

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA

FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE CIENCIAS, TECNOLOGÍA E

INGENIERÍA DE ALIMENTOS



**AISLAMIENTO DE HONGOS PRODUCTORES DE LIPASAS,
EMPLEANDO ACEITE CRUDO DE PALMA Y DETERMINACION
DE LA PRODUCTIVIDAD LIPOLÍTICA**

TESIS

Para optar el título de:

INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

ROXANA TRUJILLO VALDERRAMA

PROMOCION 2001- I

Tingo María – Perú



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA
Tingo María
FACULTAD DE INGENIERIA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

Av. Universitaria s/n. Teléfono (062) 561385 - Fax: (062) 561156
Apart. Postal 156 Tingo María E.mail: fia@unas.edu.pe

"Año de la Consolidación Democrática"

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los Miembros del Jurado que suscriben, reunidos en acto público el 09 de junio del 2006, a horas 03:00 p.m. en le Auditorium de la Escuela de Postgrado de la Universidad Nacional Agraria de la Selva, ubicada en la ciudad de Tingo María, provincia de Leoncio Prado, departamento de Huánuco, para calificar la tesis presentado por la Bachiller en Ciencias Industrias Alimentarias: **Roxana TRUJILLO VALDERRAMA**.

**"AISLAMIENTO DE HONGOS PRODUCTORES DE LIPASA,
EMPLEANDO ACEITE CRUDO DE PALMA Y DETERMINACIÓN
DE LA PRODUCTIVIDAD LIPOLÍTICA"**

Después de haber escuchado la sustentación, las respuestas a las preguntas formuladas, lo declaran aprobado con el calificativo de **MUY BUENO**, en consecuencia la Bachiller: **Roxana TRUJILLO VALDERRAMA**, queda apto para recibir el título de **Ingeniero en Industrias Alimentarias** del Consejo Universitario, de conformidad con el Art.22° de la Ley Universitaria 23733; los artículos 43° y 45° del Estatuto y los artículos 95° y 96° del Reglamento General de la Universidad Nacional Agraria de la Selva.

Tingo María, 21 de junio del 2006

.....
Blga. Margarita Alcedo Romero
Presidente



.....
Dr. Wilson Castillo Soto.
Vocal

.....
Ing°. Casiano Aguirre Escalante
Vocal

.....
Ing°. M.Sc. Pedro Pablo Peláez Sánchez
Asesor

I. INTRODUCCION

Los ecosistemas por sus características ecológicas constituye el hábitad de diversos microorganismos, que para nutrirse secretan enzimas encargadas de degradar los nutrientes del medio; entre ellos las lipasas. Se ha demostrado que las enzimas lipasas, obtenidas a partir de microorganismos, pueden ser utilizadas en aplicaciones industriales, tal como en la industria alimentaria, para la biotransformación de grasas y otros lípidos por hidrólisis y esterificación, para la elaboración de productos dietéticos con bajo nivel de grasa y colesterol; en la industria del papel, con el objetivo de eliminar la cera de la pulpa; en la industria farmacéutica, para la obtención de moléculas bioactivas así como procesos de síntesis química, para la obtención de compuestos puros; entre otros.

En la biotransformación de aceites, las lipasas permiten modificar el aceite de palma, rico en grasas saturadas, que es considerado perjudicial, por constituir un factor de riesgo para enfermedades cardiovasculares, incluido el cáncer (RODRÍGUEZ, *et al.* 1997). Es decir, el tratamiento enzimático con lipasas al aceite de palma permitiría conseguir un producto con mayores características para la salud lográndose a la vez una mejor participación en el mercado nacional e internacional.

Según datos de AGROINDUSTRI@ (2001), el aumento de la demanda en el Perú del aceite de palma podría incrementar la producción de

palma aceitera hasta 2 millones de hectáreas consideradas como tierras hábiles para éste cultivo, lo que significaría a corto plazo 10 millones de toneladas de aceite equivalente a US \$ 4 millones por año. Asimismo disminuiría las importaciones del aceite en el mercado interno.

Existe una gran diversidad de microorganismos en la Amazonía, los cuales se presentan como potenciales en la producción de enzimas, sin embargo, estos aún no han sido estudiados, en nuestro caso la investigación se orienta a la búsqueda de microorganismos productores de lipasas, los cuales podrían ser utilizados en la industria alimentaria; básicamente en la modificación estructural del aceite de palma, aperturándose la posibilidad de producción de lipasa a nivel piloto y posterior producción industrial. Con estas consideraciones nos planteamos la hipótesis: En nuestro medio existen microorganismos que pueden ser aislados, identificados y que al ser cultivados en aceite crudo de palma pueden producir enzima lipasa que muestran diferente actividad y productividad en función del tipo de sustrato.

Los objetivos de investigación fueron los siguientes:

- Aislar e identificar mohos y levaduras productores de lipasas que crecen en forma natural en la fábrica, área agrícola y zona de desecho de Industrias del Espino S.A. (Santa Lucía – Uchiza).
- Determinar la actividad y productividad lipolítica de las enzimas lipasas, en sustratos de estearina, aceite crudo de palmiste, refinado blanqueado y deodorizado, aceite crudo de palma, super oleina y oleina de palma, a partir de hongos en cultivos sumergidos.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Aislamiento y selección de microorganismos lipolíticos

Los microorganismos (menores de 0.1 mm), son aislados por diluciones seriadas a partir de muestras de suelo (CÁRDENAS *et al.*, 2000), fuentes termales, medios salinos (LÓPEZ, 2001), alimentos fermentados (NURIDA *et al.*, 2001) y de procedencias diversas (residuos industriales, depuradoras de agua).

Para seleccionar los microorganismos productores de lipasas las cepas aisladas se cultivan en medios (sólidos y líquidos) adecuados a los que se adiciona triglicéridos (aceite de oliva o tributirina) como inductor, además de una fuente de carbono (KOJIMA *et al.*, 1994 y TORTORA, 1993); y luego de un periodo de incubación, las colonias productoras de lipasa presentan a su alrededor halos transparentes producidos por la hidrólisis de los triglicéridos presentes en el medio de cultivo.

Muchas bacterias, levaduras, hongos y actinomicetos son conocidas por secretar lipasa entre ellas tenemos los géneros *Geotrichum*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizomucor*, *Saccharomyces* y *Candida* (LOTTI *et al.*, 1993; STÖCKLEIN *et al.*, 1993; TOMIZUKA *et al.*, 1996; MIURA *et al.*, 1997; HABA *et al.*, 2000 y COCA *et al.*, 2001). En el Cuadro 1 se presenta el número

de bacterias actinomicetos, levaduras y hongos aislados de muestras de suelo usando técnicas de screening taxonómico jerarquizado, con tres niveles de ensayo: ensayo en medio sólido con aceite de oliva, ensayo de hidrólisis en medio líquido con oleato de resorufinilo y ensayo de hidrólisis de aceite de oliva (CARDENAS, 1999).

Cuadro 1. Número y distribución en grupos microbianos de los microorganismos seleccionados en un proceso screening

Paso screening	Nº de cepas	Distribución en grupos Microbianos			
		Bacteria	Actinomicetos	Levaduras	Hongos
Aislamiento de suelo	2000	200	840	100	860
Microorganismos activos en screening en medio sólido	450	181	83	61	125
Microorganismos activos en screening en medio líquido (ensayo cronogénico)	118	11	56	06	45
Microorganismos activos en screening en medio líquido (ensayo titrimétrico)	14	01	03	01	09

Fuente: CÁRDENAS (1999)

2.2 Lipasas

Según Friedrich (1994) citado por COCA *et al.* (2001) las lipasas (triacylglicerol hidrolasas EC 3.1.1.3) son enzimas que hidrolizan triglicéridos a

ácidos grasos y glicerol; y que tienen la capacidad de trabajar en presencia de moderadas o elevadas cantidades de disolventes orgánicos, realizando reacciones de síntesis de esteres bien por reacción de alcoholes y ácidos o vía transesterificación por reacción de un éster con un ácido o con un alcohol (PROYECTO Lipasa, 1997).

Algunos ejemplos de investigaciones realizadas en la industria alimentaria que destacan la importancia de la utilización de lipasas en la hidrólisis y modificación estructural de grasas y aceites (RODRIGUEZ *et al.*, 1997; VALENZUELA *et al.*, 1994 y MAZZA, 2000); entre otros.

2.3 Producción de lipasas

La mayoría de las lipasa son producidas por procesos de fermentación en cultivos sumergidos, entendiéndose por éstos aquellos en los que nutrientes y microorganismos se encuentran en la fase acuosa con diferentes procesos entre los que se incluyen batch, fed-batch y procesos en continuo.

La fermentación, según QUINTEROS (1993), es el aprovechamiento bajo condiciones controladas de materiales biológicos tales como microorganismos, tejido celular, animal, productos microbianos y enzimas. Es decir, fermentación comprende micrororganismos, anhídrido carbónico y productos intra y extracelulares.

Puede ser aeróbica, cuando se provee de oxígeno molecular al sistema, y anaeróbica, cuando el oxígeno molecular está ausente.

Para fines de investigación a nivel de laboratorio la producción de lipasa generalmente se realiza por fermentación en batch donde la solución esterilizada de nutrientes se inocula con microorganismos y se permite que se lleve a cabo la incubación en condiciones óptimas de fermentación, a lo largo de toda la fermentación no se añade nada excepto oxígeno (en forma de aire) en agente antiespumante y ácidos o bases para controlar el pH, la composición del medio de cultivo, la concentración de biomasa y la concentración de metabolitos cambian generalmente en forma continua como resultado del metabolismo de las células; después de la inoculación de una solución nutritiva estéril con microorganismo y su cultivo en condiciones fisiológicas (CRUEGER, 1993).

Un medio de cultivo óptimamente equilibrado es obligatorio para conseguir máxima producción de lipasas por ello al medio para la fermentación se adiciona entre 0.5 % a 2% de emulsiones de triglicéridos que actúan como inductores de las lipasas de diversos microorganismos, estos pueden ser ácidos grasos y sus derivados incluyendo ácidos saturados e insaturados, alcoholes y ésteres (CÁRDENAS, 1999 y COCA *et al.*,2001).

Los parámetros más importantes que se deben tomar en cuenta en la fermentación son:

2.3.1. Temperatura y pH

Como en casi la totalidad de los procesos de fermentación industrial, la temperatura es regulada a lo largo de la fermentación. La mayoría de las lipasa trabajan a temperatura entre 30 a 40 °C; pero algunas son activas a temperaturas tan bajas como – 29 °C (LÓPEZ, 2001).

Generalmente la temperatura y el pH de óptimo crecimiento del microorganismo productor de enzimas coinciden con las condiciones de máxima producción de la enzima. La mayoría de las lipasa presentan su pH óptimo entre 8 y 9, también se ha reportado lipasa con pH óptimo en el lado ácido. (LÓPEZ, 2001). En el Cuadro 2 se presenta la temperatura y pH de algunas lipasas microbianas.

Cuadro 2. Temperatura y el pH óptimo de varias lipasas

Organismos	pH óptimo	T óptima (°C)
<i>Penicillium chrysogenum</i>	6.2 – 6.8	37
<i>Pseudomonas fragi</i>	7.0 – 7.2	32
<i>Rhizopus dilemar</i>	5.6	35
<i>Aspergillus níger</i>	5.6	35
<i>Penicillium roqueforti</i>	8.0	37
<i>Staphylococcus aureus</i>	8.5	45
<i>Geotrichum candidum</i>	8.2	37
<i>Achromobacter lipolyticum</i>	7.0	37

Fuente: CRUEGER (1993)

2.3.2. Aireación

La velocidad de aireación, según CRUEGER (1993), se ajusta a la cantidad de oxígeno que se requiera, puede ser entre 0.25 – 1.0 v/vm (volumen de aire/ volumen de líquido por minuto).

Investigaciones realizadas sobre producción de lipasas microbianas nos demuestran que la actividad lipolítica depende del tipo de microorganismo, del inductor y de las condiciones óptimas que se den durante la fermentación; por ejemplo en el estudio “Producción y caracterización de las lipasas de *Aspergillus niger* y *A. fumigatus*, la actividad lipolítica de *A. niger* es 0.26 UI/ml y de *A. fumigatus* 0.21 UI/ml en un medio con presencia de aceite de oliva y a valores óptimos de pH 6 , 40 °C y pH 7, 80 °C respectivamente (COCA, 2001); en el estudio “Novel microbial lipases: Application to the resolution of racemic mixtures” se presenta la actividad lipolítica de diferentes microorganismos en medios con inductores de aceite de oliva y tributirina (Cuadro 3) y la actividad lipolítica de cuatro microorganismos en medios con diferentes inductores (Cuadro 4) a una temperatura de 28 °C y a pH 7; observándose mayor producción de lipasa cuando se emplea como inductores el ácido oleico o sus derivados particularmente el anhídrido oleico. Es decir que los ácidos grasos saturados conducen a valores de inducción inferior a los ácidos grasos insaturados y en especial el ácido oleico (CÁRDENAS F., 1999; CÁRDENAS F. *et al.*, 2000; SINISTERRA Y SÁNCHEZ-MONTERO, 1998).

Cuadro 3. Actividad hidrolítica (Lipasa) de 14 microorganismos frente a aceite de oliva y tributirina

Cepas Productoras	Activ. Lipolítica (UI/ml)	
	Aceite oliva	Tributirina
<i>A. Murorum</i>	0.72	5.18
<i>M. mucoroides</i>	3.02	4.31
<i>Monascus sp</i>	2.35	2.37
<i>A. ciferrii</i>	1.43	1.89
<i>Fusarium poae</i>	0.93	1.47
<i>F. solani</i>	0.60	1.25
<i>F. oxysporum</i>	2.83	5.70
<i>Penicillium chrysogenum</i>	0.64	4.68
<i>Ovadendron. sulphureo – ochrauum</i>	4.33	6.10
<i>Rodotorula araucariae</i>	0.75	3.64
<i>Brevibacterium linens</i>	0.35	1.83
<i>Streptomyces fradiae</i>	0.89	3.16
<i>S. halstedii</i>	0.70	1.27
<i>Streptomyces sp.</i>	1.16	2.10

Fuente: CÁRDENAS (1999)

Cuadro 4. Actividad lipolítica (μmol de ácido/h/ml) medido en los caldos de cultivos de los microorganismos utilizando distintos inductores.

Inductor	<i>R. Araucariae</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>P. chrysogenum</i>	<i>A.ciferri</i>
Aceite de oliva	50	450	80	50
Acido oleico	60	350	40	80
Acido miristoleico	NT	450	30	NT
Acido palmitoleico	50	260	40	40
Acido laurico	40	260	30	50
Acido mirístico	30	260	40	50
Acido palmítico	30	260	50	50
Acido esteárico	30	270	10	30
Anhidrido oleico	NT	460	30	NT
Alcohol oleyl	380	260	60	150
Cloruro oleoyl	380	290	30	90

NT = No probado

Fuente: CÁRDENAS (1999)

2.4 Aceite de palma

El aceite de palma se obtiene del mesocarpio carnoso del fruto de la palma de aceite (*Elaeis guineensis*). Tiene alto contenido de triglicéridos sólidos; la relación es de 1:1 entre ácidos grasos saturados e insaturados, lo cual le da la consistencia deseada sin necesidad de hidrogenación. Además contiene antioxidantes naturales como los tocoferoles.

Los subproductos de la palma aceitera son:

El **aceite de palmiste** se obtiene de la almendra del fruto de la palma de aceite (*Elaeis guineensis*).

El **aceite refinado, blanqueado y deodorizado (RBD)** así obtenido, es un producto semisólido que requiere ser sometido a un proceso de fraccionamiento a través del cual, mediante cambios de temperatura, se separa la fracción líquida (oleína) de la fracción sólida (estearina).

La **oleina de palma** es la fracción líquida obtenida del fraccionamiento del aceite de palma (descrito anteriormente).

La **estearina de palma** es la fracción con punto de fusión elevado obtenida del fraccionamiento del aceite de palma (descrito anteriormente).

La **Super-oleina de palma** es la fracción líquida obtenida del fraccionamiento del aceite de palma (descrito anteriormente) producido por un proceso de cristalización controlado específicamente para obtener un índice de yodo de 60 o más.

En el Cuadro 5, composición de ácidos grasos del aceite de palma y sus derivados.

Cuadro 5. Composición de ácidos grasos del aceite de palma y derivados (expresadas en porcentaje del contenido total de ácidos grasos)

Perfil Ac. Grasos (% Grasa verdadera)	Palma	Estearina de Palma	Palmiste	Oleina	Super Oleina
C<14	ND	> 50	ND	0.1-0.5	0.1-0.5
Mirístico	C14:0 0.5 -2.0	15,0	14.0-18.0	0.5-1.5	0.5-1.5
Palmítico	C16:0 39.3-47.5	48.0-74.0	58.0	38.0-43.5	30.0-39.0
Palmitoleico	C16:1 ND	-	ND	ND	ND
Estéarico	C18:0 3.5-6.0	1,7	5,1	3.5-5.0	2.8-4.5
Oleico	C18:1 36.0-44.0	15.5-36.0	12.0-28.1	39.8-46.0	43.0-49.5
Linoleico	C18:2 9.0-12.0	1.1-10.0	6,1	10.0-13.5	10.5-15.0
Linolénico	C18:3 ND	-	ND	ND	0.2-1.0
	C _{>=20} ND	-	ND	ND	ND
Índice Yodo	92-125	≤ 48	14.1-21.0	≥ 56	≥ 60
Ind. Saponificación	190-209	193-210	230-254	194-202	180-205

Fuente: FEDNA (2003)

III. MATERIALES Y METODOS

3.1 Lugar de ejecución

El trabajo se ejecutó en los laboratorios de Centro de Investigación para el Desarrollo de Biotecnológico de la Amazonía (CIDBAM), Análisis de Alimentos y Microbiología de Alimentos de la Universidad Nacional Agraria de la Selva; ubicada en la ciudad de Tingo María, provincia de Leoncio Prado, departamento de Huánuco, a una altitud de 660 msnm, con un clima tropical húmedo, humedad relativa promedio de 80% y una temperatura promedio anual de 28 °C.

La taxonomía de los microorganismos seleccionados se determinó en Universidad de Valencia, Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), del Grupo de Biotransformaciones de la Universidad Complutense de Madrid. España.

3.2 Etapas de la investigación

El estudio se dividió en dos etapas: la primera: Aislamiento e identificación de microorganismos productores de lipasa y la segunda: evaluación de la producción de lipasas en microorganismos seleccionados.

3.3 Etapa 1: Aislamiento e identificación de microorganismos productores de lipasa

Este ensayo comprendió el muestreo, aislamiento, selección, evaluación de biomasa de los microorganismos e identificación de microorganismos.

3.3.1. Toma de muestras

Las muestras fueron tomadas en la fábrica, área agrícola y zona de desechos de la empresa Industrias del Espino S.A. (Santa Lucía – Uchiza), las cuales fueron: fruto maduro de palma(F) y tierra de la plantación (P); sólidos (ST), residuo sólido de macerado del fruto con agua caliente, aproximadamente a 50 °C; desecho sólido de fábrica (DS) y desecho líquido (DL) obtenido de la canaleta de la planta industrial, aproximadamente, a 40°C.

