

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA**  
**FACULTAD DE INGENIERÍA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**  
**DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE CIENCIA, TECNOLOGÍA E INGENIERÍA DE ALIMENTOS**



---

**“PRODUCCION DE LIPASAS CONSTITUTIVAS, ADAPTATIVAS E  
INDUCTIVAS CON LA LEVADURA *Cryptococcus uchiensis* TMY9,  
EVALUANDO BIOMASA, ACTIVIDAD Y PRODUCTIVIDAD LIPOLÍTICA”**

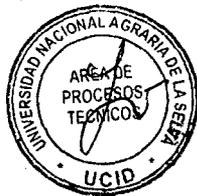
---

**Tesis**  
**Para optar el título de:**  
**INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**

**Presentado por:**  
**GIANNI HEDRICK MARQUEZ POVES**

**PROMOCIÓN 2008 – I**

**Tingo María - PERÚ**  
**2011**



Q02

M26

Márquez Poves, Gianni H.

Producción de Lipasas Constitutivas, Adaptativas e Inductivas con la Levadura *Cryptococcus uchiensis* TMY9, Evaluando Biomasa, Actividad y Productividad Lipolítica. Tingo María, 2011

62 h.; 5 cuadros; 16 fgrs.; 56 ref.; 30 cm.

Tesis ( Ing. Industrias Alimentarias ) Universidad Nacional Agraria de la Selva, Tingo María (Perú). Facultad de Ingeniería en Industrias Alimentarias.

**1. CRYPTOCOCCUS UCHICENSIS TMY9 2. PRODUCCION - LIPASAS 3. BIOMASA MICROBIANA 4. ACTIVIDAD LIPOLITICA 5. EALUACION - BIOMASA 6. PERU.**



**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](mailto:fia@unas.edu.pe)

---

**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS**

Los Miembros del Jurado que suscriben, reunidos en acto público el 30 de Noviembre de 2011, a horas 6:00 p.m. en la Sala de Grados 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 el Bach. **MÁRQUEZ POVES, Gianni Hedrick**, titulada:

**“PRODUCCIÓN DE LIPASAS CONSTITUTIVAS, ADAPTATIVAS E INDUCTIVAS CON LEVADURA (*Cryptococcus uchiensis* TMY9), EVALUANDO BIOMASA, ACTIVIDAD Y 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 el Bachiller, 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 51° y 52° del Estatuto Actualizado de la Universidad Nacional Agraria de la Selva.

Tingo María, 30 de Noviembre de 2011

Ing. Mg. Pedro A. Vejarano Jara  
Presidente

  
Dra. Elizabeth Ordoñez Gómez  
Miembro

Ing. Yolanda Ramírez Trujillo  
Miembro

  
Dr. Pedro Peláez Sánchez  
Asesor

## **DEDICATORIA**

A DIOS, por su fidelidad, por ser mi creador, amparo y fortaleza, y por hacer palpable su amor a través de cada uno de los que me rodean.

Con eterna gratitud y profundo amor a mi madre Elizabeth Poves Velasco, porque creyó en mí y porque me sacó adelante, dándome ejemplos dignos de superación y entrega, porque en gran parte gracias a ella, hoy puedo ver alcanzada mi meta, ya que siempre estuvo impulsándome en los momentos más difíciles de mi carrera, y porque el orgullo que siente por mí, fue lo que me hizo ir hasta el final. Va por ti madre, porque admiro tu fortaleza y por lo que has hecho de mí.

A mi hermana Cynthia y abuela Paulina, gracias por haber fomentado en mí el deseo de superación y el anhelo de triunfo en la vida, mil palabras no bastarían para agradecerles su apoyo, su comprensión y sus consejos en los momentos difíciles.

## **AGRADECIMIENTO**

Al Dr. Pedro Pablo Peláez Sánchez, Asesor de esta tesis, por haber calado y plasmado sus conocimientos en mi persona. Excelente profesional, amigo incondicional.

A los docentes de la Facultad de Ingeniería en Industrias Alimentarias de la Universidad Nacional agraria de la Selva, por las enseñanzas talladas en mi persona, quienes sin esperar nada a cambio han sido pilares en mi desarrollo profesional y así formar parte de este logro que me abre puertas inimaginables.

A todas las personas que colaboraron desinteresadamente en la realización del presente trabajo.

