, principalmente en etapas donde el crecimiento es lento y sostenido. La biosíntesis de metabolitos secundarios ocurre generalmente debido a condiciones de agotamiento de nutrientes en el medio, diferenciación y esporulación coincidiendo con lo sucedido en la presente investigación. Estos compuestos generalmente son de bajo peso molecular, estereoquímica específica, y complejidad química estructural que habitualmente no permiten que la síntesis química reemplace a los procesos aeróbicos de fermentación para su producción (Cortés & Mosqueda, 2013).

La producción de metabolitos secundarios en comparación con la de metabolitos primarios aún no ha sido ampliamente estudiada, pero existe evidencia que afirma que algunos de los procesos de síntesis y regulación son similares en ambos casos (Cortés & Mosqueda, 2013). Hasta ahora son conocidos diferentes procesos regulatorios de la síntesis de los metabolitos secundarios microbianos, encontrándose entre algunos de ellos (Cortés & Mosqueda, 2013):

- Síntesis y degradación de enzimas. En los hongos el control de la síntesis de proteínas se puede regular a nivel del procesamiento del ARN, transcripción o traducción, además de la estabilidad del ARNm en la velocidad de síntesis.
- Inducción, que consiste en la presencia de un compuesto químico (sustrato), el cual debe estar presente en la fase de crecimiento y puede ser considerado un precursor que actuará como inductor de algunas enzimas necesarias para la biosíntesis.
- Regulación catabólica, como su nombre lo indica se reprime la síntesis de enzimas necesarias para sintetizar los metabolitos, debido a la presencia de más de un sustrato útil para el crecimiento, observándose comúnmente con una fuente de carbono polar como la glucosa; así mismo, puede haber una regulación catabólica por parte de la fuente de nitrógeno, debiendo consumirse casi en su totalidad para poder iniciar la producción del compuesto de interés;
- Regulación por retroalimentación (*feedback*), este tipo de regulación existe en variedad de metabolitos secundarios, donde su alta concentración, sobreproducción o análogos de estos, inhibe su propio proceso de síntesis o también cuando estos provienen de un precursor que es intermediario habitual en la biosíntesis de un metabolito primario, que inhibe la formación del secundario.

Las rutas metabólicas en la producción de metabolitos secundarios son cada vez más conocidas y comprendidas, desarrollándose continuamente métodos basados en procesos de mutación, estimulación con precursores, manipulación de los componentes nutricionales y condiciones ambientales del cultivo, todo para desorganizar los mecanismos regulatorios con la finalidad de generar un mayor rendimiento y sobreproducción.

*Conclusiones*



- ❖ Se aislaron 40 cepas de microorganismos con actividad lipolítica provenientes de hábitats contaminados en una refinadora de aceite vegetal, con predominio de los hongos filamentosos sobre las levaduras.
- ❖ Se evaluó de forma cualitativa la actividad lipolítica de los aislados fúngicos, encontrándose 12 cepas, todas de hongos filamentosos y con predominio de aislados procedentes de muestras sólidas, con resultados de intensidad de fluorescencia (en presencia de rodamina B) y halo de precipitación (en medio Tween+CaCl<sub>2</sub>) significativamente superiores al resto.
- ❖ Todas las cepas fúngicas seleccionadas en el ensayo cualitativo acumulan lipasa extracelular, destacando cuatro cepas que llegan a más de 200 U/l. La producción de lipasa ocurre en dos picos, a los dos y siete días
- ❖ La caracterización cinética corroboró la existencia de dos máximos de acumulación de lipasas, a las 48 y 120 horas, correspondiendo el primero con la fase de catabolismo del sustrato y la segunda con el metabolismo secundario.
- ❖ Se seleccionaron dos cepas, MS2-8 y MA5-35, con actividad lipolítica superior a las 500 U/l y concentraciones de biomasa de 20 mg/ml en ambos casos.

# *Recomendaciones*



- ❖ Continuar el estudio con la purificación y la caracterización cinética de la lipasa producida por las cepas seleccionadas.
- ❖ Identificar las especies de las cepas seleccionadas.