3.3.2. Aislamiento de microorganismo

El proceso de aislamiento de microorganismos se realizó siguiendo la metodología descrita por CARDENAS (1999); que consistió en extraer porciones o alícuotas de materiales muestreados, diluirlos en agua estéril (JAY, 1981 y MONZON, 2001) y sembrarlos en medios sólidos diferenciales YED y RB (Cuadro 6); después de incubarlos se procedió a discriminar los microorganismos aislando y purificando por resiembra; asimismo se sembraron los microorganismos en medio BYPO sólido (Cuadro 6), a fin de adaptarlas al medio de selección; luego se puso a incubación. La incubación se realizó en posición invertida a 28 °C promedio por 48 h para el caso de levaduras y 72 h para mohos (JAWETZ *et al.*, 1983). Para conservar los microorganismos, las

cepas se colocaron en solución de glicerol a 50 % (v/v) y a temperatura de congelación – 4°C (CRUEGER, 1993 y CARDENAS, 1999).

Cuadro 6. Composición de medios sólidos para aislar microorganismos

Medio	Composición (% v/p)	Utilizado para aislar
YED	Glucosa, 2%; Extracto de carne, 1%; Agar, 1.5%	Levaduras
RB	Agar Rosa de Bengala, 3%	Hongos
BYPO	Peptona, 1%; Extracto de carne, 0.8%; NaCl, 0.5 %; K ₂ HPO ₄ , 0.7%; Agar, 1.5 %	Colonias puras

Fuente: HOLMES Y CUNDLIFFE, (1991) y FRENKEN *et al.*, (1992)

3.3.3. Selección de microorganismos productores de lipasas

Los microorganismos aislados fueron sembrados en medios con emulsiones de aceite para seleccionar microorganismos productores de lipasas, e incubados por 48 h y 72 h para levaduras y mohos, respectivamente. Los pasos para la selección fueron:

- Primera selección: Los microorganismos aislados fueron sembrados en placas petri con medio BYPO con agar y emulsiones de aceite crudo de palma 2% (CRUEGER, 1993), e incubados a temperatura 28 °C.
- Segunda selección: Los microorganismos seleccionados en la fase anterior fueron sembrados en matraces de 50 mL con 30 mL de medio

BYPO líquido y emulsiones de aceite crudo de palma 2% (SZTAJER *et al.*, 1988), y puestos en agitación orbital a 150 rpm a temperatura de 30 °C; para determinar la facilidad de crecimiento de microorganismos sin adherencia de agar.

- Tercera selección: Cada microorganismos seleccionado en la fase anterior, se sembró utilizando el 10% del medio en el cual creció, en 30 mL de medio mínimo que contenía 2% de aceite crudo de palma, como única fuente de carbono; empleándose matraces de 50 mL (SÁNCHEZ *et al.*, 1999); luego se puso en agitación orbital a 150 rpm a temperatura de 30 °C; para determinar microorganismos que produzcan lipasas. Los medios sólidos y líquidos que se emplearon en la selección se detallan en el Cuadro 7.

Cuadro 7. Medios para seleccionar microorganismos productores de lipasas usando el aceite crudo de palma como inductor de crecimiento.

Medio	Componente (para 1000 mL)
Sólido:	
BYPO	Peptona, 1%; Extracto de carne, 0.8 %; NaCl, 0.5 %; K ₂ HPO ₄ , 0.7 %; Agar, 1.5 %; Aceite, 2%
Líquido:	
- BYPO	Idem. BYPO sólido con inductor (aceite) excepto agar.
- Mínimo	NH ₄ Cl 0.1%; KH ₂ PO ₄ 0.1%; K ₂ HPO ₄ 0.2 %; KCl, 0.01%; Mg SO ₄ 7H ₂ O, 0.05%; CaCl ₂ , 0.001%; FeSO ₄ 7 H ₂ O, 0.0012%; Extracto de levadura 0.1%; Inductor y fuente de carbono, Aceite de palma, 2%

Fuente: FRENKEN *et al.*, (1992) y CARDENAS (1999).

3.3.4. Biomasa microbiana

Levaduras

Los microorganismos seleccionados fueron identificados inicialmente como L2, L3, L4(a), L4(b), L6, L7, L8, L9, L10, L11 y L12 y fueron sembrados en matraces de 250 mL con 50 mL de medio mínimo estéril descrito en el Cuadro 7 a pH 7 y con 2% de aceite crudo de palma (inductor y fuente de carbono), seguidamente fueron colocados en agitación por 48 horas.

Las mediciones de la densidad óptica a 660 nm se realizaron cada dos a tres horas en espectrofotómetro UV –VIS modelo Génesis 8, se realizaron diluciones de caldo de cultivo en agua esteril para que las lecturas de absorbancia no pasen de 0.600 según la metodología propuesto por SCRIBAN (1985), TORTORA (1993) y ARIAS y LASTRA (1997).

Previamente se realizó una curva de calibración de absorbancia a 660nm, empleándose diluciones de distintas concentraciones; determinada a partir de la medición en un cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* cuantificando el número de células utilizando la cámara de Neubauer. Esta curva nos permitió determinar los millones de células/mL de los medios de cultivos realizados, utilizando la siguiente relación:

$$\text{Millones de células/mL} = [(\text{absorbancia} + 0.0023)/0.011] \times \text{dilución}$$

Mohos

La cuantificación de mohos en medio mínimo con aceite crudo de palma no se pudo realizar, por método gravimétrico descrito por COCA *et al.* (2001), TORTORA (1993) y SCRIBAN (1985), ya que los micelios de los mohos

se adherían a las gotas de grasa. Por ello su calcinación hasta peso seco no hubiera aportado ningún dato fiable porque también se quemaría el aceite de palma.

3.3.5. Identificación de microorganismos

Los microorganismos productores de lipasas se identificaron en la Universidad de Valencia (Servicios de la Colección Española de Cultivos Tipo).

La identificación de las levaduras se llevó a cabo mediante el sistema de API, siendo el ensayo de escualeno claro para diferenciar el tipo de microorganismos. Por lo que se refiere a los mohos, estos fueron identificados en los laboratorios Glaxo-SmithKline.

3.4. Etapa 2: Evaluación de la actividad y productividad lipolítica de microorganismos

En esta etapa se evaluó la actividad y productividad lipolítica de los hongos seleccionados en la etapa anterior (levaduras L4(a), L4(b), L6, L7, L9, L10 y L11 y mohos M1 y M2) y consistió en determinar el tiempo medio de cultivo en el cual el microorganismo expresa su mayor actividad enzimática; la productividad de lipasa extracelular y unida a membrana, y la productividad lipolítica a diferentes concentraciones de substrato.

El proceso de producción consistió en cultivar a todos los hongos en medios conteniendo aceite crudo de palma como sustrato, este proceso inicialmente estuvo previsto realizarlo en biorreactores tipo Air Lift, sin embargo en pruebas preliminares el crecimiento de la levadura fue lento debido a que no hubo la adecuada suspensión del microorganismo, así como de la dispersión del aceite crudo de palma en el medio.

Por este motivo se ensayó y determinó que el uso de matraces con agitación siguiendo las recomendaciones de TORRENEGRA (2003), de utilizar matraces guardando la proporción de 1/5 de la capacidad respecto al volumen de trabajo, dió mejor resultado; por ello se optó en realizar de esta forma el proceso de fermentación.

Para cumplir las evaluaciones previstas se realizaron tres ensayos:

3.4.1. Ensayo 1. Tiempo medio de cultivo

El objetivo de este ensayo fue determinar para cada microorganismo el tiempo medio de cultivo con aceite crudo de palma en el cual se tiene la mayor actividad lipolítica; utilizando para la enzima como sustrato oleina de palma.

Preparación del sustrato. Se preparó medio mínimo, tal como esta descrito en el Cuadro 7, se ajustó a pH 7; luego se colocó 50 mL de medio en matraces de 250 mL y se procedió a esterilizar, posteriormente el aceite

crudo de palma estéril fue adicionado en un 2% del volumen del medio al momento de la inoculación.

Inoculación. Para cada microorganismo se utilizó un inóculo de 10% del volumen del medio.

Fermentación. Se sembraron los microorganismos (L4(a), L4(b), L6, L7, L9, L10 y L11 y mohos M1 y M2) en matraces con medio mínimo y se mantuvo el proceso a 30 °C y en agitación a 150 rpm durante 48 y 72 horas para levaduras y mohos, respectivamente. La levadura L6 se eliminó porque no creció.

Evaluaciones. La toma de muestra se realizó cada 2 a 3 horas teniendo en consideración el crecimiento de cada hongo y este periodo varió de 0 a 43 horas. Se realizaron las siguientes evaluaciones:

- La determinación de biomasa de levaduras, se realizó por medición óptica a 660nm (turbimetría); según la metodología descrita en el ítem 3.3.4. para levaduras (SCRIBAN, 1985 y TORTORA, 1993).

- Se determinó la Actividad lipolítica, según el método descrito por CARDENAS *et al.* (2001), TIETZ Y FIERECK (1966); que consistió en sacar 1 mL de caldo de cultivo y colocarlo en tubos estériles de 20 mL, se adiciona una gota de alcohol y 1 mL de goma arabiga al 10%; se ajustó el pH a 7 con tampón fosfato 0.1 M; seguidamente se añadió 1.2 mL de agua esteril y 1 mL del substrato oleina de palma emulsionado con goma arabiga al 10% (proporción 1:1). La solución obtenida se puso en agitación durante una hora; luego se adicionó alcohol 4.5 mL y tres gotas de fenolftaleína, para medir la valoración de ácidos grasos liberados, titulando con NaOH 0.05M. La actividad

de la enzima lipasa se midió en unidades de actividad (UA). Una UA es considerada como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μMol de ácido graso, bajo las condiciones de la prueba.

$$\mu\text{Moles de ácido liberado} = \text{gasto NaOH (mL)} \times 0.05 \text{ (mol/ Lt)}$$

$$\text{UA} = 1 \mu\text{Moles de ácido liberado}$$

$$\text{UA/mL h} = \mu\text{Moles de ácido liberado/mL h}$$

3.4.2. Ensayo 2. Actividad y productividad lipolítica extracelular y unida a membrana

El objetivo de este ensayo fue determinar la actividad y productividad lipolítica unida a membrana y extracelular (lipasa secretada por los microorganismos) en función de la actividad de la enzima lipasa sometida a diferentes sustratos.

El acondicionamiento del sustrato, inóculo y fermentación se realizó según se describe en el ítem 3.4.1. El proceso fue interrumpido de acuerdo al tiempo medio determinado en el Ensayo 1 para cada microorganismo y que se muestra en el Cuadro 8; luego se centrifugó el caldo de cultivo a 3000 rpm por 15 min descrito por VILCHEZ (2002). La parte sólida fue diluida en 3 mL de agua esteril para realizar las evaluaciones relacionado a biomasa y actividad lipolítica; mientras que de la parte líquida sólo se evaluó la actividad lipolítica; en ambos casos siguiendo el procedimiento descrito en el ítem 3.4.1. La adición de sustratos al medio de reacción para determinar la actividad lipolítica se realizó luego de hacer emulsionar a estos sustratos con

goma arábica o con 2 – propanol; los substratos sólidos (estearina, aceite crudo de palmiste, refinado blanqueado deodorizado y aceite crudo de palma) fueron emulsionados con 2 – propanol en proporción 1:3 (w/w), mientras que los substratos líquidos (super oleína y oleína de palma) fueron emulsionados con goma arábica 10% en proporción 1:1(w/w).

3.4.2.1. Variables Independientes

- Tipos de substratos para la actividad de la enzima lipasa.
- Especie de microorganismo.

3.4.2.2. Tratamiento en estudio

Los tratamientos fueron resultado de la combinación de los factores tipos de substrato [Estearina (E), Aceite crudo de palmiste (P), Refinado Blanqueado Deodorizado (RBD), Aceite crudo de palma (ACP), Super Oleína (SO) y Oleína (O)] y especies de microorganismos [L4(a), L4(b), L7, L9, L10 y L11].

3.4.2.3. Variables dependientes

Se evaluó para cada levadura:

- La actividad y productividad lipolítica unida a membrana.
- La actividad y productividad lipolítica extracelular.

Los procedimientos para determinar la actividad lipolítica han sido descritos en el ítem evaluaciones del acápite 3.4.1.

Las fórmulas utilizadas para determinar la productividad lipolítica unidad de membrana (PLU) y extracelular (PLE), según GODIA (1998), fueron:

$$PLU = UA / (Biomasa \times Volumen \times Tiempo)$$

$$PLU = \mu\text{mol ácido liberado}/(10^6 \text{ cel mL h})$$

$$PLE = UA / (Volumen \times Tiempo)$$

$$PLE = \mu\text{mol ácido liberado/mL h}$$

3.4.2.4. Análisis estadístico

Para cada levadura los resultados de actividad y productividad lipolítica extracelular y unida a membrana fueron evaluados estadísticamente mediante un diseño completo al azar con arreglo factorial 6 x 6 [Especie (L4(a), L4(b), L7, L9, L10 y L11) y substrato (estearina (E), aceite crudo de palmiste (P), refinado blanqueado deodorizado (RBD), aceite crudo de palma (ACP), super oleina (SO) y oleina (O)], con tres repeticiones. Los resultados fueron analizados a través de un ANVA para determinar si existe interacción de los factores (VÁSQUEZ, 1990; LITTLE, 1991).

El modelo lineal aditivo utilizado fue:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + (AB)_{ij} + E_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk} = Productividad lipolítica extracelular ó intracelular.

μ = Constante

A_i = Efecto de la i -ésima levadura ($i = 1, 2, 3, 4, 5$ y 6)

B_j = Efecto del j -ésimo sustrato ($j = 1, 2, 3, 4, 5$ y 6)

$(AB)_{ij}$ = Efecto de la interacción Levadura Vs Sustrato.

E_{ijk} = Error experimental.

3.4.3. Ensayo 3. Productividad a diferentes concentraciones de sustrato

El objetivo de este ensayo fue determinar la productividad lipolítica de microorganismos a diferentes concentraciones de sustrato en el medio de reacción de la enzima lipasa.

Para la fermentación se acondicionó el sustrato según lo descrito en el ítem 3.4.1., colocando 100 mL de medio en matraces de 500 mL; el inóculo, la fermentación y la evaluación de biomasa se realizó como esta descrito en el ítem 3.4.1.; evaluándose además el pH, para el cual se siguió el método 11.032 de la AOAC (1995).

El proceso de determinación de la actividad lipolítica se realizó según lo descrito en el ítem 3.4.1. adicionando concentraciones de sustrato en función al volumen del inóculo utilizado en el medio de reacción; el cual consistió en utilizar 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 y 5.0 veces el volumen del inóculo.

3.4.3.1. Variables independientes

- Concentraciones de substratos.

3.4.3.2. Tratamiento en estudio

Los tratamientos en estudio serán las concentraciones de cada uno de los substratos, expresados como el número de veces del volumen del primer inóculo que se toma para medir la actividad lipolítica.

$$V_1 = 1 : 1 \text{ mL}$$

$$V_2 = 2 : 2 \text{ mL}$$

$$V_3 = 3 : 3 \text{ mL}$$

$$V_4 = 4 : 4 \text{ mL}$$

$$V_5 = 5 : 5 \text{ mL}$$

3.4.3.3. Variables dependientes

Se evaluó para cada hongo la actividad y productividad lipolítica a diferentes concentraciones de substrato.

La productividad de lipolítica de los mohos se determinó como:

$$\text{Productividad lipolítica} = \text{UA} / (\text{Volumen} \times \text{Tiempo})$$

$$\text{Productividad Lipolítica} = \mu\text{mol ácido liberado/mL h}$$

La productividad de lipolítica de las levaduras se determinó como:

$$\text{Productividad lipolítica} = \text{UA} / (\text{Biomasa} \times \text{Volumen} \times \text{Tiempo})$$

$$\text{Productividad lipolítica} = \text{mmol ácido liberado} / (10^6 \text{ cel/mL mL h})$$

3.4.3.4. Análisis estadístico

Para cada microorganismo y cada sustrato de la actividad y productividad lipolítica fueron analizados mediante un diseño completo al azar con cinco tratamientos y tres repeticiones. Los resultados de actividad y productividad serán analizados a través del análisis de variación de regresión, utilizando el programa ESTAT, para determinar la concentración óptima.

El modelo lineal aditivo utilizado fue:

$$Y_{ij} = \mu + A_i + E_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} = Productividad lipolítica a diferentes concentraciones de sustratos.

μ = Constante

A_i = Efecto de la i -ésima concentración ($i = 1, 2, 3, 4, \text{ y } 5$)

E_{ij} = Error experimental.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. Etapa 1: Identificación de microorganismos productores de lipasa

4.1.1. Aislamiento de microorganismo

En el Cuadro 8 se presenta la nomenclatura de las muestras, obtenidas en Industrias del Espino S.A., la cantidad de microorganismos aislados por muestra y por los medios YED, Rosa de Bengala y BYPO sólido sin aceite; aislándose 16 levaduras y 3 mohos.

Para el aislamiento se tuvieron en cuenta las características macroscópicas de las colonias de cada cepa tal como lo refiere TORRENEGRA (2003) considerando el tamaño, color y apariencia.

Se registró mayor presencia de microorganismos en las muestras de tierras, desechos sólidos y sólidos tricanters y menor en muestras de fruto y desecho líquido. Las muestras de sólidos tricanters y desecho líquidos como fueron extraídas aproximadamente a temperatura de 40 °C a 50 °C, al sembrarlas en los medios no tuvieron mayor presencia de microorganismos por ello se dejaron expuestas 24 h a temperatura ambiente para volver a sembrarlas; con la finalidad de aislar microorganismos lipolíticos del ambiente, que crezcan en dichas muestras.

Cuadro 8. Microorganismos aislados por medios de cultivo y muestras.

Muestras	Nomenclatura	Moho	Levadura	Total de cepas
Muestras:				
- Desecho Líquido	DL	0	3	3
- Fruto	F	1	0	1
- Tierra Mt E7 B	T	0	4	4
- Sólidos de Tricantes	ST	1	6	7
- Desecho Sólido	DS	1	3	4
Medios				
- YED		1	12	13
- RB		3	12	15
- BYPO		3	16	19
Total		3	16	19

De estos resultados deducimos que mientras el fruto de la palmera carece en su superficie de microorganismos productores de lipasas, posiblemente por el recubrimiento celulósico presente en la cáscara del fruto tal como lo refiere SZTEM y PRAVIA (1999), en la industria aceitera la cáscara, fibra, en general son residuos que contienen de 15 a 30 % de celulosa y bajo contenido de agua; las muestras de tierra en contacto con la palmeras si presentan variedades de microorganismos productores de lipasas.