## ÍNDICE GENERAL

	<b>Página</b>
I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1 Generalidades .....	3
2.1.1 Levaduras .....	3
2.1.2 Biomasa microbiana .....	4
2.1.3 Lipasas microbianas .....	7
2.1.4 Producción de lipasas microbianas.....	10
2.1.5 Actividad lipolítica .....	10
2.2 Naturaleza metabólica en la producción de enzimas .....	13
2.2.1 Enzimas constitutivas .....	13
2.2.2 Enzimas adaptativas.....	16
2.2.3 Enzimas inducibles .....	16
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
3.1 Lugar de ejecución .....	20
3.2 Material biológico y sustratos .....	20
3.2.1 Material biológico.....	20
3.2.2 Sustratos.....	21
3.3 Materiales, equipos y reactivos .....	21

3.3.1 Materiales de laboratorio .....	21
3.3.2 Equipos de laboratorio .....	22
3.3.3 Reactivos y soluciones .....	23
3.3.4 Métodos de análisis .....	24
3.4 Metodología experimental .....	24
3.4.1 Aspectos sobre la muestra .....	24
3.4.2 Descripción de la metodología de la investigación .....	24
3.4.2.1 Reanimación y acondicionamiento de la levadura al sustrato ....	25
3.4.2.2 Fermentación .....	26
3.4.2.3 Producción de lipasas constitutivas .....	31
3.4.2.4 Producción de lipasas adaptativas.....	31
3.4.2.5 Producción de lipasas inductivas.....	32
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	34
4.1 De la producción de lipasas constitutivas.....	34
4.2 De la producción de lipasas adaptativas .....	37
4.3 De la producción de lipasas inductivas.....	43
V. CONCLUSIONES.....	51
VI. RECOMENDACIONES.....	52
ABSTRACT.....	53
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	54
ANEXO .....	62

## ÍNDICE DE CUADROS

	<b>Página</b>
1.Temperatura y pH óptimo de algunas lipasas producidas por levaduras.....	9
2.Actividad lipolítica de 14 microorganismos frente al aceite de oliva y tributirina.....	14
3.Actividad lipolítica ( $\mu\text{mol}$ de ácido/mL) medido en los caldos de cultivos de los microorganismos utilizando distintos inductores .....	15
4.Actividad lipolítica ( $\mu\text{mol}$ de ácido/mL) medido en los caldos de cultivos de los microorganismos usados para el estudio de inducción.....	17
5.Medios empleados para evaluar la Naturaleza Metabólica.....	27

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
1.Separación de las grasas en monoglicéridos y ácidos grasos.....	8
2.Flujograma para la evaluación de la biomasa, actividad y productividad lipolítica.....	30
3.Diagrama experimental para determinar la producción de lipasas adaptativas	32
4.Diagrama experimental para determinar la producción de enzimas inductivas	33
5.Biomasa de levadura <i>Cryptococcus uchiensis</i> TMY9 cultivada con 2% de ácido esteárico.....	35
6.Actividad lipolítica de la levadura <i>Cryptococcus uchiensis</i> TMY9 cultivada con 2 % de ácido esteárico.....	36
7.Productividad lipolítica de la levadura <i>Cryptococcus uchiensis</i> TMY9 cultivada con 2 % de ácido esteárico.....	37
8.Actividad lipolítica de la levadura <i>Cryptococcus uchiensis</i> TMY9, cultivada en oleína de palma, aceite soya y aceite de girasol al 2% .....	39
9.Actividad lipolítica de la producción de lipasas adaptativas a tiempo medio de cultivo (prueba de Tukey, $\alpha = 0.01$ ) .....	40

10.Productividad lipolítica de la levadura <i>Cryptococcus uchiensis</i> TMY9, cultivada en aceite de girasol, soya y oleína de palma al 2% .....	41
11.Productividad lipolítica de lipasas adaptativas evaluadas a tiempo medio de cultivo (prueba de Tukey, $\alpha = 0.01$ ) .....	42
12.Variación de biomasa de <i>Cryptococcus uchiensis</i> TMY9, cultivada en oleína de palma, ácido esteárico, aceite de girasol y aceite soya .....	44
13.Variación de la actividad lipolítica de <i>Cryptococcus uchiensis</i> TMY9 frente a oleína de palma cultivada en oleína de palma, ácido esteárico, aceite de girasol y aceite de soya .....	45
14.Actividad lipolítica de enzimas inductivas a tiempo medio de cultivo (prueba de Tukey, $\alpha = 0.01$ ).....	46
15.Variación de la productividad lipolítica de <i>Cryptococcus uchiensis</i> TMY9, cultivada en oleína de palma, ácido esteárico, aceite de girasol y aceite de soya .....	48
16.Productividad lipolítica a tiempo medio de cultivo, de enzimas inductivas...	49