*Referencias  
Bibliográficas*



1. Abigor, R., Uadia, P., Foglia, T., Haas, M., Jones, K., Okpefa, E., et al. (2000). Lipase-catalysed production of biodiesel fuel from some Nigerian lauric oils. *Biochem. Soc. Trans*, 28, 979-981.
2. Aceves, A. E., & Castañeda, L. M. (2012). Producción biotecnológica de lipasas microbianas, una alternativa sostenible para la utilización de residuos agroindustriales. *Vitae*, 19(3).
3. Adak, S., & Banerjee, R. (2013). Biochemical Characterisation of a Newly Isolated Low Molecular Weight Lipase from *Rhizopus oryzae* NRRL 3562. *EnzEng*, 2(2).
4. APHA. (2001). Compendium of methods for the microbiological examination of foods. In *Lipolytic Microorganisms* (4th Ed. ed., pp. 175-181).
5. Benjamin, S., & Pandey, A. (2001). Isolation and characterization of three distinct forms of lipases from *Candida rugosa* produced in solid state fermentation. *Braz. Arch. Biol. Techn.*, 44, 213-221.
6. Borges, M. E., & Díaz, L. (2012). Recent developments on heterogeneous catalysts for biodiesel production by oil esterification and transesterification reactions: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16, 2839-2849.
7. Bornadel, A., Åkerman, O., Adlercreutz, P., Hatti-Kaul, R., & Borg, N. (2013). Kinetic modeling of lipase-catalyzed esterification reaction between oleic acid and trimethylolpropane: A simplified model for multi-substrate multi-product ping-pong mechanisms. *Biotechnology Progress*, 29(6), 1422-1429.
8. Borugadda, V. B., & Goud, V. V. (2012). Biodiesel production from renewable feedstocks: Status and opportunities. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16, 4763-4784.
9. Canakci, M. (2007). The potential of restaurant waste lipids as biodiesel feedstock. *Bioresource Technology*, 98, 183-190.

10. Carissimi, M., Ottonelli, C. D., Furtado, T., Corbellini, V. A., & Scroferneker, M. L. (2007). Comparison of lipolytic activity of *Sporothrix schenckii* strains utilizing olive oil-rhodamine B and tween 80. *TECNO-LÓGICA*, 11(1).
11. Coca, J., Hernández, O., Berrio, R., Martínez, S., Días, E., & Dustet, J. C. (2001). Producción y caracterización de las lipasas de *Aspergillus niger* y *A. fumigatus*. *Biotecnología Aplicada*, 18, 216-220.
12. Colla, L. M., Rezzadori, K., Camara, S., Debon, J., Tibolla, M., Bertolin, T., et al. (2009). A Solid-State Bioprocess for Selecting Lipase-Producing Filamentous Fungi. *Z. Naturforsch.*, 64c, 131-137.
13. Cortés, A. J., & Mosqueda, T. (2013). Una mirada a los organismos fúngicos: Fábricas versátiles de diversos metabolitos secundarios de interés biotecnológico. *Química Viva*, 12(2), 64-90.
14. Dalla-Vecchia, R., Nascimento, M. d. G., & Soldi, V. (2004). Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. *Quim. Nova*, 27(4), 623-630.
15. Dincer, K. (2008). Lower emissions from biodiesel combustion. *Energy Sources, Part A*, 30963-30968.
16. Domínguez, A., Costas, M., Longo, M., Longo, M. A., & Sanromán, A. (2003). A novel application of solid state culture: production of lipases by *Yarrowia lipolytica*. *Biotech. Letters*, 25, 1225-1229.
17. Elibol, M., & Ozer, D. (2002). Response surface analysis of lipase production by freely suspended *Rhizopus arrhizus*. *Process Biochem.*, 38, 367-372.
18. Ertuğrul, S., Dönmez, G., & Takaç, S. (2009). Isolation of lipase producing *Bacillus* sp. from olive mil wastewater and improving its enzyme activity. *Journal Hazardous Materials* 149, 720–724.
19. Ferrer, M., Plou, F. J., Nuero, O. M., Reyes, F., & Ballesteros, A. (2000). Purification and properties of a lipase from *Penicillium chrysogenum* isolated from industrial waste. *J. Of Chem. Technol. And Biotechnol.*, 75, 569-576.