La presencia de microorganismos en sólidos de tricantes y desechos líquidos se debe a que los microorganismos del ambiente provenientes de los suelos se adhirieron a estas muestras. MATEOS (2003) y JAY (1981) reportaron que los microorganismos del suelo por acción del aire y

del agua contaminan el medio ambiente (la atmósfera, agua, árboles ó plantas) y que el suelo es el mayor almacén de microorganismos donde se pueden encontrar diferentes tipos y en una concentración de 100 millones/g de suelo.

El mayor número de microorganismos en sólidos macerados con agua caliente, tierra y desechos sólidos se debe a que las muestras contienen nutrientes, como triglicéridos residuales, que les permiten crecer. MATEOS (2003) reportó que las células utilizan elementos químicos (nutrientes) que provienen del medio ambiente para transformarlos mediante el proceso anabolismo o biosíntesis en los constituyentes característicos que componen dicha célula; permitiéndoles crecer y dividirse.

4.1.2. Selección de microorganismos productores de lipasas

La primera selección de microorganismos nos permitió obtener 15 microorganismos (13 levaduras y 2 mohos) que produjeron de manera cualitativa lipasas, observándose la aparición de halos claros alrededor de las colonias en crecimiento, resultados similares a los reportados por ERTOLA *et al.* (1994) evidencian la actividad de microorganismos. Este proceso se debe a la hidrólisis del aceite emulsionado y la asimilación de sus componentes para la producción de biomasa. Estos resultados nos sugirieron que los microorganismos son potencialmente activos productores de lipasas.

En el segundo proceso, crecieron los 15 microorganismos antes mencionados. Este ensayo nos confirma que son microorganismos productores de lipasas y que pueden crecer sin adherencia de agar.

En el tercer proceso de selección sólo crecieron 13 microorganismos. Estos serían los que excretarían una gran cantidad de lipasa al medio permitiendo la hidrólisis y asimilación por parte de la célula los componentes de los triglicéridos del aceite de palma: glicerol y ácidos grasos tal como fue reportado por DOMÍNGUEZ *et al.*, (2002); OBRADORS *et al.*, (1993) y SÁNCHEZ *et al.*, (1999).

En el Cuadro 9 se presenta los microorganismos seleccionados por los medios selectivos. El crecimiento de levaduras en medio líquido con aceite crudo de palma se manifestó por aparición de una turbidez homogénea; similar a lo descrito por SCRIBAN (1985); además, se observó el crecimiento de los mohos en el medio líquido con aceite crudo de palma en forma de esferas dispersas en el medio tal como lo refiere GÒDIA (1998) y JONES (1994).

Cuadro 9. Microorganismos seleccionados por medios selectivos

Selección	Medios	Número de cepas	Levaduras	Mohos
Primera	BYPO sólido con aceite	15	13	02
Segunda	BYPO líquido con aceite	15	13	02
Tercera	MINIMO	13	11	02

El crecimiento de los microorganismos, expresado en turbidez o presencia de esferas dispersas, varió con el medio de cultivo; se observó mayor crecimiento en medio BYPO que en medio Mínimo debido a que el medio BYPO proporcionó a las cepas mayor cantidad de nutrientes. BECKER

(1999) y DOMINGUEZ *et al.* (2005) coincidieron en que, el crecimiento en un medio mínimo comparado con el conseguido en un medio rico muestra un alargamiento del periodo de duplicación; esto se debe al tiempo y la energía que el microorganismo debe emplear en este medio para sintetizar los metabolitos que serían proporcionados directamente por un medio rico o completo. Asimismo para expresar las lipasas extracelulares y/o de membrana e hidrolizar los triglicéridos del medio.

4.1.3. Biomasa microbiana

El siguiente paso fue estudiar las cinéticas de crecimiento de los microorganismos seleccionados a fin de identificar aquellos que crecieran a mayor velocidad, en condiciones repetitivas y que alcanzaran valores mayores de producción de biomasa. Este criterio se eligió dado que en general, la máxima producción de lipasa viene asociada a la fase estacionaria del cultivo.

Levaduras

Se determinó el crecimiento de biomasa de 11 levaduras (L2, L3, L4(a), L4(b), L7, L8, L9, L10, L11 y L12) las mismas que fueron seleccionadas como productoras de lipasa en medio mínimo.

Para cada levadura, la evaluación de la concentración de células en diferentes periodos pos inoculación nos permitió evaluar el tiempo en que cada una alcanzó la máxima biomasa. En el Cuadro 10, se presenta los valores de crecimiento celular para las levaduras.

Cuadro 10. Biomasa microbiana de las distintas levaduras, cultivadas en medio mínimo, evaluado en el tiempo de máxima concentración.

Identificación del Microorganismo	Tiempo en alcanzar máxima concentración de células (h)	Concentración de células (cel/mL) ¹		Condición
		Total	/h	
L2	15	186	12.4	No Seleccionado
L3	44	953	21.7	No Seleccionado
L4(a)	32	1187	37.1	Seleccionado
L4(b)	34	996	29.3	Seleccionado
L6	33	1498	45.4	Seleccionado
L7	25	2.609	104.4	Seleccionado
L8	38	1179	31.0	No Seleccionado
L9	20	1051	52.6	Seleccionado
L10	23	1433	62.3	Seleccionado
L11	15	1384	92.3	Seleccionado
L12	21	854	40.7	No Seleccionado

1. Millones de células/mL = [(absorbancia + 0.0023)/0.011] x dilución

Las levaduras que se seleccionaron en base a los criterios, como facilidad de cultivo, mayor producción de células en menor tiempo de fermentación y de fácil conservación por largos períodos de tiempo sugeridos por GODIA et al. (1998), fueron L4(a), L4(b), L7, L9, L10, L11 y L12. y no se seleccionaron la levadura L2 por su baja producción de biomasa, L12 por presentar frecuente contaminación, L3 por crecimiento lento e inconsistente

producción de biomasa y L8 por crecimiento inicial lento en la producción de biomasa.

4.1.4. Identificación de microorganismos seleccionados

En el Cuadro 11 se presenta la identificación de los microorganismos; el nombre científico comprende el género, especie, lugar donde se desarrollo la investigación (TM = Tingo María), microorganismo aislado (Y = levadura y F = hongo esporulado) y numeración asignada.

La separación realizada previamente de las cepas hasta nivel de pureza al microscopio óptico realizada por el Grupo de Biotransformaciones de la Universidad Complutense indico que los cultivos que creíamos puros L4(b), L7 y L10 eran mezclas de varias cepas muy similares pero diferenciables a nivel del ensayo de escualeno. Se identificaron tres especies nuevas productores de lipasas que hasta el momento no habían sido estudiadas, designándoles nombres como *Cryptococcus uchicensis* TMY9, *Pichia uchicensis*. TMY10 y *Verticillium tingalences* TMF1; aún no se ha podido determinar su especie de la levadura *Candida* sp. TMY4a y moho *Aspergillus* sp. TMF2.

Cuadro 11. Identificación de levaduras y mohos productores de enzimas lipasas

Muestra	Nombre Científico	Características	Reacción frente a escualeno
Levaduras			
L4(a)	<i>Candida sp.</i> TMY4a	Cultivo blanquecino lechoso	Azulado
L4(b)	<i>Candida albicans</i> TMY4b	Cultivo blanquecino	Verde azulado
	<i>Candida tropicalis</i> TMY4b	Cultivo blanquecino	Azul –verdoso
	<i>Candida ciferrii</i> TMY4b	Cultivo lechoso amarillento	Negro
L7	<i>Candida boidinii</i> TMY7	Cultivo amarillento	Azul
	<i>Candida albicans</i> TMY7	Cultivo amarillento	Azul
L9	<i>Cryptococcus uchicensis</i> TMY9 ¹	Cultivo amarillo canario	Negro
L10	<i>Candida lypolítica</i> TMY10	Cultivo amarillento	Amarillo verdoso
	<i>Pichia uchicensis.</i> TMY10 ¹	Cultivo amarillento	Negro
L11	<i>Candida albicans</i> TMY11	Cultivo amarillento Lechoso	Negro
Mohos			
Mb	<i>Verticillium tingalences</i> ¹ TMF1	Moho blanco	
Mv	<i>Aspergillus sp.</i> TMF2	Moho verde	

¹ Especies nuevas reportados

4.2. Etapa 2: Evaluación de la productividad lipolítica de microorganismos

4.2.1. Ensayo 1: Tiempo medio de cultivo

En el Cuadro 12 se presenta el tiempo medio de cultivo de cada especie de microorganismos, en los cuales se ha determinado la producción de biomasa de las levaduras y la actividad de la enzima lipasa de levaduras y mohos.

Las curvas de crecimiento y la actividad lipolítica de cada microorganismo en los periodos evaluados se muestran en el Anexo, en los Cuadros del 16 al 23 y Figuras del 7 al 17.

Cuadro 12. Tiempo medio de cultivo de producción de biomasa de levaduras y actividad lipolítica de levaduras y mohos

Microorganismo	Tiempo (horas)	Biomasa (10 ⁶ cel/mL)	Actividad Lipolítica (UA/mL h) ¹
Levaduras	L4(a)	20.00	794.18
	L4(b)	10.00	276.68
	L7	10.00	360.01
	L9	12.00	732.05
	L10	12.00	241.84
	L11	10.00	192.71
Mohos	MB	37.00	150.00
	MV	34.00	115.00

¹ UA = Cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μ Mol de ácido graso, bajo las condiciones de la prueba

El tiempo de mayor actividad lipolítica se determinó en fase logarítmica, con la finalidad de evitar la presencia de productos tóxicos ó equilibrio iónico desfavorable que inhiban la actividad de lipasas tal como lo refiere JAWETZ (1983) y GODIA (1998); teniendo en cuenta lo sustentado por CARBALLEIRA (1999), que el tiempo de máxima actividad enzimática se produce en el momento que el metabolismo del hongo es orientado en mayor magnitud hacia la producción enzimática; por ello se descartaron los tiempos cuyos resultados de biomasa y actividad enzimática presentaban variaciones fluctuantes durante la fermentación. Bajo estas condiciones se ha encontrado por ejemplo que la levadura *Cryptococcus uchiensis* TMY9 a tiempo medio muestra una actividad cuatro veces superior que las demás levaduras en tiempos medios similares.

4.2.2. Ensayo 2. Actividad y productividad lipolítica extracelular y unida a membrana

Actividad de la lipasa

La evaluación de este ensayo se realizó en los tiempos medios de cultivo obtenidos y mostrados en el Cuadro 12. Se encontró interacción significativa entre la actividad de la enzima lipasa de especies de levaduras y el tipo de sustratos; los resultados con el desdoblamiento de la interacción se muestra en el Cuadro 13 para actividad lipolítica extracelular y Cuadro 14 para actividad lipolítica unida a membrana.

De la interacción de los tratamientos, al determinar la actividad lipolítica extracelular (Cuadro 13), observamos que la levadura L11 - *Candida*

albicans TMY11 presentó mayor actividad lipolítica extracelular en los diferentes tipos de substratos; la levadura L4(a) - *Candida sp.* TMY4a presentó mayor actividad frente a la super oleina y oleina de palma y fue menos activa en aceite crudo de palma; la levadura L9 - *Cryptococcus uchicensis* TMY9 presentó mayor actividad lipolítica frente al palmiste; las levaduras L10 - *Candida lypolítica* TMY10 y *Pichia uchicensis* TMY10 fueron activas frente al substrato estearina de palma.

Al determinar la actividad lipolítica unida a membrana (Cuadro 14) observamos que la levadura L9 - *Cryptococcus uchicensis* TMY9 presentó mayor actividad lipolítica unida a membrana en los diferentes substratos, siendo más activa con oleina de palma; mientras que las levaduras L4(b)- *Candida albicans* TMY4b, *Candida tropicalis* TMY4b y *Candida ciferrii* TMY4b: presentaron mayor actividad teniendo a super oleina, oleina de palma y aceite crudo de palma como substratos; las levaduras L10 - *Candida lypolítica* TMY10 y *Pichia uchicensis* TMY10 mostraron mayor actividad con oleina de palma como substrato.

Cuadro 13. Desdoblamiento de la interacción de la especie de levadura por el tipo de sustrato sobre la actividad lipolítica extracelular (UA)¹

Levadura ²	Sustrato ³					
	E	P	RBD	ACP	SO	O
L4(a)	153.3 abBC	163.3 abB	152.5 abB	149.2 bB	167.5 abAB	168.3 aAB
L4(b)	129.2 aD	134.2 aD	130.0 Ac	126.7aC	129.2 aD	130.8 aD
L7	136.7 Acd	144.2 aCD	147.5 aBC	142.5 aBC	144.2 aCD	147.5 aCD
L9	158.3 bcAB	188.3 aA	158.3 bcB	153.3 bcB	166.7 bAB	143.3 cCD
L10	158.3 Aab	161.7 aBC	158.3 aB	152.5 aB	149.2 aBC	153.3 aBC
L11	175.8 Aa	192.5 aA	178.3 aA	174.2 aA	179.2 aA	177.5 aA

- Promedios seguidos con letras minúsculas (mayúsculas) diferentes en cada fila (columna) difieren estadísticamente entre si (P<0.05) por la prueba Tukey.

¹ UA = Cantidad de enzima capaz de liberar un μ Mol de ácido graso.

² Especie de levadura: L4(a): *Candida sp.* TMY4a; L4(b): *Candida albicans* TMY4b, *Candida tropicalis* TMY4b, *Candida ciferrii* TMY4b; L9: *Cryptococcus uchiensis* TMY9; L10: *Candida lypolítica* TMY10, *Pichia uchiensis*. TMY10; L11: *Candida albicans* TMY11

³ Tipo de sustrato: E: estearina; P: aceite crudo de palmiste; RBD: refinado, blanqueado y deodorizado; ACP: aceite crudo de palma; SO = super oleina de palma y O: oleina de palma.

Cuadro 14. Desdoblamiento de la interacción de la especie de levadura por el tipo de sustrato sobre la actividad lipolítica unida a membrana (UA)¹

Levadura ²	Sustrato ³					
	E	P	RBD	ACP	SO	O
L4(a)	55.0 bcA	70.0 aB	51.7 cBC	59.2 bcAB	58.3 bcBC	60.8 bBC
L4(b)	59.2 bcA	71.7 aB	55.0 cB	65.8 abA	71.7 aA	73.3 aA
L7	45.8 bB	60.8 aC	48.3 bBC	50.8 bC	60.0 aBC	60.0 aC
L9	60.0 cA	88.3 aA	64.2 cA	65.8 cA	65.8 cAB	75.0 bA
L10	46.7 cB	60.8 abC	50.8 cBC	54.2 bcBC	60.8 abBC	68.3 aAB
L11	46.7 cB	65.8 aBC	45.0 cC	50.8 bcC	55.0 bC	57.5 bC

• Promedios seguidos con letras minúsculas (mayúsculas) diferentes en cada fila (columna) difieren estadísticamente entre si (P<0.05) por la prueba Tukey.

¹ UA = Cantidad de enzima capaz de liberar un μMol de ácido graso.

² Especie de levadura: L4(a): *Candida sp.* TMY4a; L4(b): *Candida albicans* TMY4b, *Candida tropicalis* TMY4b, *Candida ciferrii* TMY4b; L9: *Cryptococcus uchiensis* TMY9; L10: *Candida lipolítica* TMY10, *Pichia uchiensis*. TMY10; L11: *Candida albicans* TMY11

³ Tipo de sustrato: E: estearina; P: aceite crudo de palmiste; RBD: refinado, blanqueado y deodorizado; ACP: aceite crudo de palma; SO = super oleina de palma y O: oleina de palma.

Productividad de la lipasa.

Al estimar la productividad de la enzima lipasa en función de la actividad enzimática y biomasa; no se encontró interacción significativa entre las especies de levaduras y tipo de sustrato, las comparaciones de los factores principales son mostrados en el Cuadro 15.

Las levaduras L11 - *Candida albicans* TMY11 y L9 - *Cryptococcus uchiensis* TMY9 presentaron mayor productividad extracelular y unida a membrana, respectivamente. Las levaduras frente al sustrato de aceite crudo de palmiste y super oleina de palma presentaron mayor productividad extracelular; y frente al aceite crudo de palmiste, super oleina y oleina de palma presentaron mayor productividad lipolítica unida a membrana.

Cuadro 15. Promedios de productividad lipolítica unida a membrana y extracelular; para cada levadura y para cada sustrato

Especie de levadura	Lipasa		Tipo de Sustrato	Lipasa	
	Extracelular (UA/mL h)	Unida a membrana (UA/10 ⁶ cel mL h) ¹		Extracelular (UA/mL h)	Unida a membrana (UA/10 ⁶ cel mL h)
L4(a)	1.57 d	7.85 e	E	2.57 b	37.40 c
L4(b)	2.52 c	29.68 d	P	2.78 a	51.27 a
L7	2.83 b	23.21 d	RBD	2.62 b	38.58 c
L9	2.72 b	80.76 a	ACP	2.54 b	41.76 bc
L10	2.55 c	66.53 b	SO	2.63 ab	44.72 abc
L11	3.54 a	53.98 c	O	2.59 b	48.27 ab
S.E.M.	0.15			8.03	

• Para cada factor promedios seguidos con letras minúsculas diferentes en cada columna difieren estadísticamente entre si (P<0.05) por la prueba Tukey.

¹. Productividad multiplicado por 10⁻⁰⁴

De los datos se puede deducir que los substratos mas insaturados tales como oleina de palma, super oleica de palma y palmiste son los que inducen a mayor actividad y productividad lipolítica, esto corrobora lo reportado por NURADA (2002) quien indica que la actividad de la lipasa esta asociada a la alta cantidad del acido graso insaturado. Los substratos con mayor cantidad de acidos grasos insaturados, por ser mas homogéneos, son fácilmente emulsionables, favoreciendo así el mecanismo de activación interfacial de las lipasa (SINISTERRA, *et al.* 1998 y DOMINGUEZ, *et al.* 2005); por otro lado RUIZ, *et al.* (2004) encontró que la acción de los ácidos grasos saturados sobre las lipasas microbianas varía en función de la estructura tridimensional de las enzimas. Por ejemplo, los ácidos grasos saturados provocan la inhibición de la lipasa de *Candida rugosa*, mientras que las lipasas de especies relacionadas con *Bacillus* muestran una respuesta variable, en función de su estructura tridimensional.

Las levadura L4(a) y L7 no se consideraron para el siguiente ensayo porque presentaron baja actividad y productividad lipolítica unida a membrana.

4.2.3. Ensayo 3. Productividad lipolítica a diferentes concentraciones de sustrato

Los resultados de actividad y productividad lipolítica a diferentes concentraciones de sustratos para la levaduras L4(b) - *Candida albicans* TMY4b, *Candida tropicalis* TMY4b y *Candida ciferrii* TMY4b; L9 - *Cryptococcus uchiensis* TMY9; L10 - *Candida lipolítica* TMY10 y *Pichia uchiensis* TMY10; y L11 - *Candida albicans* TMY11; y mohos Mb - *Verticillium tingalences* TMF1 y Mv -

Aspergillus sp. TMF2, se presentan en la Figura 1 a la Figura 6, respectivamente; cuyos datos se enuncian en el Anexo (Cuadros 24 al 35).