## RESUMEN

Se investigó la naturaleza metabólica de las lipasas producidas por la levadura *Cryptococcus uchiensis* TMY9 (LCU), empleando diversas condiciones de desarrollo determinándose la capacidad de producción de lipasas constitutivas, adaptativas e inductivas. Se demostró la presencia de enzimas constitutivas en la LCU, al ser cultivada con ácido esteárico, obteniéndose una actividad lipolítica (AL) frente a la oleína de palma de 50  $\mu\text{mol/mL.h}$  y una productividad lipolítica (PL) de  $1,47 \times 10^{-3} \mu\text{mol/cell.mL.h}$  a las 6 horas de cultivo. Se produjo enzimas adaptativas, habiendo obtenido la LCU, ALs a tiempo medio de cultivo, de 62,5  $\mu\text{mol/mL.h}$ , 57,5  $\mu\text{mol/mL.h}$  y 88,0  $\mu\text{mol/mL.h}$  al ser cultivada empleando los inductores aceites de soya, oleína de palma y girasol respectivamente. Las enzimas inducibles que produjo la LCU, al emplearse los inductores aceite de girasol y oleína de palma al 3%, dio ALs de 143,33  $\mu\text{mol/mL.h}$  y 137,50  $\mu\text{mol/mL.h}$  respectivamente. Determinándose PLs de  $4,74 \times 10^{-4} \mu\text{mol/cell.mL.h}$  y  $4,05 \times 10^{-4} \mu\text{mol/cell.mL.h}$ , al emplear ácido esteárico y aceite de soya a la concentración de 2 %.

## I. INTRODUCCION

Esta línea de investigación se centra en la búsqueda de nuevas fuentes de lipasas microbianas y en la optimización de la producción de las mismas, con vistas a su uso como biocatalizadores industriales. Las lipasas son enzimas muy versátiles, capaces de catalizar, dadas las condiciones adecuadas, tanto reacciones de hidrólisis como de síntesis; el amplio rango de aplicaciones potenciales ha provocado un gran esfuerzo investigador en este campo durante los últimos años, sin embargo, uno de los mayores inconvenientes encontrados en su uso extensivo es la baja estabilidad térmica de muchas de las lipasas disponibles en la actualidad.

Existe una gran diversidad de microorganismos en la Amazonía, los cuales se presentan como potenciales productores de enzimas lipolíticas, sin embargo, estos aún no han sido estudiados; es necesario entonces aprovechar la biodiversidad que presenta la zona del Alto Huallaga, la cual cuenta sin duda con la presencia de microorganismos que producen lipasas como la levadura *Cryptococcus uchicensis* TMY9, levadura que puede estar descrita pero no es utilizada en la producción enzimática, requiriéndose para ello conocer la naturaleza metabólica de las lipasas que produce.

Con estas consideraciones se planteó realizar el estudio de la naturaleza metabólica de las lipasas producidas por la levadura *Cryptococcus*

*uchicensis*TMY9 empleando diversas condiciones de desarrollo para determinar la capacidad de producción de lipasas constitutivas, adaptativas o inductivas.

Para demostrar esto se evaluó en cada tratamiento, la actividad y productividad lipolítica de las lipasas producidas por la levadura *Cryptococcus uchicensis*TMY9, frente a oleína de palma, estableciéndose los siguientes objetivos para el presente estudio:

- Determinar la capacidad de producción de lipasas constitutivas de la levadura *Cryptococcus uchicensis*TMY9, empleando como sustrato ácido esteárico.
- Determinar la capacidad de producción de lipasas adaptativas de la levadura *Cryptococcus uchicensis*TMY9, empleando como sustratos oleína de palma, aceite de girasol y aceite de soya.
- Determinar la capacidad de producción de lipasas inductivas de la levadura *Cryptococcus uchicensis*TMY9, empleando como sustrato oleína de palma, aceite de girasol, aceite de soya y ácido esteárico.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. Generalidades

#### 2.1.1. Levaduras

Se puede considerar que las levaduras son hongos unicelulares, en contra posición a los mohos que son multicelulares; ésta no es una definición exacta, ya que algunas de las consideradas habitualmente levaduras producen micelios en cantidades variables. Las levaduras pueden ser diferenciadas de las bacterias por el mayor tamaño de sus células y por la forma ovalada, alargada, elíptica o esférica de las mismas. Las células típicas de las levaduras tienen un diámetro que oscila entre 5 y 8 micrómetros, siendo algunas de mayor tamaño. Las levaduras producen algunos pigmentos cuyo color varia del cremoso al rojo pasando por el rosa (JAY, 1994).