20. Fjerbaek, L., Christensen, K. V., & Norddahl, B. (2009). A Review of the Current State of Biodiesel Production Using Enzymatic Transesterification. *Biotechnology and Bioengineering*, 102, 1298-1315.
21. Gerhard, K., Van Gerpen, J., & Krahl, J. (2005). *The Biodiesel Handbook* (AOCS Press ed.). Champaign, Illinois.
22. Gombert, A. K., Pinto, A. L., Castilho, L. R., & Freire, D. M. G. (1999). Lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state fermentation using babassu oil cake as substrate. *Process Biochem.*, 35, 85-89.
23. González, J., Rodríguez, J., & Del Monte, A. (2010). Lipases: enzymes having the potential for developing immobilised biocatalysts by interfacial adsorption. *Rev. Colomb. Biotecnol.*, XII(1), 124-140.
24. Gupta, N., Rathi, P., Rajni, S., Goswami, V. K., & Gupta, R. (2005). Single-step purification of lipase from *Burkholderia multivorans* using polypropylene matrix. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67, 648-653.
25. Gupta, R., Rathi, P., Gupta, N., & Bradoo, S. (2003). Lipase assays for conventional and molecular screening: an overview. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 37, 63-71.
26. Hassan, F., Shah, A., & Hameed, A. (2009). Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. *Biotechnology Advance*, I(27), 782-798.
27. Hiol, A., & Deyris, V. (2002). Isolation and characterization of an extracellular lipase from *Mucor sp* strain isolated from palm fruit. *Enzyme and Microbial technology*, 31.
28. Hong-wei, Y., Jun H, N., L.I. , Xiao, Q., & Ying-min, J. (2009). Fermentation Performance and Characterization of Cold-Adapted Lipase Produced with *Pseudomonas Lip35*. *Agricultural Sciences in China*, 8, 956-962.
29. Irazoqui, H. A. (2002). La oleoquímica, usos alternativos de los aceites vegetales. Productos y aplicaciones de mayor valor comercial a partir de los ésteres y de la glicerina. *Revista A & G 23. Aceites y Grasas.*, 6(23).
30. Jesus, M. F. C. P., Branco, R. N., Sant'Anna Jr., G. L., Freire, D. M. G., & Silva Jr., J. G. (1999). *Penicillium restrictum* lipases: a comparative study

- and characterization of enzyme with different degree of purity. *Braz. J. of Chem. Eng.* , 16, 113-118.
31. Jonzo, M., & Rugani, N. (2000). Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit. *Enzyme and Microbial technology*, 26.
32. Khor, H. T., Tan, N. H., & Chua, C. L. (1986). Lipase-catalyzed hydrolysis of palm oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* , 63(538-540).
33. Kurtzman, C., Fell, J. W., & Boekhout, T. (2011). *The Yeasts: A Taxonomic Study* (5th Edition ed.).
34. Leal, M. C. M. R., Cammarota, M. C., Freire, D. M. G., & Sant'anna, G. L. (2002). Hydrolytic enzymes as coadjuvants in the anaerobic treatment of dairy wastewater. *Braz. J. of Chem*, 19, 175-180.
35. Lew, P., Hemanathan, K., & Vasudeo, P. (2014). Enzymatic biodiesel: Challenges and opportunities. *Applied Energy*, 119, 497–520.
36. Lima, V., Krieger, N., Sarquis, M., Mitchell, D., Ramos, L., & Fontana, J. (2003). Effect of Nitrogen and Carbon Sources on Lipase Production by *Penicillium aurantiogriseum*. *Food Technol. Biotechnol.*, 41(2), 105-110.
37. Linton, K., Stone, P., & Wise, J. (2008). Patenting trends and innovation in industrial biotechnology. *Gen Publishing Inc*, 4(4).
38. Liu, Y., Li, C., Wanga, S., & Chen, W. (2014). Solid-supported microorganism of *Burkholderia cenocepacia* cultured via solid state fermentation for biodiesel production: Optimization and kinetics. *Applied Energy*, 113, 713–721.
39. Mahadik, N. D., Puntambekar, U. S., Bastawde, K. B., Khire, J. M., & Gorbale, D. V. (2002). Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid-state fermentation. *Process Biochem.*, 38, 715-721.
40. Maia, M. M. D., Heasley, A., Morais, M. M. C., Melo, E. H. M., Morais Jr., M. A., Ledinghman, W. M., et al. (2001). Effect of culture conditions on lipase production by *Fusarium solani* in batch fermentation. *Biores. Technol.*, 76, 23-27.