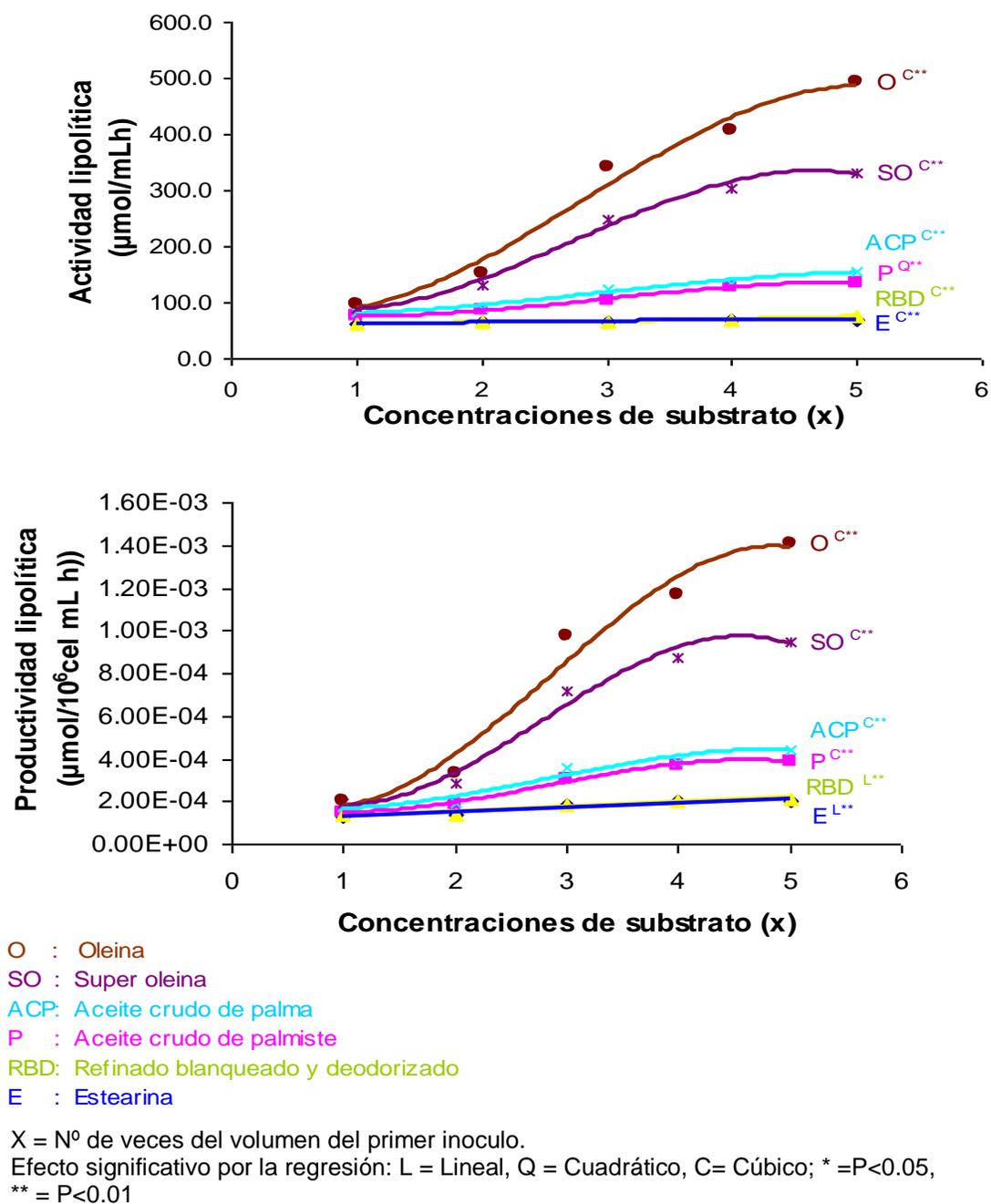
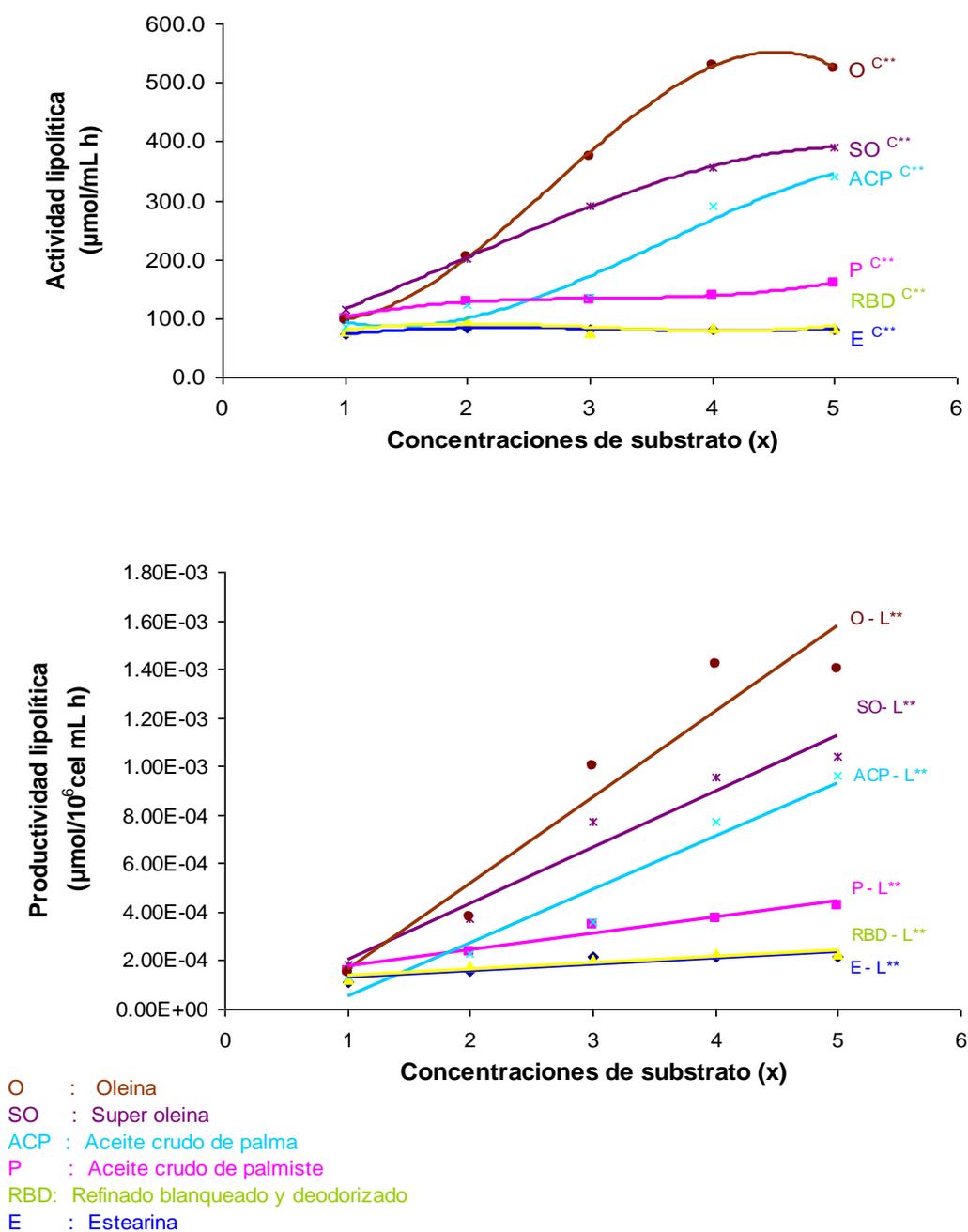


Figura 1. Actividad y productividad lipolítica de la levadura L4(b) - *Candida albicans* TMY4b, *Candida tropicalis* TMY4b, *Candida ceferrii* TMY4b en cada substrato y en función de las concentraciones del substrato.

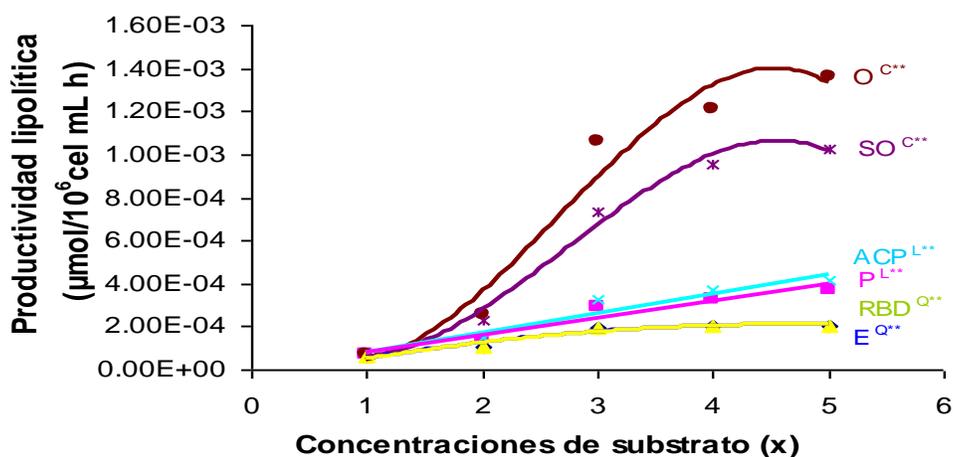
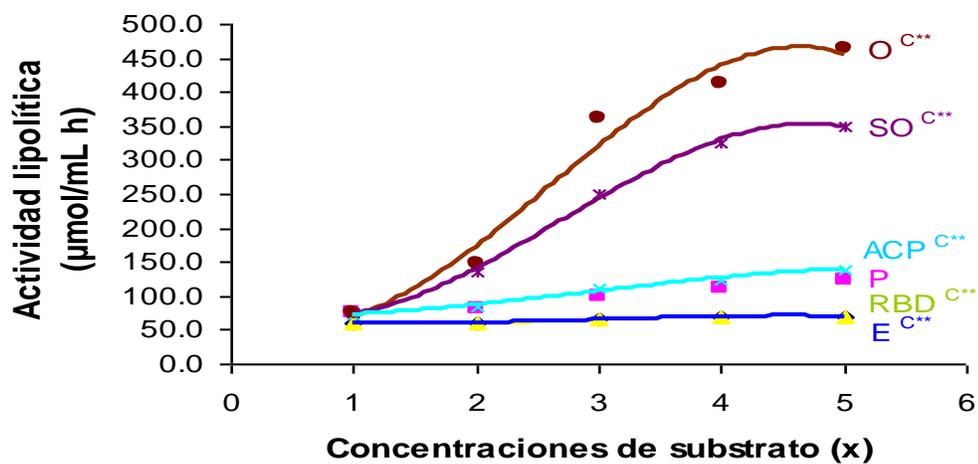


X= N° de veces del volumen del primer inoculo.

Efecto significativo por la regresión: L = Lineal, Q = Cuadrático, C= Cúbico; * =P<0.05,

** = P<0.01

Figura 2. Actividad y productividad lipolítica de la levadura L9 - *Cryptococcus uchiensis* TMY9 en cada sustrato y en función de las concentraciones del sustrato.



- O : Oleina
- SO : Super oleina
- ACP : Aceite crudo de palma
- P : Aceite crudo de palmiste
- RBD : Refinado blanqueado y deodorizado
- E : Estearina

X = N° de veces del volumen del primer inoculo.

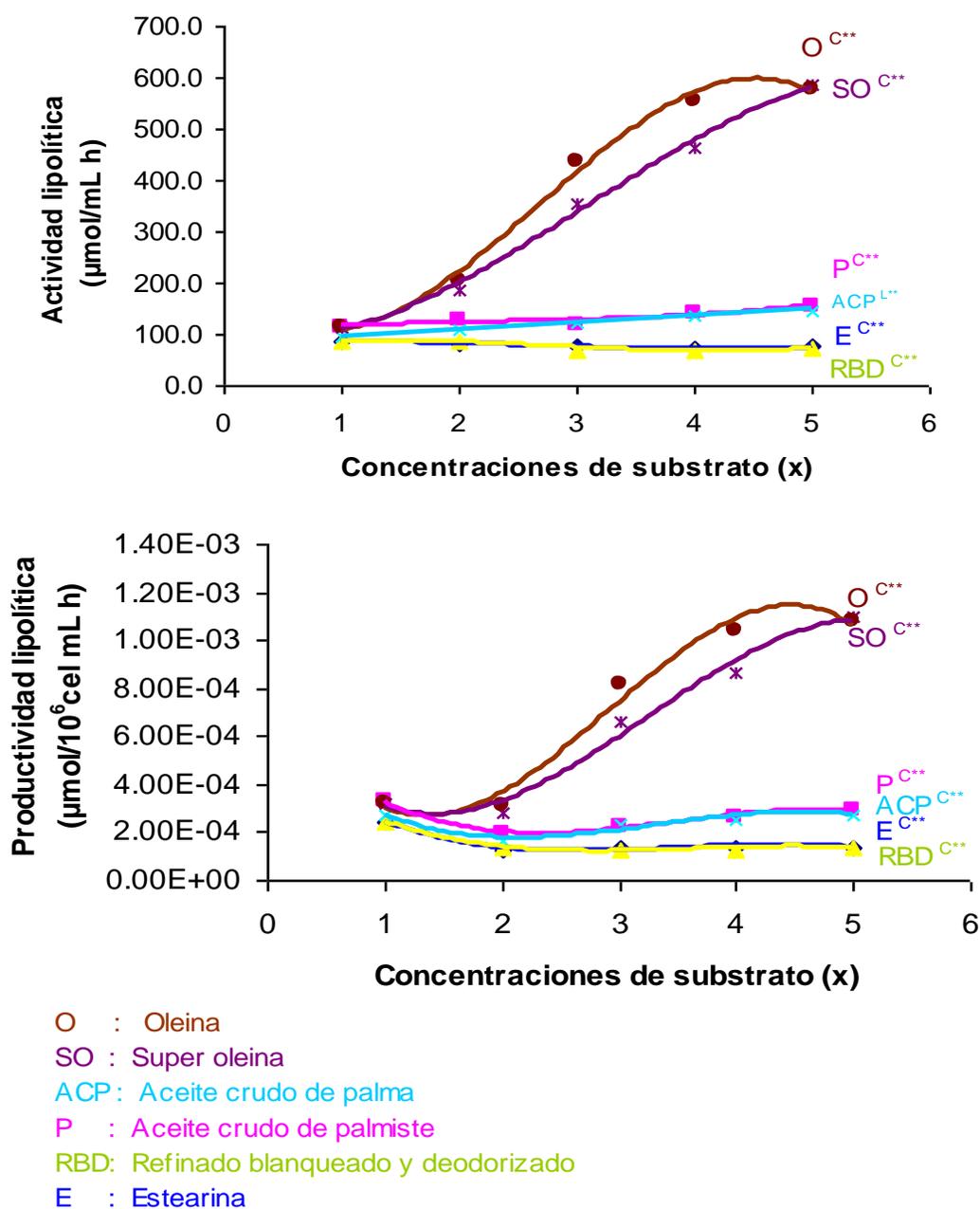
Efecto significativo por la regresión: L = Lineal, Q = Cuadrático, C= Cúbico; * = $P < 0.05$,

** = $P < 0.01$

Figura 3. Actividad y productividad lipolítica de la levadura L10 - *Candida lipolytica*

TMY10 y *Pichia uchiensis* TMY10 en cada sustrato, y en función de

las concentraciones del sustrato.



X = N^o de veces del volumen del primer inoculo.

Efecto significativo por la regresión: L = Lineal, Q = Cuadrático, C= Cúbico; * =P<0.05,

** = P<0.01

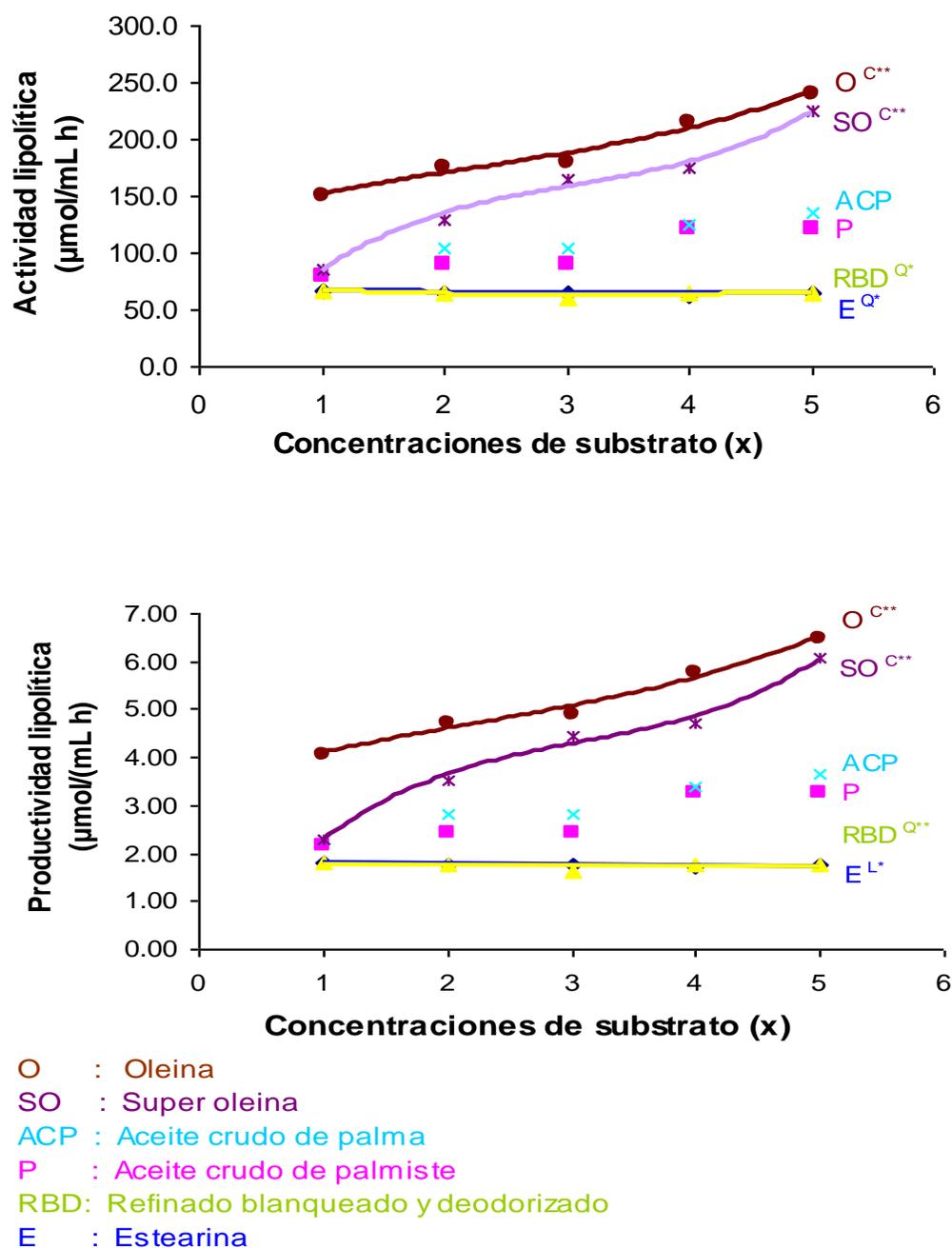
Figura 4. Actividad y productividad lipolítica de la levadura L11 - *Candida albicans*

TM Y11 en cada sustrato, y en función de las concentraciones del sustrato.