41. Manguesh, G., Kulkarni, & Dalai, A. K. (2006). Waste Cooking Oils, An Economical Source for Biodiesel: A Review. *Industrial Engineering Chemistry Resource*, 45, 2901-2913.
42. Marsano, D., Indrati, R., & Ohta, Y. (1998). A simple method for determination of free fatty acids for soluble and immobilized lipase assay. *Indonesian Food and Nutrition Progress*, 5(2).
43. McNeelly, M., & Massion, C. (1972). The Measurement of Total Fatty Acid in Serum. *Annals of Clinical Laboratory Science*, 2(5), 376-382.
44. Mendoza, L. I. (2010). *Aislamiento y selección de hongos lipolíticos a partir de aceites vegetales de desecho (proveniente de frituras) utilizados en la elaboración de biodiesel*. Unpublished Tesis para optar al título profesional de Biólogo con Mención en Microbiología y Parasitología, Universidad Nacional Mayor de San Marcos Lima – Perú.
45. Mendoza, L. I., Lino, M., Leon, J., & Santiago, J. (2012). Evaluación de la actividad lipolítica de hongos sobre aceite de higuera. *Revista Peruana de Química*, 15(1), 5-10.
46. Miranda, O. A., Salgueiro, A. A., Pimentel, M. C. B., Lima Filho, J. L., Melo, E. H. M., & Duran, N. (1999). Lipase production by a Brazilian strain of *Penicillium citrinum* using industrial residue. *Biores. Technol.*, 69, 145-147.
47. Morales, A., & Muñoz, M. (2005). *Establecimiento de la actividad lipolítica y de las condiciones de crecimiento del microorganismo presente en el fruto de palma maduro para la producción de ácidos grasos*. Unpublished Tesis para optar al título de ingeniero de producción agroindustrial, Universidad de la Sabana, Chia.
48. Novo Nordisk. (1995). *Em Catálogo Informativo* (Vol. 30).
49. Nwuche, C. O., & Ogonna, J. C. (2011). Isolation of lipase producing fungi from palm oil mill effluent (POME) dump sites at Nsukka. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 54(1), 113-116.
50. O'Donnell, E. T. (1975). *A study of the lipase enzymes of psychrophilic bacterie*. Unpublished PhD Thesis, University of Strathclyde, Glasgow, U.K.

51. Pares, F. R., & Juárez, G. A. (2002). *Bioquímica de los microorganismos* (1ra reimpresión ed.): Editorial Reverte.
52. Paskevicius, A. (2001). Lipase activity of yeasts and yeast-like fungi functioning under natural conditions. *Biologija*, 4, 16-18.
53. Pinto, A. C., Guareiro, L. N., Rezende, M. J., Ribeiro, N. M., Torres, E. A., Lopes, W. A., et al. (2005). Biodiesel: An Overview. *J. Braz. Chem. Soc.*, 16(6B), 1313-1330.
54. Ramos, L., Cujilema, M., Julian, M., Cordova, J., & Fickers, P. (2015). Fungal Lipase Production by Solid-State Fermentation. *J Bioprocess Biotech*, 5(2), 1-9.
55. Ranganathan, S. V., Narasimhan, S. L., & Muthukumar, K. (2008). Review An overview of enzymatic production of biodiesel. *Bioresource Technology*, 99, 3975-3981.
56. Reinehr, C. O., Rizzardi, J., Fernandes Silva, M., Oliveira, D., Treichel, H., & Colla, L. M. (2014). Produção de lipases de *Aspergillus niger* E *Aspergillus fumigatus* através de fermentação em estado sólido, avaliação da especificidade do substrato e seu uso em reações de esterificação e alcoólise. *Quim. Nova*, 37(3), 454-460.
57. Reinhard, R., & Arnold, L. D. (2008). *Biotechnology for beginners*: Elsevier.
58. Rivera, C., & Garcia, F. (2007). Enzimas lipolíticas y su aplicación en la industria del aceite. *BioTecnología*, 11(2), 37-43.
59. Rosas, J. C. (2015). *Aislamiento y caracterización de un hongo productor de enzimas lipolíticas*. Unpublished Tesis en Ingeniería de los Alimentos, Universidad Veracruzana, Xalapa, Enríquez, Veracruz. .
60. Sandoval, G., & Marty, A. (2007). Screening methods for synthetic activity of lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 390-393.
61. Shah, S., Sharma, S., & Gupta, M. (2004). Biodiesel preparation by lipase-catalyzed transesterification of Jatropha oil. *Energy & Fuels.*, 18, 154-159.
62. Sharma, R., Chisti, Y., & Banerjee, U. C. (2001). Production, purification, characterization and applications of lipases. *Biotechnol. Adv.*, 19, 627-662.