En las Figuras 1, 3 y 4 se observa que las levaduras L4(b) - *Candida albicans* TMY4b, *Candida tropicalis* TMY4b y *Candida ciferrii* TMY4b; L10 - *Candida lipolytica* TMY10 y *Pichia uchicensis* TMY10; y L11 - *Candida albicans* TMY11, presentaron mayor actividad y productividad lipolítica frente a los substratos de oleina y super oleina de palma. Conforme aumentó la concentración de substrato aumentó significativamente ($P < 0.01$) la actividad y productividad lipolítica, mostrando un comportamiento cúbico con máxima actividad y productividad entre 4 y 5 veces la concentración inicial debiéndose estas respuestas en un 97 a 99 % de acuerdo al modelo adoptado; las ecuaciones de ajuste se muestran en los cuadros 24, 28 y 30.

En la Figura 2 se muestra que, la levadura L9 - *Cryptococcus uchicensis* TMY9 presentó mayor actividad y productividad lipolítica con oleina y super oleina de palma, mientras que la actividad mostró un efecto cúbico ($P < 0.01$) con máxima expresión entre 4 y 5 veces la concentración, la productividad tuvo un comportamiento lineal ($P < 0.01$) probablemente influenciado por la producción de biomasa durante el periodo de cultivo de la levadura. Las ecuaciones de ajuste se muestra en el Cuadro 26.

Como podemos observar las levaduras *Candida albicans* TMY11 y *Cryptococcus uchicensis* TMY9 presentaron mayor actividad y productividad frente a los diferentes substratos; esto coincide con los resultados del ensayo anterior donde las levaduras *Candida albicans* TMY11 y *Cryptococcus uchicensis* TMY9 presentaron mayor actividad y productividad lipolítica extracelular y unida a membrana, respectivamente.



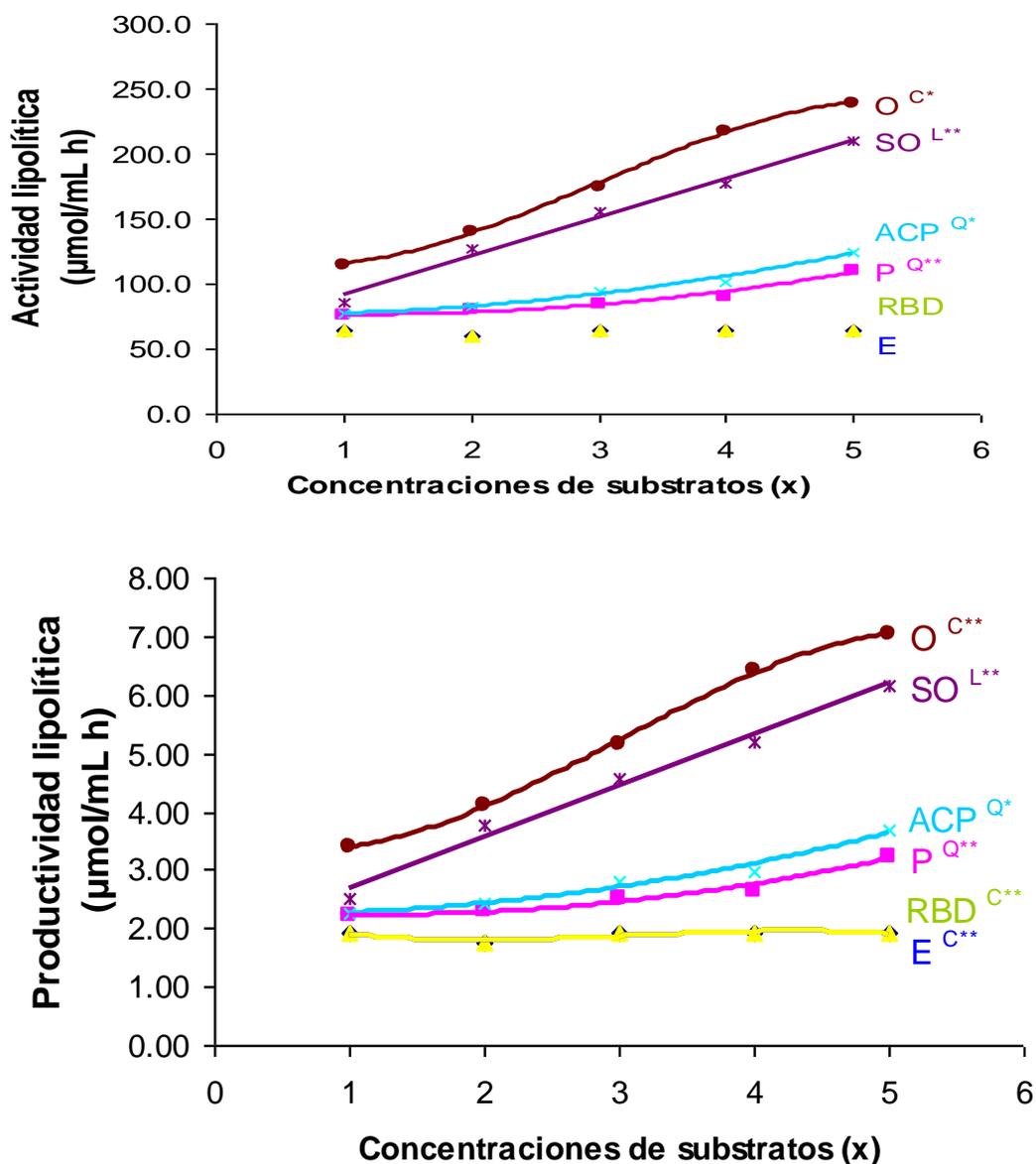
X = N° de veces del volumen del primer inculo.

Efecto significativo por la regresión: L = Lineal, Q = Cuadrático, C= Cúbico; * =P<0.05,

** = P<0.01

Figura 5. Actividad y productividad lipolítica del mohó Mb - *Verticillium tingalences*

TMF1 en cada sustrato, y en función de las concentraciones del sustrato.



- O : Oleina
 SO : Super oleina
 ACP: Aceite crudo de palma
 P : Aceite crudo de palmiste
 RBD: Refinado blanqueado y deodorizado
 E : Estearina

X = N° de veces del volumen del primer inoculo.

Efecto significativo por la regresión: L = Lineal, Q = Cuadrático, C= Cúbico; * =P<0.05, ** = P<0.01

Figura 6. Actividad y productividad lipolítica del moho Mv - *Aspergillus sp.*

TMF2 en en cada sustrato, y en función de las concentraciones del sustrato.

En la Figura 5, el moho *Verticillium tingalences* TMF1 presentó mayor actividad y productividad lipolítica frente a los sustratos de oleína y super oleína de palma, conforme aumentó la concentración de sustrato aumentó significativamente ($P < 0.01$) la actividad y productividad lipolítica, mostrando un comportamiento cúbico con máxima actividad y productividad a 5 veces la concentración inicial. Las ecuaciones de ajuste se muestran en el Cuadro 32.

En la figura 6, el moho *Aspergillus sp.* TMF2 presentó mayor actividad y productividad lipolítica con oleína de palma, mostrando un efecto cúbico ($P < 0.01$) con máxima expresión a 5 veces la concentración inicial. Las concentraciones de ajuste se muestran en el Cuadro 34.

Los mohos tuvieron mayor productividad lipolítica frente a la oleína de palma y super oleína de palma. El *Verticillium tingalences* TMF1 presentó una mayor productividad lipolítica que el *Aspergillus sp.* TMF2, para un mismo sustrato. Es la primera vez que se describe hasta nuestro conocimiento un moho del género *Verticillium* como productor eficaz de lipasas.

De acuerdo a los resultados obtenidos, podemos decir que la actividad y productividad lipolítica no se manifiesta de igual modo para los microorganismos, esto se debe al grado de especificidad de las lipasas frente a los sustratos, la que varía según a las acciones biológicas de cada microorganismo (GÒDIA, 1998 y COCA, 2001); cuyo metabolismo, durante la fermentación, son inducidas por la

aireación y variación de pH (BROCK, et al. 1998, PASTOR, 2001 y VASQUEZ et al. 2002). El pH mostró disminución en los periodos de crecimiento, esto concuerda con lo reportado por NAKANDAKARI (1988) que el microorganismo al asimilar el amonio libera al medio iones de hidrógeno provocando la disminución del pH. ALI et al (1991) también reportaron que cuando las sales de amonio fueron usadas como fuente de nitrógeno el valor de pH del medio decreció.

Los mohos al igual que las levaduras presentaron mayor actividad frente a la oleína y la super oleína de palma; coincidiendo con el estudio desarrollado por CARDENAS (1999), quien evaluó la actividad Lipolítica de diversos hongos en diferentes sustratos, presentando estos mayor actividad frente a sustratos insaturados.

Conforme aumentó la concentración de sustrato la actividad y productividad lipolítica de los hongos aumentó; estos resultados corroboran los datos reportados por POKORNY et al. (1994), quienes demostraron que la adición del aceite de oliva en concentraciones entre 0,5% y 2% aumentó la producción de la lipasa en *el aspergillus niger*. En las levaduras (Figura 1 - 4), la actividad lipolítica aumenta en mayor proporción hasta una concentración de sustrato de 4 veces el volumen del inóculo y con tendencia a disminuir a la concentración de sustrato de 5 veces el volumen del inóculo; esto se debe, según LAGUNA (1968) y MURRAY, et al. (1994) a que la cantidad de sustrato ha sobrepasado la

capacidad física de la enzima para recibirlo y poder transformarlo, por ello la curva alcanza una meseta, lo que significa que la reacción prosigue a la misma velocidad, independientemente de la cantidad de sustrato adicionada; se dice entonces que la enzima se halla saturada con su sustrato. Los mohos (Figura 5 y 6), en cambio, presentaron mayor incremento de actividad lipolítica hasta la concentración de sustrato de 5 veces el volumen del inóculo, lo que indicaría que su actividad posiblemente sigue aumentando a medida que se incrementa la concentración de sustrato. JAGNOW (1991) menciona que la velocidad de una reacción enzimática depende de la concentración de sustrato.

V. CONCLUSIONES

De los resultados y discusiones se establecieron las siguientes conclusiones:

De las muestras obtenidos en Industrias del Espino S.A. (desecho líquido (DL), fruto (F), tierra Mt E7B (T), sólidos de tricanters y desecho sólido), se aislaron en medios sólidos diferenciales 28 microorganismos y se seleccionaron en medios sólidos y líquidos con aceite crudo de palma, 13 microorganismos productores de lipasas.

Las levaduras identificadas fueron: *Candida* sp TMY4a (L4(a)), *Candida albicans* TMY11 (L11), *Candida albicans* TMY4b (L4(b)), *Candida tropicales* TMYL4b (L4(b)), *Candida ceferrii* TMYL4b (L4(b)), *Candida boidinii* TMY7 (L7), *Candida albicans* TM7 (L7), *Candida lypolitica* TMY10 (L10). El moho identificados fue *Aspergillus* sp. TMF2 (moho verde).

Se reportaron nuevas especies de levaduras productoras de lipasas como *Cryptococcus uchicensis* TMY (L9) y *Pichia uchicensis* TML10 y una nueva especie de moho potencial productor de lipasa *Verticillium tingalences* TMF1 (moho blanco).

En los diferentes tipos de sustratos, la levadura *Candida albicans* TMY11 y *Cryptococcus uchiensis* TMY (L9) presentaron mayor actividad y productividad lipolítica extracelular y unida a membrana, respectivamente. Las levaduras alcanzan su mayor actividad y productividad lipolítica a concentraciones entre 4 a 5 veces la concentración inicial de los sustratos que contienen mayor cantidad de ácidos grasos insaturados como la oleica y super oleica de palma; del mismo modo los mohos alcanzan su máxima actividad y productividad lipolítica a una concentración de 5 veces la concentración inicial de los sustratos insaturados.

VI. RECOMENDACIONES

Se pueden mencionar las siguientes recomendaciones:

Evaluar la producción de lipasas, en fermentadores con paletas a nivel laboratorio e industrial.

Evaluar la producción de lipasa en substratos con mayor cantidad de ácidos insaturados.

Producir lipasa extracelular a nivel de planta piloto e industrial.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- AGROINDUSTRI@, 2001. Agronegocios y Biodiversidad. Agroindustria de Palma Aceitera. Fuentes: Gestión, El Comercio, La República y Notiagro [En línea: <http://www.geocities.com/agointer/agromundo>, 19 de Octubre]
- ALI, S.; SAYED, A.; SARKER, R.L. & ALAM, R. 1991. Factors affecting cellulose production by *Aspergillus terreus* using water hyacinth. *World J. Microbial and Biotech.* 7: 62-66
- AOAC. 1995. Official methods of analysis. Agricultural chemicals contaminants and drugs.
- ARIAS, E. y LASTRA, J. 1997. Biotecnología, cinética de crecimiento. México, Sinexi S.A. [En línea] Biotecnología. <http://www.monografias.com>, 20 mayo 2005)
- BECKER, M. 1999. Biotecnología; Curso de Práctica de Laboratorio. Zaragoza, España, Acribia S.A. p. 285.
- BROCK, T; MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J. M., PARKER, J. 1998. Biología de los microorganismos. 8ª ed. Madrid, Prentice Hall.
- CARBALLEIRA, J., GARCIA, C., ALVAREZ, E., SINISTERRA, J. 1999. Effects of inducers in the production of lipase by *Rhizomucor miehei* 2749 CCT and its potential use as whole cell biocatalyst. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. España

- CÁRDENAS, F. 1999. Búsqueda, selección y caracterización de nuevas lipasas de origen microbiano. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid.
- CARDENAS, F., ALVAREZ, E., ELSON, S., SÁNCHEZ-MONTERO, J. and SINISTERRA, J.V. 2000. Influence of the chemical structures of the inducer in the production of extracellular lipases by an *Pseudomonas cepacia* strain. *Lipases & Lipids: structure-function & Biotechnological applications*. Kokotos G. & Kokotos C. eds. Crete University Press, Heraklio, Grecia, p. 153-168.
- CÁRDENAS, F., ALVAREZ, E., DE CASTRO, M., SANCHEZ-MONTERO, VALMASEDA, M., ELSON, S., SINISTERRA, J. V. 2001. Screening and catalytic activity in organic síntesis of novel fungal and yeast lipases. *Journal of molecular catalysis B: Enzimatic*. Madrid- Spain. 14: 111-112.
- COCA, J., HERNANDEZ, O., BERRIO, R., MARTINEZ, S., DIAZ, E. y DUSTET, J. 2001. Producción y Caracterización de las Lipasas de *Aspergillus niger* y *A. fumigatus*. *Biotecnología aplicada*. La Habana - Cuba, 18: 216–220.
- CRUEGER, W. 1993. *Biotecnología. Manual de Microbiología Industrial*. Trad. por Paloma Liras. 3 ed. Zaragoza, España, Acribia S.A. p. 413.
- DOMÍNGUEZ DE MARÍA, P., MARTÍNEZ-ALZAMORA, F., PÉREZ MORENO, S., VALERO, F., RÚA, M. L., ALCÁNTARA, A. R., SÁNCHEZ MONTERO, J. M., SINISTERRA, J.V. 2002. Heptyl oleate synthesis as useful tool to discriminate between lipases, proteases and other hydrolases in crude preparations. *Enzyme Microbial Technology*. 31, 283 - 288.

- DOMINGUEZ DE MARIA; P., SÁNCHEZ-MONTERO; J. M., ALCANTARA, A.R., VALERO, F., SINISTERRA, J.V. 2005. Rational strategy for the production of new crude lipase from *Candida rugosa*. *Biotechnology Lett.* 2005 , 27,499-503
- ERTOLA, R., YANTORNO, O., MIGNONE, C. 1994. Microbiología Industrial. Organización de Estados Americanos, Departamento de Asuntos Científicos y Tecnológicos de la Secretaría General. 103 pp. [En línea]:OAS (<http://www.oas.org/udse/>, ciencias).
- FEDNA, 2003. Tablas FEDNA de composición y valor nutritivo de alimentos para la formulación de piensos compuestos. 2 Ed. C, de Blas, GG. Mateos. P.G. Rebollar (Eds). Madrid, España. 423 pp. [En línea]: Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal. Escuela Técnica Superior de ingenieros Agronomos, (www.etsia.upm.es/fedna/, grasas y aceites)
- FRENKEN, L. G., EGMOND, SR., BATENBURG, A. WIL BOS, J., VISSER, C. and VERRIPS, C. 1992. Reproducción del gene de la lipasa de los glumae de los *pseudomonas* y de la determinación de los residuos activos del sitio. *Application Rodee Microbiology.* 58: 3787 - 3791.
- GODIA, F. 1998. Ingeniería Bioquímica. Madrid, España, Síntesis S.A. 528 p.
- HABA, E., BRESCO, O., FERRER, C., MARQUÉS, A.,BUSQUETS, M., MANRESA, A. 2000. Isolation of lipase-secreting bacteria by deploying used frying oil as selective substrate. *Enzyme and microbial technology.* Barcelona, Spain. 26: 40-44.

- HOLMES, D.J. AND . CUNDLIFFE, E. 1991. Analysis of a ribosomal RNA methylase gene from *streptomyces tenebrarius* which confers resistance to gentamicin. Journal Mol. Gen.(Genetic). 229 (2): 229 -237.
- JAWETZ, E; MELNICK, J; ADELBERG, E. 1983. Manual de Microbiología Médica. 9 ed. México, El Manual Moderno S.A. p. 595.
- JAY J.M. 1981. Microbiología Moderna de los Alimentos. 2 ed. España, Acribia. p 441.
- JONES, J. B. G. 1994. Fungal adhesión. Mycological. Research 98:961-981.
- JAGNOW, G. y DAVID, W. 1991. Biotecnología, Introducción con experimentos modelo. Zaragoza, España, Acribia S.A. p. 106- 109.
- KOJIMA, Y. YOKOE, M., MASE, T. 1994. Purification and characterization o fan alkaline lipase from *pseudomonas fluorescens* AK 102. Bioscilation Biotechnology Biochemical. 58: 1564 – 1568.
- LAGUNA, J. 1968. Bioquímica. 2 ed. México, La prensa medica mexicana. p. 785.
- LITTLE, T. 1991. Métodos Estadísticos para la Investigación en la Agricultura. 2 ed. México, Trillas. p. 270.
- LÓPEZ, E. 2001. Tratamientos enzimáticos en la industria de alimentos. Bogotá, Colombia, Area tecnologica de Centro Nacional de Tecnología para la Industria Alimentaria (CENTIA). p 22.
- LOTTI, M., GRANDORI, R., FUSETTI, F., LONGHI, S., BROCCA, S., TRAMONTANO, A., ALBERGHINA, L. 1993. Cloning and analysis of *candidda cylindracea* lipase sequences. Genetics. 124:45 - 55.

- MATEOS, P. 2003. Microbiología. [En línea]: Universidad de Salamanca, (<http://coli.usal.es/web/educativo/entrada.html>, resúmenes)
- MAZZA, G. 2000. Alimentos Funcionales: Aspectos bioquímicos y de procesado. Zaragoza, España, Acribia. p. 457.
- MIURA, T, AND YAMANE, T., 1997. Screening for fungi that have high lipolytic and acidolytic activities in biomasa support particles. Bioscience, Biotechnology Biochemistry, 61(8): 1252 – 1257.
- MONZON, A. 2001. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. Manejo integrado de plagas. Universidad Nacional Agraria de Nicaragua. 63: 95 – 103.
- MURRAY, R., GRANNER, D., MAYES, P., RODWELL, V. 1994. Bioquímica de Harper. 13 ed. Santafé de Bogotá, Editorial Moderno S.A. de C.V. Mexico. p.961.
- NAKANDAKARI, J. 1988. Aislamiento, selección y estudios preliminares de hongos secretores de celulasas. Tesis. UPCH. Lima.
- NURAI DA, L., HARIYADI, P., DEWANTI-HARIYADI, R., BUDIYANTO, S. 2001. Production of lipase with esterification activity from moulds isolated from moulds isolated from Indonesian fermented foods. [En línea]: Departamento of food technology and Human Nutrition. Bogor Agricultural University. Indonesia. (http://ift.confex/ift/2001/techprogram/paper_8562.htm, Journals, 18 Jul. 2002)
- OBRADORS, N., MONTESINOS, J.L., VALERO, F., LAFUENTE, J., SOLA, C., 1993. Biotechnol. Lett., 15, 357-360.

- PASTOR, J., LOZANO, P.; MOJON, A.; CANOVAS, M. 2001. Guía de Bioquímica y Biología Molecular para Estudiantes de Ciencias e Ingeniería. Murcia, Europa, Murcia. [En línea]: Departamento de Bioquímica, Biología Molecular e inmunología. ([www.um.es/bbmbi/AyudasDocentes/MarcoDcha, Practica06AmilasaSalivarylipasaPancreática,20Mayo2005](http://www.um.es/bbmbi/AyudasDocentes/MarcoDcha,Practica06AmilasaSalivarylipasaPancreática,20Mayo2005)).
- POKORNY D.; FRIEDRICH J.; CIMERMAN A. 1994. Effect of nutritional factors on lipase biosynthesis by *Aspergillus niger*. *Biotechnol. Lett.* 16: 363-366.
- PROYECTO Lipasa. 1997. Departamento de Ingeniería Química. [En línea] Universidad Autónoma de Barcelona, (<http://eq3.Uab.es/lipasa/webesp2.html>), Lipasa, 18 Jul. 2002).
- QUINTEROS, R. 1993. Ingeniería Bioquímica. México, Alhambra. p. 332
- RODRIGUEZ, R., SANHUEZA, J., VALENZUELA, A., NIETO, S. 1997. Hidrólisis del aceite de coco (*Cocos lucifera* L.) mediante enzimas estereoespecíficas y sin especificidad posicional. [En línea]: Instituto de la Grasa. Barcelona - España. (www.ig.csic.es/revis/fas48/res48/re48f12.htm, Revista: Grasas y Aceites, 18 Jul. 2002).
- RUIZ, C., FALCOCCHIO, S., XOXI, E., PASTOR, J., DIAZ, P., SASO, L. 2004. Activation and inhibition of *Candida rugosa* and *Bacillus*-related lipases by saturated fatty acids, evaluated by a new colorimetric microassay. *Biochim Biophys Acta*1672(3):184-191.
- SÁNCHEZ, A., DE LA CASA, R., SINISTERRA, J., VALERO, F., SANCHEZ-MONTERO, J.M. 1999. Effect of fermentation conditions in the enzymatic

- activity and stereoselectivity of crude lipase from *Candida rugosa*. Applied Biochemistry and biotechnology. 80: 65-75.
- SCRIBAN, R. 1985. Biotecnología. 2 ed. México. El Mundo Moderno. p. 669.
- SINISTERRA, J.V. y SÁNCHEZ-MONTERO, J.M. 1998. A systematic study of the variables that control the enzymatic activity of chemically modified lipase of *Candida rugosa*.: *Recent Research Development in Organic Chemistry*. 2: p 155-194
- STÖCKLEIN, W., SZTAJER, H., MENGE U., SCHMID, R. 1993. Purification and properties of a lipase from *penicillium expansum*. Biochemical Biophysiological. Acta. 1168 (2): 181 – 189.
- SZTAJER, H., MALISZEWSKA, I., WIERCZOREK, J. 1988. Production of exogenous lipases by bacteria, fungi and actinomycetes. Enzyme Microbiology Technology. 10: 492 – 497.
- SZTEM, D.Y PRAVIA, M. 1999. Manual para la Elaboración de Compost Bases Conceptuales y Procedimientos. Organización Panamericana de la Salud. OPS/HEP/HES/URU/02.99. Estados Unidos. 69 p.
- TIETZ, N. W., AND FIERECK, E. A. 1966. A Specific Method for Serum Lipase Determination. *Clin. Chim. Acta*. 13, 352.
- TOMIZUKA, N., OTA, Y., YAMADA, K. 1966. Studies on lipase from *candida cylindracea*. Part I. Purification and properties. Agriculture Biology Chemical. 30: 576 – 584.
- TORRENEGRA, R. D. 2003. Biotransformación de diterpenos obtenidos de asteraceas por hongos filamentosos nativos. Bogotá. [En línea]: Pontificia

Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Proyectos,
(<http://www.javeriana.edu.co/Facultades/>, ciencias, p. 27)

TORTORA, J. 1993. Introducción a la Microbiología. 3 ed. Zaragoza, España.
Acribia S.A. p. 289.

VALENZUELA, B., NIETO, S. 1994. Biotecnología de Lípidos: Uso de lipasas para
la modificación estructural de grasas y aceites. Grasas y Aceites. Instituto
de la Grasa. Sevilla, España. 45(5):337-343.

VÁSQUEZ, A V. 1990. Experimentación Agrícola. Perú, Amaru S.A. p.278.

VÁZQUEZ, A., SANTIAGO, G., ESTRADA T, A. 2002. Influencia del pH en el
crecimiento de quince cepas de hongos ectomicorrizógenos. Anales del
Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Serie
Botánica 73(1): 1-15 p.

VILCHES, L. 2002. Determinación de la actividad exoglucanasas de cepas
fúngicas nativas de las provincias de Huaylas y Huaraz. Universidad
Nacional Mayor de San Marcos. Tesis. 77 pp. [En línea]:
(http://sisbib.unmsm.edu.pe/BibVirtualData/Tesis/Basic/Vilches_P_L/T_completo.pdf).

ANEXO

Cuadro 16. Biomasa y actividad lipolítica de la levadura L4(a) - *Candida sp.*
 TMY4a evaluado durante el cultivo a T=30°C, 150r.p.m.

Tiempo (Horas)	Biomasa (10 ⁶ cel/mL)	Actividad lipolítica ¹ (μMol/mL h)
0.00	287	57.50
2.40	253	55.00
5.50	289	55.00
9.30	445	57.50
13.15	448	57.50
18.35	677	60.00
20.00	794	61.38
21.35	890	62.50
27.25	928	62.50
32.40	1187	62.50

¹ Actividad lipolítica evaluada usando oleina de palma como sustrato.

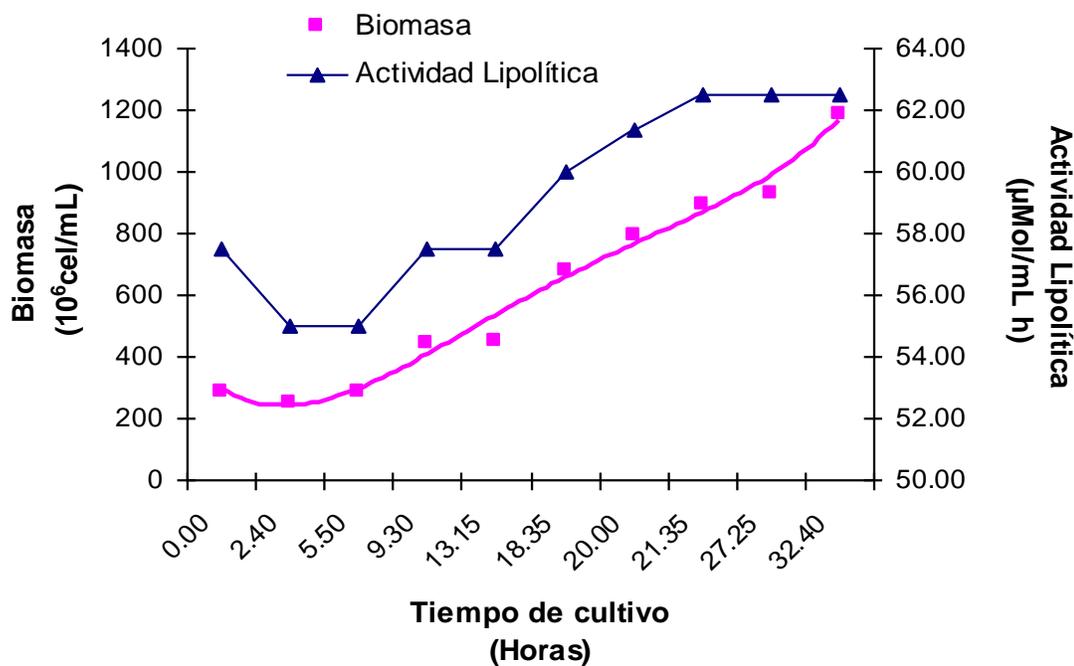


Figura 7. Relación de biomasa y actividad lipolítica de la L4(a) - *Candida sp.*

TMY4a en función al tiempo de cultivo

Cuadro 17. Biomasa y actividad lipolítica de la levadura L4(b) *Candida albicans* TMY4b, *Candida tropicalis* TMY4b y *Candida ciferrii* TMY4b, evaluado durante el cultivo a T=30°C, 150r.p.m.

Tiempo (Horas)	Biomasa (10 ⁶ cel/mL)	Actividad lipolítica ¹ (μMol/mL h)
0.00	123	57.50
2.40	26	55.00
5.50	85	52.50
9.30	243	52.50
10.00	277	53.41
13.15	426	57.50
16.35	437	52.50
21.35	647	55.00
25.45	685	57.50
27.25	699	55.00
29.50	743	60.00
32.40	803	60.00
36.40	860	70.00
43.40	928	70.00

¹ Actividad lipolítica evaluada usando oleina de palma como sustrato.

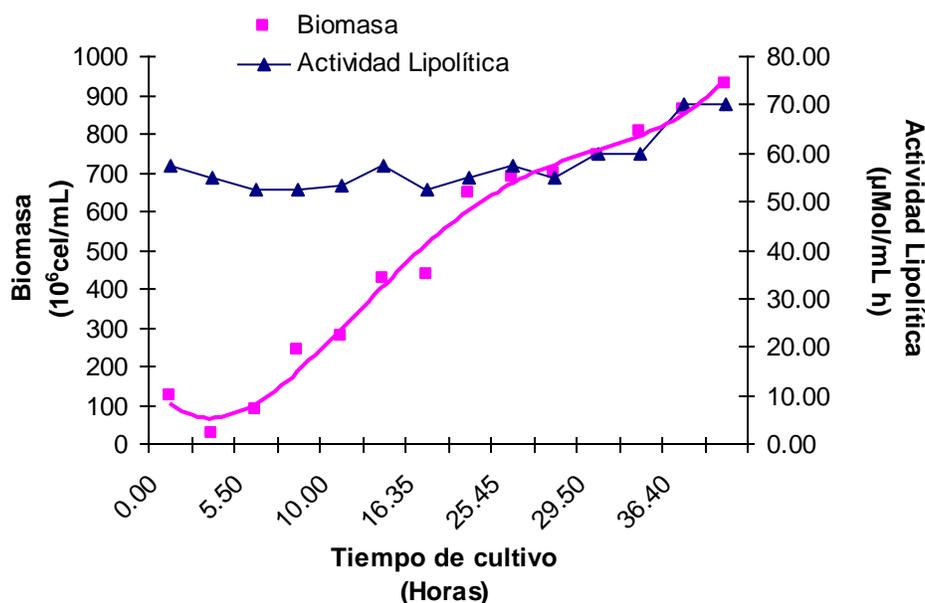


Figura 8. Relación de biomasa y actividad lipolítica de la L4(b) *Candida albicans* TMY4b, *Candida tropicalis* TMY4b y *Candida ciferrii* TMY4b en función al tiempo de cultivo.

Cuadro 18. Biomasa y actividad lipolítica de la levadura L7 - *Candida boidinii* TMY7 y *Candida albicans* TMY7, evaluado durante el cultivo a T=30°C, 150r.p.m.

Tiempo (Horas)	Biomasa (10 ⁶ cel/mL)	Actividad lipolítica ¹ (μMol/mL h)
0.00	290	55.00
2.40	271	57.50
5.50	264	55.00
9.30	260	55.00
10.00	360	58.00
11.15	524	62.50
13.15	794	67.50
16.35	1007	55.00
25.40	2609	60.00
27.25	1065	57.50

¹ Actividad lipolítica evaluada usando oleina de palma como sustrato.

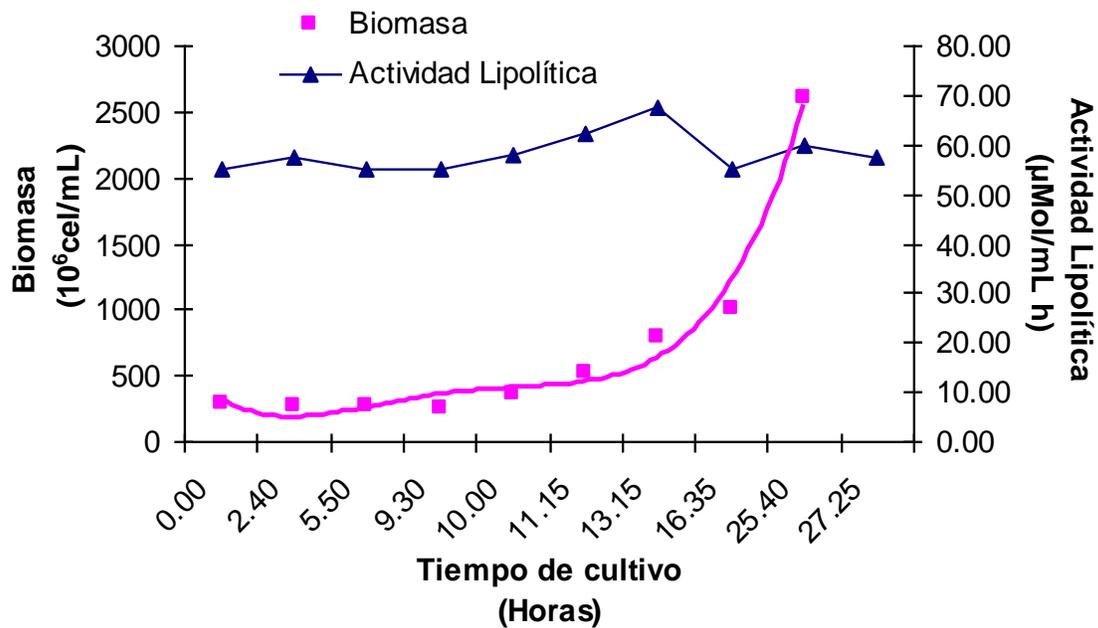


Figura 9. Relación de biomasa y actividad lipolítica de la L7 - *Candida boidinii* TMY7 y *Candida albicans* TMY7 en función al tiempo de cultivo.

Cuadro 19. Biomasa y actividad lipolítica de la levadura L9 - *Cryptococcus uchiensis* TMY9, evaluado durante el cultivo a T=30°C, 150r.p.m.

Tiempo (Horas)	Biomasa (10 ⁶ cel/mL)	Actividad Lipolítica ¹ (μMol/mL h)
0.00	69	71.98
1.40	75	73.37
3.00	133	86.72
4.00	191	99.95
6.55	267	117.58
8.10	306	126.52
9.20	451	160.05
12.00	732	225.00
13.15	830	255.08
15.00	852	261.78
16.10	844	259.27
19.05	895	268.00

¹ Actividad lipolítica evaluada usando oleina de palma como sustrato.

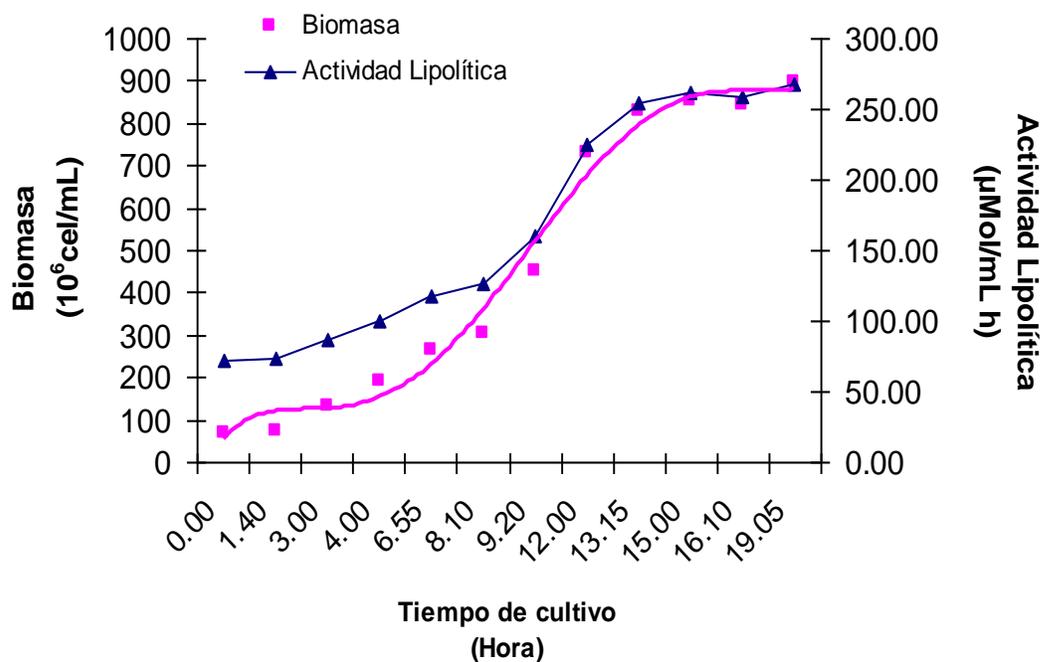


Figura 10. Relación de biomasa y actividad lipolítica de la L9 - *Cryptococcus uchiensis* TMY9 en función al tiempo de cultivo.