63. Shelley, A. W., Deeth, H. C., & Mac Rae, I. C. (1987). Review of methods of enumeration, detection and isolation of lipolytic microorganisms with special reference to dairy applications. *Journal of Microbiological.*, 6, 123-137.
64. Sierra, G. (1956). A simple method for the detection of lipolytic activity of micro-organisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. . *Antonie van Leeuwenhoek*, 23, 15-22.
65. Sigar, C., Soni, S., Mathur, J., & Sharma, D. (2009). Performance and emission characteristics of vegetable oil as diesel fuel extender. *Energy Sources, Part A*.
66. Soares, D., Ferreira, A., Guilherme, A., Mitchella, D., & Krieger, N. (2013). Biodiesel production from soybean soapstock acid oil by hydrolysis in subcritical water followed by lipase-catalyzed esterification using a fermented solid in a packed-bed reactor. *Biochemical Engineering Journal* 81, 15– 23.
67. Straathof, A. J., Panke, S., & Schmid, A. (2002). The production of fine chemicals by biotransformations. *Curr Opin Biotechnol*, 13, 548-556.
68. Ul-Haq, I., Idrees, S., & Rajoka, M. I. (2002 ). Production of lipases by *Rhizopus oligosporous* by solid-state fermentation. *Process Biochem.*, 37, .637-641.
69. Veerabhadrapa, M., Shivakumar, S., & Devappa, S. (2014). Solid-state fermentation of *Jatropha* seed cake for optimization of lipase, protease and detoxification of anti-nutrients in *Jatropha* seed cake using *Aspergillus versicolor* CJS-98. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 117(2), 208-214.
70. Vera, L. F. (2007). Enzimas: que son y para que sirven. *Revista de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 101(2), 399-417.
71. Zheng, S., Kates, M., Dube, M., & McLean, D. D. (2006). Acid-catalyzed production of biodiesel from waste frying oil. *Biomass and Bioenergy*, 30, 267-272.

*Anexos*



## Anexo 1: Hoja técnica aceite de soya.



# Hoja Técnica del Aceite de Soya

**PRODUCTO: ACEITE DE SOYA RBD**

### DESCRIPCIÓN:

Producto que se obtiene al procesar el aceite desgomado de soya pasando por las etapas de refinado, blanqueado y deodorizado.

### COMPOSICIÓN:

Parámetros	Mínimo	Máximo
Ácido Láurico C12:0	0	0.1
Ácido Mirístico C14:0	0	0.2
Ácido Palmítico C16:0	9.7	13.3
Ácido Palmitoléico C16:1	0	0.2
Ácido Estearico C18:0	3.0	5.4
Ácido Oléico C18:1	17.7	28.5
Ácido Linoléico C18:2	49.8	57.1
Ácido Linolénico C18:3	5.5	9.5
Ácido Araquídico C20:0	0.1	0.6
Ácido Gadoléico C20:1	0	0.3
Ácido Eicosadiénoico C20:2	0	0.1
Ácido Behénico C22:0	0.3	0.7
Ácido Erúsico C22:1	0	0.3
Ácido Lignocérico C24:0	0	0.4

**CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS:**

Parámetros	Mínimo	Máximo
Ácidos grasos libres (como ácido oléico), en %	--	0,05
Humedad y materia volátil, en %	--	0,05
Prueba fría a 273 (° C ) horas	5,5	--
Estabilidad en horas OSI a 110 ° C	6	--
Impurezas insolubles, en %	--	0,02
Materia insaponificable en %	--	1,0
Índice de refracción a 313 K (40 ° C) nD	1,466	1.470
Índice de saponificación mg KOH /g	189	195
Gravedad específica (20°C/agua 20 °C)	0,916	0,925
Jabón (como oleato de sodio) (ppm)	--	0
Índice de peróxido (meq/kg)	--	1,5
Fósforo (ppm)	--	4
Índice de Yodo	112	143
Color en escala Lovibond	--	20 Amarillo / 2.0 Rojo

**CARACTERÍSTICAS FÍSICAS:**

Propiedad	Valor
Gravedad específica a 25 °C	0.9175
Índice de refracción	1.4728
Refracción específica	0.3054
Viscosidad , centipoise a 25 ° C	50.09
Punto de solidificación ° C	-10 a -16
Calor específico cal/g a 19.7 ° C	0.458
Calor de combustión, cal/g	9.478
Punto de desprendimiento de gases °C	363

Punto de ignición espontánea ° C	363
Aspecto:	Claro y brillante a 21 – 29 ° C
Sabor (intensidad)	Suave a frijol
Olor ( intensidad )	Suave a frijol
Humedad y materia volátil (%)	0.05 máximo
Punto de humo ° C	234 mínimo
Prueba de frío (5.5 hrs mínimo)	Negativo
Temperatura ° C	32. máximo

### TABLA NUTRICIONAL:

Información Nutricional	
Tamaño de la porción:	
1 cucharada	(15.4 ml)
Cantidad por porción	
Contenido Energético	532 KJ (126 Kcal)
Proteína	0 g
Carbohidratos	0 g
Grasa total	14 g
De la cual:	
Poliinsaturada	8.5 g
Monoinsaturada	3.4 g
Saturada	2.1 g
Ácidos Grasos Trans	0 g
Ácido Linolénico (OMEGA 3)	1.0 g
Ácido Linoléico (OMEGA 6 )	7.5 g
Colesterol	0 mg