Cuadro 20. Biomasa y actividad lipolítica de la levadura L10 - *Candida lipolítica* TMY10 y *Pichia uchicensis*. TMY10, evaluado durante el cultivo a T=30°C, 150r.p.m.

Tiempo (Horas)	Biomasa (10 ⁶ cel/mL)	Actividad Lipolítica ¹ (μMol/mL h)
0.00	76.49	55.00
7.10	137.00	56.82
12.00	241.84	60.00
13.15	299.78	61.00
15.10	398.03	63.00
23.23	807.64	70.00
33.50	784.00	70.00

¹ Actividad lipolítica evaluada usando a la oleina de palma como sustrato.

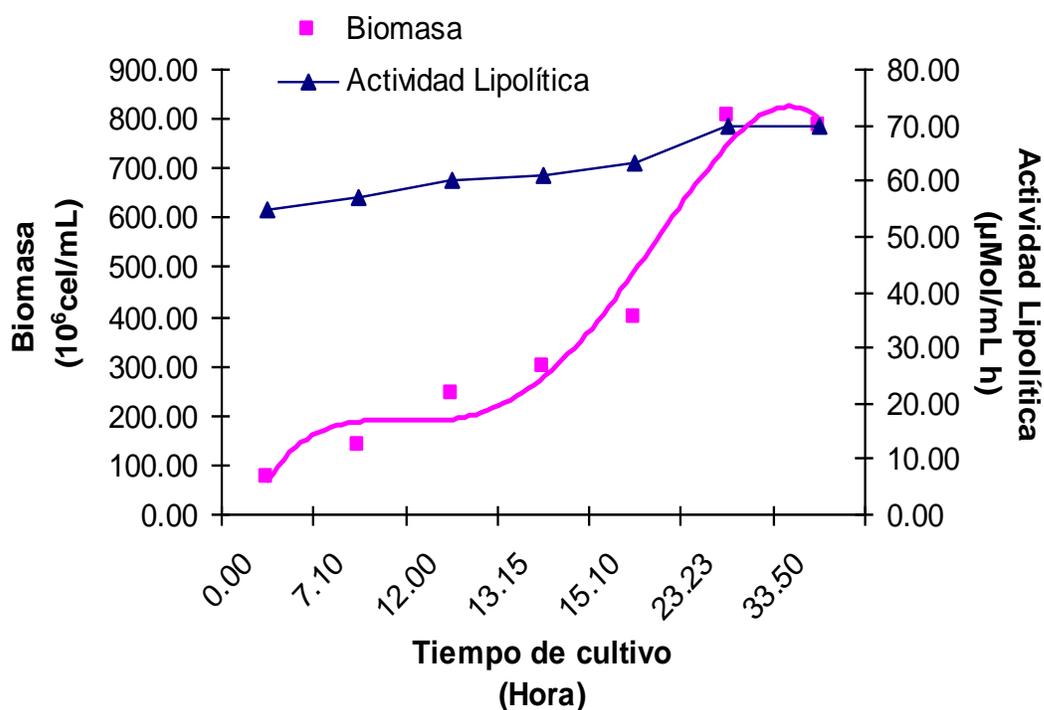


Figura 11. Relación de biomasa y actividad lipolítica de la L10 - *Candida lipolítica* TMY10 y *Pichia uchicensis*. TMY10 en función al tiempo de cultivo.

Cuadro 21. Biomasa y actividad lipolítica de la levadura L11 - *Candida albicans*

TMY11, evaluado durante el cultivo a T=30°C, 150r.p.m.

Tiempo (Horas)	Biomasa (10 ⁶ cel/mL)	Actividad Lipolítica ¹ (μMol/mL h)
0.00	76.49	72.50
10.00	192.71	52.5000
15.00	230.50	55.0000
18.30	232.87	60.0000
23.25	335.20	55.0000
33.45	510.00	55.0000
36.10	1010.79	55.0000
37.50	257.24	55.0000

¹ Actividad lipolítica evaluada usando oleina de palma como sustrato.

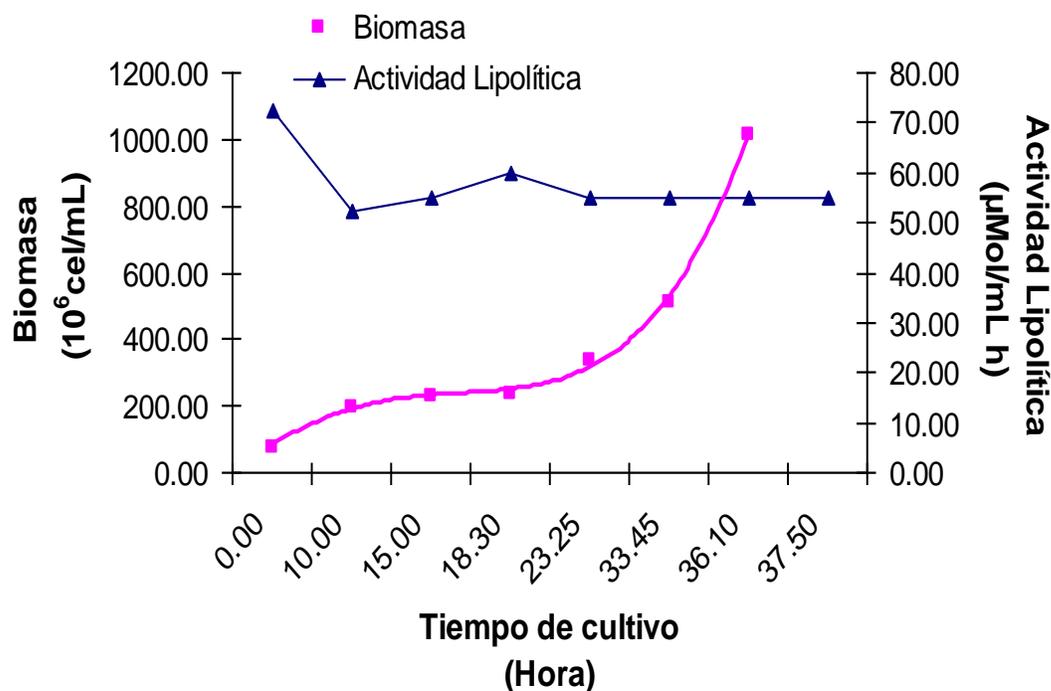


Figura 12. Relación de biomasa y actividad lipolítica de la L11 - *Candida albicans*

TMY11 en función al tiempo de cultivo.

Cuadro 22. Biomasa y actividad lipolítica del moho Mb - *Verticillium tingalences*

TMF1, evaluado durante el cultivo a T=30°C, 150r.p.m.

Tiempo (Hora)	Actividad Lipolítica ¹ (μMol/mL h)
0.00	110.00
10.00	118.33
17.00	126.67
37.00	150.00
44.00	151.67
51.00	155.00
58.00	155.00

¹ Actividad lipolítica evaluada usando oleina de palma como sustrato.

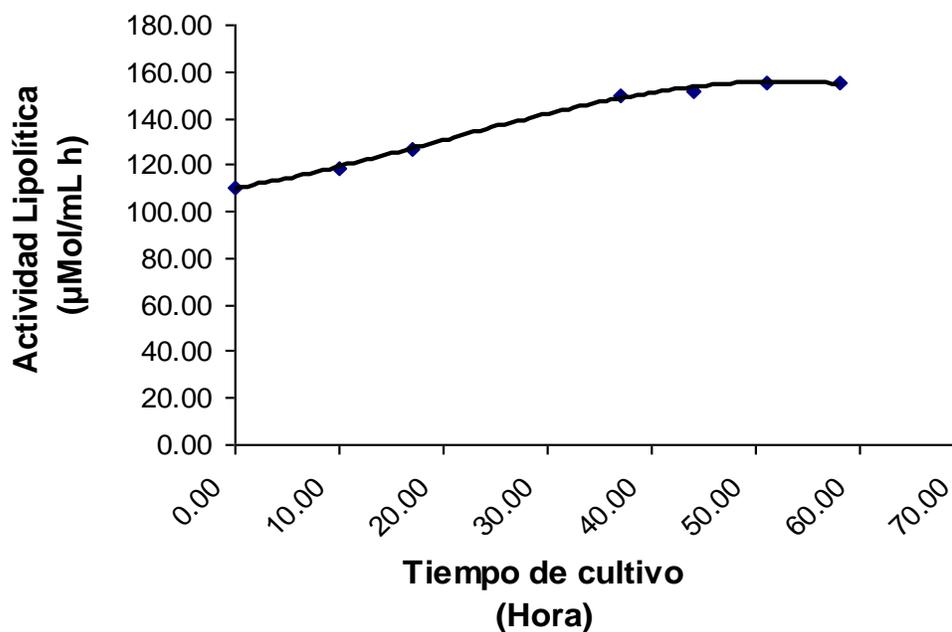


Figura 13. Relación de biomasa y actividad lipolítica del moho Mb - *Verticillium tingalences* TMF1 en función al tiempo de cultivo.

Cuadro 23. Biomasa y actividad lipolítica del moho Mv - *Aspergillus sp.* TMF2, evaluado durante el cultivo a T=30°C, 150r.p.m.

Tiempo (Hora)	Actividad Lipolítica ¹ (μMol/mL h)
0	90.00
7	100.00
19	100.00
27	100.00
34	115.00
43	118.33
51	121.67
58	125.00
67	123.33

¹ Actividad lipolítica evaluada usando oleina de palma como sustrato.

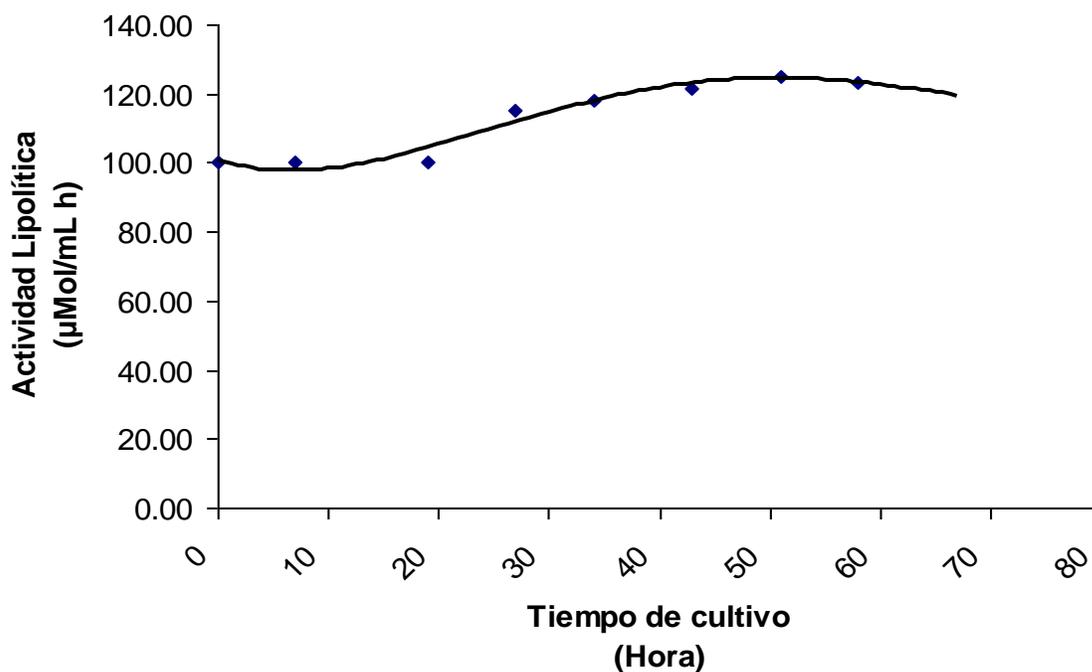


Figura 14. Relación de biomasa y actividad lipolítica del moho Mv - *Aspergillus sp.* TMF2 en función al tiempo de cultivo.

Cuadro 24. Ecuaciones de regresión de la respuesta de la lipasa de la levadura L4(b) en función de diferentes concentraciones de cada sustrato.

Descripción		Ecuaciones de regresión	F ^(a)	R ^{2(b)}
Actividad Lipolítica ($\mu\text{mol}/(\text{mLh})$)	E	$Y = 75.733 - 20.468X + 8.309X^2 - 0.889X^3$	**	0.99
	P	$Y = 91.333 - 33.111X + 19.083X^2 - 2.139X^3$	**	0.98
	RBD	$Y = 65 - 2.1667X + 0.8333X^2$	**	0.98
	ACP	$Y = 82.333 - 12.897X + 12.381X^2 - 1.389X^3$	**	0.97
	SO	$Y = 131 - 110.119X + 75.714X^2 - 9.167X^3$	**	0.99
	O	$Y = 108.667 - 90.198X + 80.357X^2 - 9.444X^3$	**	0.98
Productividad Lipolítica ($\mu\text{mol}/(\text{hx}10^6\text{celxmL})$)	E	$Y = 1.134 + 0.196X$	**	0.88
	P	$Y = 2.113 - 1.381X + 0.849X^2 - 0.101X^3$	**	0.99
	RBD	$Y = 1.110 + 0.217X$	**	0.94
	ACP	$Y = 2.111 - 1.119X + 0.767X^2 - 0.091X^3$	*	0.95
	SO	$Y = 3.995 - 4.784X + 2.923X^2 - 0.350X^3$	**	0.98
	O	$Y = 3.599 - 4.657X + 3.224X^2 - 0.376X^3$	**	0.97

^(a) Significancia de test F: * = P(<0,05), ** = P(0,01).

^(a) Coeficiente de determinación.

Cuadro 25. Promedios de actividad y productividad lipolítica de la levadura L4(b) frente a diferentes concentraciones de sustratos.

Descripción	Concentraciones de sustrato (x) ¹					Reg ²	
	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0		
pH	4.41	6.50	6.46	6.46	6.46		
Biomasa	499.25	457.41	348.68	348.68	348.68		
Actividad Lipolítica ($\mu\text{mol}/(\text{mLh})$)	E	62.5	65.0	65.0	70.0	70.0	C**
	P	75.0	85.0	105.0	127.5	135.2	C**
	RBD	63.3	65.0	65.0	70.0	75.0	Q**
	ACP	81.7	90.0	125.0	135.0	155.0	C**
	SO	90.0	130.0	250.0	305.0	330.0	C**
	O	95.0	151.7	340.0	406.7	491.7	C**
Promedio	77.9	97.8	158.3	185.7	209.5		
Productividad Lipolítica ($\mu\text{mol}/(\text{hx}10^6\text{celxmL})$)	E	1.32E-04	1.42E-04	1.86E-04	2.01E-04	2.01E-04	L**
	P	1.50E-04	1.86E-04	3.01E-04	3.66E-04	3.88E-04	C**
	RBD	1.36E-04	1.42E-04	1.86E-04	2.01E-04	2.15E-04	L**
	ACP	1.73E-04	1.97E-04	3.59E-04	3.87E-04	4.45E-04	C*
	SO	1.90E-04	2.86E-04	7.17E-04	8.75E-04	9.47E-04	C**
	O	2.00E-04	3.33E-04	9.75E-04	1.17E-03	1.41E-03	C**
Promedio	1.63E-04	2.15E-04	4.54E-04	5.33E-04	6.01E-04		

¹ x = veces el volumen del inóculo

² Análisis de regresión: ^L Efecto Lineal, ^Q Efecto Cuadrático, ^C Efecto Cúbico, * = (P<0,05) ** = (P<0,01).

Cuadro 26. Ecuaciones de regresión de la respuesta de la lipasa de la levadura *Cryptococcus uchiensis* TMY9 en función de diferentes concentraciones de cada sustrato.

Descripción		Ecuaciones de regresión	F ^(a)	R ² ^(b)
Actividad Lipolítica ($\mu\text{mol}/(\text{mLh})$)	E	$Y = 43.067 + 42.825X - 14.369X^2 + 1.472X^3$	**	0.90
	P	$Y = 37.067 + 90.087X - 28.774X^2 + 3.139X^3$	**	0.99
	RBD	$Y = 36.867 + 63.325X - 23.452X^2 + 2.556X^3$	**	0.95
	ACP	$Y = 193.2 - 165.881X + 73.036X^2 - 6.75X^3$	**	0.95
	SO	$Y = 47.2 + 53.643X + 17.976X^2 - 3X^3$	**	1.00
	O	$Y = 184.533 - 217.230X + 149.881X^2 - 18.556X^3$	**	0.99
Productividad Lipolítica ($\mu\text{mol}/(\text{hx}10^6\text{celxmL})$)	E	$Y = 1.022 + 0.268X$	*	0.83
	P	$Y = 1.076 + 0.671X$	**	0.96
	RBD	$Y = 1.132 + 0.259X$	*	0.88
	ACP	$Y = -1.677 + 2.2X$	**	0.94
	SO	$Y = -0.257 + 2.299X$	**	0.95
	O	$Y = -1.905 + 3.536X$	**	0.92

(a) Significancia de test F: * = $P(<0,05)$, ** = $P(0,01)$.

(b) Coeficiente de determinación

Cuadro 27. Promedios de actividad y productividad lipolítica de la levadura *Cryptococcus uchiensis* TMY9 frente a diferentes concentraciones de sustratos.

Descripción	Concentraciones de sustrato ¹						Reg ²
	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0		
pH	6.32	6.32	6.73	6.73	6.73		
Biomasa	529	453.55	327.07	327.07	327.07		
Actividad Lipolítica ($\mu\text{mol}/(\text{mLh})$)	E	72.5	84.2	80.0	80.0	81.7	C**
	P	100.8	129.2	130.0	140.0	160.0	C**
	RBD	77.5	96.7	75.0	85.0	85.0	C**
	ACP	87.5	123.3	135.0	290.0	340.0	C**
	SO	115.8	201.7	290.0	356.7	390.0	C**
	O	97.5	205.0	375.0	530.0	525.0	C**
Promedio	91.9	140.0	180.8	246.9	263.6		
Productividad Lipolítica ($\mu\text{mol}/(\text{hx}10^6\text{celxmL})$)	E	1.14E-04	1.55E-04	2.13E-04	2.13E-04	2.19E-04	L*
	P	1.59E-04	2.37E-04	3.47E-04	3.73E-04	4.27E-04	L**
	RBD	1.22E-04	1.77E-04	2.00E-04	2.27E-04	2.27E-04	L*
	ACP	1.38E-04	2.27E-04	3.60E-04	7.73E-04	9.64E-04	L**
	SO	1.83E-04	3.71E-04	7.73E-04	9.53E-04	1.04E-03	L**
	O	1.54E-04	3.77E-04	1.00E-03	1.42E-03	1.40E-03	L**
Promedio	1.45E-04	2.57E-04	4.82E-04	6.60E-04	7.13E-04		

¹ x = veces el volumen del inóculo

² Análisis de regresión: ^L Efecto Lineal, ^Q Efecto Cuadrático, ^C Efecto Cúbico, * = (P<0,05) ** = (P<0,01).

Cuadro 28. Ecuaciones de regresión de la respuesta de la lipasa de la levadura L10 (*Candida lipolytica* TMY10 y *Pichia uchiensis*. TMY10) en función de diferentes concentraciones de cada sustrato.

Descripción	Ecuaciones de regresión	F ^(a)	R ^{2(b)}
Actividad Lipolítica ($\mu\text{mol}/(\text{mLh})$)	E $Y = 72.533 - 17.444X + 7.417X^2 - 0.806X^3$	**	0.99
	P		
	RBD $Y = 73.2 - 19.69X + 8.393X^2 - 0.917X^3$	**	0.99
	ACP $Y = 71.667 - 7.46X + 9.762X^2 - 1.111X^3$	**	0.99
	SO $Y = 97 - 85.357X + 70.893X^2 - 8.75X^3$	**	0.99
	O $Y = 84.867 - 98.032X + 95.44X^2 - 12.194X^3$	**	0.97
Productividad Lipolítica ($\mu\text{mol}/(\text{hx}10^6\text{celxmL})$)	E $Y = -0.478 + 1.1X - 0.117X^2$	*	0.96
	P $Y = 0.056 + 0.778X$	**	0.93
	RBD $Y = -0.484 + 1.099X - 0.117X^2$	*	0.96
	ACP $Y = -0.073 + 0.905X$	**	0.94
	SO $Y = 2.707 - 5.032X + 3.346X^2 - 0.408X^3$	*	0.99
	O $Y = 2.692 - 5.995X + 4.294X^2 - 0.534X^3$	**	0.96

^(a) Significancia de test F: * = P(<0,05), ** = P(0,01).

^(b) Coeficiente de determinación.

Cuadro 29. Promedios de actividad y productividad lipolítica de la levadura L10 (*Candida lipolítica* TMY10 y *Pichia uchiensis*. TMY10) frente a diferentes concentraciones de sustratos.

Descripción	Concentraciones de sustrato ¹						Reg ²
	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0		
pH	4.34	6.22	6.18	6.18	6.18		
Biomasa	906.27	525.36	285.8	285.80	285.80		
Actividad Lipolítica ($\mu\text{mol}/(\text{mLh})$)	E	61.7	60.8	65.0	70.0	70.0	C**
	P	75.0	80.0	100.0	110.0	125.0	ND
	RBD	60.8	60.0	65.0	70.0	70.0	C**
	ACP	73.3	85.0	110.0	125.0	140.0	C**
	SO	75.0	135.0	250.0	325.0	350.0	C**
	O	76.7	146.7	360.0	412.5	462.5	C**
Promedio	70.4	94.6	158.3	185.4	202.9		
Productividad Lipolítica ($\mu\text{mol}/(\text{hx}10^6\text{celx mL})$)	E	5.84E-05	1.05E-04	1.91E-04	2.06E-04	2.06E-04	Q*
	P	7.14E-05	1.38E-04	2.94E-04	3.24E-04	3.68E-04	L**
	RBD	5.78E-05	1.04E-04	1.91E-04	2.06E-04	2.06E-04	Q*
	ACP	6.99E-05	1.47E-04	3.24E-04	3.68E-04	4.12E-04	L**
	SO	7.20E-05	2.33E-04	7.35E-04	9.56E-04	1.03E-03	C*
	O	7.28E-05	2.53E-04	1.06E-03	1.21E-03	1.36E-03	C**
Promedio	6.71E-05	1.63E-04	4.65E-04	5.45E-04	5.97E-04		

¹ x = veces el volumen del inóculo

² Análisis de regresión: ^L Efecto Lineal, ^Q Efecto Cuadrático, ^C Efecto Cúbico, * = (P<0,05) ** = (P<0,01).

Cuadro 30. Ecuaciones de regresión de la respuesta de la lipasa de la levadura *Candida albicans* TMY11 en función de diferentes concentraciones de cada sustrato.

Descripción		Ecuaciones de regresión	F ^(a)	R ^{2(b)}
Actividad Lipolítica ($\mu\text{mol}/(\text{mLh})$)	E	$Y = 85.533 + 5.627X - 5.012X^2 + 0.694X^3$	**	0.98
	P	$Y = 103.267 + 18.159X - 5.952X^2 + 0.889X^3$	**	0.88
	RBD	$Y = 69.6 + 31.667X - 15.75X^2 + 1.917X^3$	**	0.88
	ACP	$Y = 83.1 + 13.233X$	**	0.99
	SO	$Y = 107.933 - 56.563X + 65.131X^2 - 6.972X^3$	**	0.99
	O	$Y = 193.933 - 225.206X + 158.738X^2 - 19.722X^3$	**	0.99
Productividad Lipolítica ($\mu\text{mol}/(\text{hx}10^6\text{celxmL})$)	E	$Y = 5.151 - 3.715X + 1.123X^2 - 0.106X^3$	**	0.95
	P	$Y = 6.773 - 4.937X + 1.58X^2 - 0.15X^3$	**	0.98
	RBD	$Y = 4.891 - 3.304X + 0.955X^2 - 0.087X^3$	**	0.98
	ACP	$Y = 5.81 - 4.471X + 1.54X^2 - 0.153X^3$	**	0.91
	SO	$Y = 7.4 - 7.196X + 3.236X^2 - 0.332X^3$	**	0.98
	O	$Y = 9.065 - 10.483X + 5.038X^2 - 0.576X^3$	**	0.97

(a) Significancia de test F: * = P(<0,05), ** = P(0,01).

(b) Coeficiente de determinación

Cuadro 31. Promedios de actividad y productividad lipolítica de la levadura *Candida albicans* TMY11 frente a diferentes concentraciones de sustratos.

Descripción	Concentraciones de sustrato ¹					Reg ²	
	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0		
pH	4.2	6.3	6.2	6.2	6.2		
Biomasa	351.7	656.3	536.3	536.3	536.3		
Actividad Lipolítica ($\mu\text{mol}/(\text{mLh})$)	E	86.7	82.5	75.0	72.5	75.0	C**
	P	115.0	128.3	120.0	142.5	155.0	C**
	RBD	86.7	88.3	70.0	70.0	72.5	C**
	ACP	96.7	108.3	122.5	137.5	147.5	L**
	SO	112.5	186.7	355.0	465.0	585.0	C**
	O	111.7	205.0	437.5	555.0	575.0	C**
Productividad Lipolítica ($\mu\text{mol}/(\text{hx}10^6\text{celxmL})$)	E	2.48E-04	1.26E-04	1.40E-04	1.36E-04	1.40E-04	C**
	P	3.28E-04	1.96E-04	2.24E-04	2.67E-04	2.90E-04	C**
	RBD	2.47E-04	1.35E-04	1.31E-04	1.31E-04	1.36E-04	C**
	ACP	2.76E-04	1.65E-04	2.29E-04	2.57E-04	2.76E-04	C**
	SO	3.22E-04	2.85E-04	6.64E-04	8.70E-04	1.09E-03	C**
	O	3.17E-04	3.12E-04	8.18E-04	1.04E-03	1.08E-03	C**

¹ x = veces el volumen del inóculo

² Análisis de regresión: ^L Efecto Lineal, ^Q Efecto Cuadrático, ^C Efecto Cúbico, * = (P<0,05) ** = (P<0,01).

Cuadro 32. Ecuaciones de regresión de la respuesta de la lipasa del mohó *Verticillium tingalences* TMF1 en función de diferentes concentraciones de cada sustrato.

Descripción		Ecuaciones de regresión	F ^(a)	R ^{2(b)}
Actividad Lipolítica (μmol/(mLh))	E	$Y = 70.5 - 3.524X + 0.476X^2$	*	0.56
	P			
	RBD	$Y = 72 - 6.048X + 0.952X^2$	**	0.54
	ACP			
	SO	$Y = - 19 + 137.262X - 38.571X^2 + 4.167X^3$	**	0.99
O	$Y = 125.167 + 31.647X - 6.548X^2 + 0.972X^3$	*	0.98	
Productividad Lipolítica (UA/h)	E	$Y = 1.813 - 0.017X$	*	0.48
	P			
	RBD	$Y = 1.944 - 0.162X + 0.026X^2$	**	0.52
	ACP			
	SO	$Y = - 0.494 + 3.685X - 1.034X^2 + 0.112X^3$	**	0.99
O	$Y = 3.374 + 0.863X - 0.18X^2 + 0.027X^3$	*	0.98	

(a) Significancia de test F: * = P(<0,05), ** = P(0,01).

(b) Coeficiente de determinación.

Cuadro 33. Promedios de actividad y productividad lipolítica del mohó *Verticillium tingalences* TMF1 frente a diferentes concentraciones de sustratos.

Descripción	Concentraciones de sustrato ¹						Reg ²
	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0		
pH	6.62	6.58	6.6	6.63	6.59		
Actividad Lipolítica (μmol/(mLh))	E	67.5	65.0	65.0	63.3	65.0	Q*
	P	80.0	90.0	90.0	120.0	120.0	-
	RBD	66.7	65.0	60.0	65.0	65.0	Q**
	ACP	85.0	105.0	105.0	125.0	135.0	-
	SO	85.0	130.0	165.0	175.0	225.0	C**
	O	150.0	175.0	180.0	214.2	240.0	C*
Promedio	89.0	105.0	110.8	127.1	141.7		
Productividad Lipolítica (UA/h)	E	1.82	1.76	1.76	1.71	1.76	L*
	P	2.16	2.43	2.43	3.24	3.24	-
	RBD	1.80	1.76	1.62	1.76	1.76	Q**
	ACP	2.30	2.84	2.84	3.38	3.65	-
	SO	2.30	3.51	4.46	4.73	6.08	C**
	O	4.05	4.73	4.86	5.79	6.49	C*
Promedio	2.41	2.84	3.00	3.43	3.83		

¹ x = veces el volumen del inóculo

² Análisis de regresión: ^L Efecto Lineal, ^Q Efecto Cuadrático, ^C Efecto Cúbico, * = (P<0,05) ** = (P<0,01).

Cuadro 34. Ecuaciones de regresión de la respuesta de la lipasa del moho *Aspergillus sp.* TMF2 en función de diferentes concentraciones de cada sustrato.

Descripción		Ecuaciones de regresión	F ^(a)	R ² ^(b)
Actividad Lipolítica ($\mu\text{mol}/(\text{mLh})$)	E			
	P	$Y = 79 - 4.857X + 2.143X^2$	**	0.96
	RBD			
	ACP	$Y = 76 - 0.917X + 2.083X^2$	*	0.99
	SO	$Y = 61.083 + 29.917X$	**	0.99
	O	$Y = 123.167 - 28.413X + 23.185X^2 - 2.569X^3$	*	0.99
Productividad Lipolítica (UA/h)	E	$Y = 2.33 - 0.639X + 0.236X^2 - 0.025X^3$	**	0.71
	P	$Y = 2.334 - 0.151X + 0.065X^2$	**	0.97
	RBD	$Y = 2.33 - 0.639X + 0.236X^2 - 0.025X^3$	**	0.71
	ACP	$Y = 2.246 - 0.035X + 0.063X^2$	*	0.98
	SO	$Y = 1.797 + 0.88X$	**	0.99
	O	$Y = 3.613 - 0.826X + 0.679X^2 - 0.075X^3$	**	0.99

^(a) Significancia de test F: * = P(<0,05), ** = P(0,01).

^(b) Coeficiente de determinación.

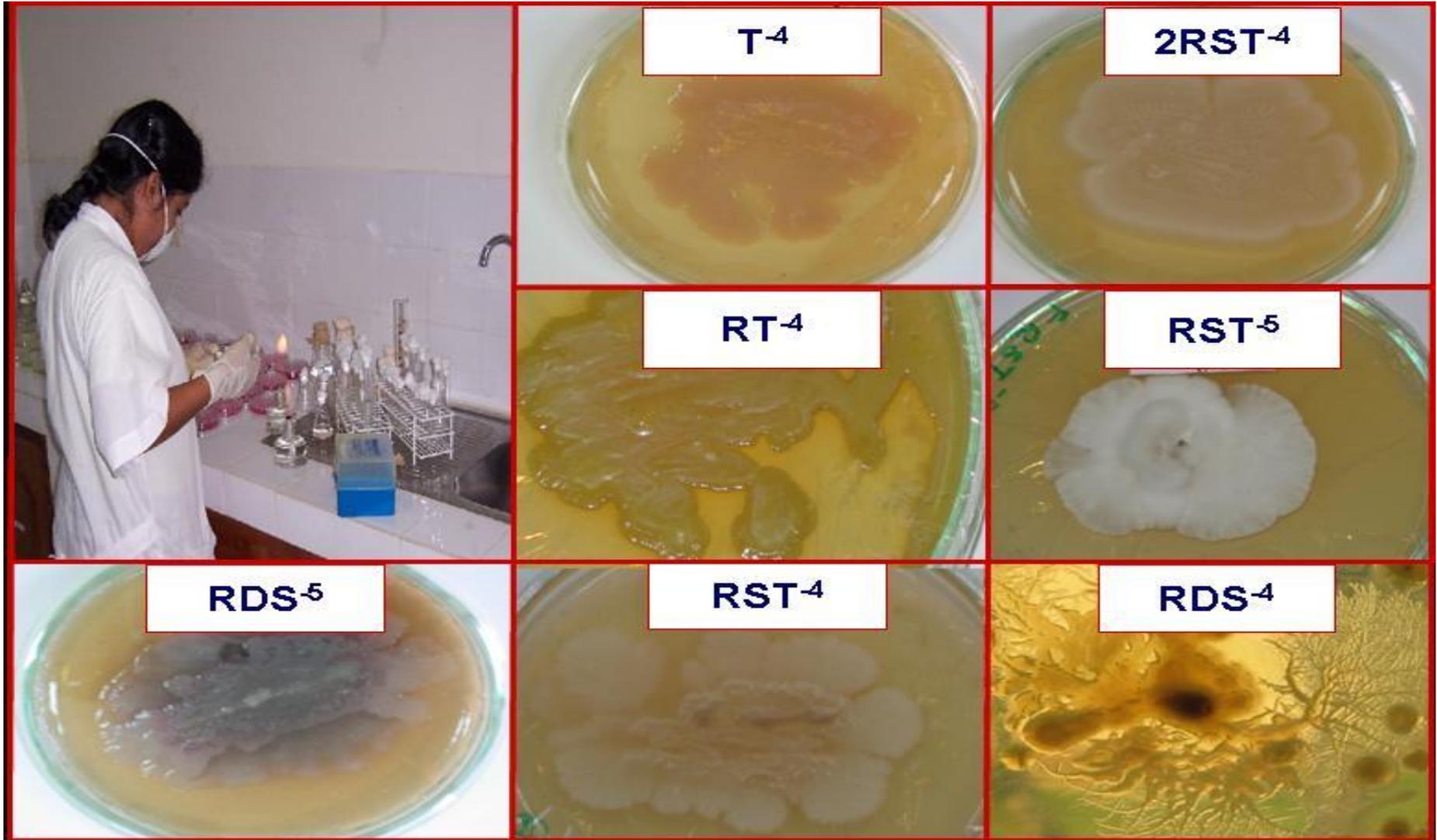
Cuadro 35. Promedios de actividad y productividad lipolítica del moho *Aspergillus sp.* TMF2 frente a diferentes concentraciones de sustratos.

Descripción		Concentraciones de sustrato ¹					Reg ²
		1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	
pH		5.16	5.12	6.08	6.08	6.08	
Actividad Lipolítica ($\mu\text{mol}/(\text{mLh})$)	E	65.0	60.0	65.0	65.0	65.0	
	P	75.0	80.0	85.0	90.0	110.0	Q**
	RBD	65.0	60.0	65.0	65.0	65.0	
	ACP	76.7	82.5	95.0	101.7	125.0	Q*
	SO	85.0	127.5	155.0	176.7	210.0	L**
	O	115.0	140.0	175.0	217.5	239.2	C*
Promedio		80.3	91.7	106.7	119.3	135.7	
Productividad Lipolítica (UA/h)	E	1.91	1.76	1.91	1.91	1.91	C**
	P	2.21	2.30	2.50	2.65	3.24	Q**
	RBD	1.91	1.76	1.91	1.91	1.91	C**
	ACP	2.25	2.43	2.79	2.99	3.68	Q*
	SO	2.50	3.75	4.56	5.20	6.18	L**
	O	3.38	4.12	5.15	6.40	7.03	C**
Promedio		2.36	2.69	3.14	3.51	3.99	

¹ x = veces el volumen del inóculo

² Análisis de regresión: ^L Efecto Lineal, ^Q Efecto Cuadrático, ^C Efecto Cúbico, * = (P<0,05) ** = (P<0,01).

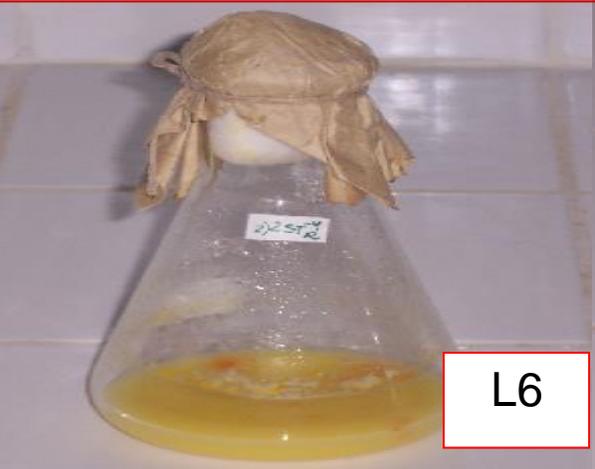
MICROORGANISMOS AISLADOS



MICROORGANISMOS SELECCIONADOS



L11



L6



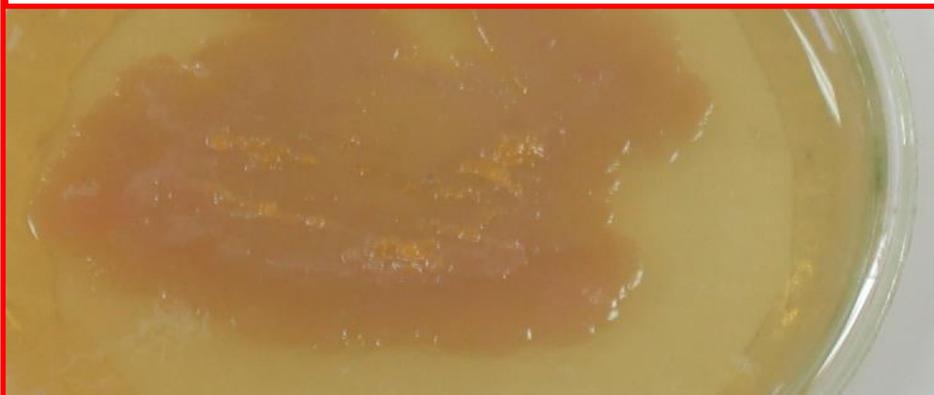
L3



L9

MICROORGANISMOS IDENTIFICADOS

***Candida albicans* TMY11**



***Cryptococcus uchicensis* TMY9**



***Verticillium tingalences* TMF1**



***Aspergillus* sp. TMF2**