En todos ellos, la estructura celular de tipo eucariota se presenta envuelta por una pared celular rígida, formada en un 80 – 90% por polisacáridos como quitina, glucanos, mananos o celulosa y pueden utilizar un gran número de fuentes de carbono, debido a su capacidad de producir diferentes tipos de exoenzimas (GÓDIA *et al.*, 1998).

Algunas especies tienen un hábitat muy restringido, son mesófilas, unas pocas (2%) son psicrófilas, se desarrollan por debajo de 24 °C. No hay levaduras que puedan crecer a 50 °C y unas pocas pueden desarrollar cerca

de 0 °C. La presencia de etanol o bicarbonato aumenta la temperatura mínima de crecimiento, la mayoría crece a una actividad de agua mínima de 0,90 - 0,95. Otras pueden crecer sobre sustratos azucarados a una actividad de 0,62, pero son pocas las levaduras que se desarrollan en presencia de altas concentraciones de azúcar o sal. La mayoría de las levaduras toleran un rango de pH entre 3 y 10, pero prefieren un medio ligeramente ácido con un pH de 4,5 a 6,5, también pueden crecer a 1,3 - 1,7 si el acidulante es un ácido inorgánico y algunas son especialmente tolerantes a los medios alcalinos, mientras que otras no crecen a pH mayor que 8. Por otra parte, las células son inactivadas a presiones entre 7 y 20 MPa, a 25 – 35 °C (DÉAK y BEUCHAT, 1996); el pH en las fermentaciones de levaduras se mantiene a valores de 3,5 hasta 5,0 y esto es útil para reducir el riesgo de contaminación bacteriana; las células de levaduras pueden ser recuperadas fácilmente a partir del medio agotado por centrifugación continua (BU'LOCK y BJORN, 1991).

La reproducción de las levaduras es normalmente asexual, a través de la gemación en la superficie, pero la reproducción sexual también se puede dar en determinadas condiciones (GÓDIA *et al.*, 1998). En el caso de las levaduras y otros microorganismos, se presenta una variante que es la gemación o botón (ARIAS y LASTRA, 1997).

### **2.1.2. Biomasa microbiana**

La biomasa es la abreviatura de masa biológica, cantidad de materia viva de un organismo, población o ecosistema, producida en un medio orgánico por organismos de un tipo específico, también se suele incluir a los

metabolitos y productos formados en la reacción. Se suele definir el crecimiento de cualquier sistema biológico como el incremento ordenado de todos los elementos componentes de ese sistema, lo cual implica un aumento de la masa celular que eventualmente conduce a la multiplicación celular (BECKER *et al.*, 1999).

La medición del crecimiento microbiano está dada por el cálculo del número de células que existen en una suspensión, masa celular (turbidimetría) o actividad celular (grado de actividad bioquímica con relación al tamaño de la población) (ARIAS y LASTRA, 1997). Los cuales puede evaluarse por espectrofotometría; donde el número de fotones dispersado es proporcional a la masa celular de la muestra; es importante señalar que la absorbancia es una medida de masa celular más que de número celular. El tamaño de la célula varía con la fase de crecimiento, de modo que es mejor calibrar el espectrofotómetro con células en crecimiento exponencial. El tamaño celular también depende del medio de cultivo, de modo que ha de hacerse una curva de calibración para cada medio y para cada cepa. Si la densidad celular es demasiado alta, puede darnos una lectura errónea, así cuando se va determinar la concentración de un cultivo denso, debe diluirse antes de medirlo y después el valor obtenido se corrige con el factor de dilución. Se puede emplear longitudes de onda distintas a 600 nm para determinar la densidad celular y de hecho, la sensibilidad aumenta según descende la longitud de onda (BECKER *et al.*, 1999).

Un proceso de crecimiento celular se produce a partir del consumo de determinados sustratos, la desaparición de estos sustratos por no haber una

regeneración del medio de cultivo, detienen el crecimiento. Otro proceso que tiene lugar a lo largo del crecimiento es la excreción al medio circundante de los productos finales de su metabolismo que está directamente relacionada con la velocidad de producción de biomasa. La célula tiene además capacidad de adaptarse a cambios en la composición del medio ambiente, además cada célula individual evoluciona dentro de su ciclo de crecimiento, de forma que en el medio se encontraran células con distintas edades, algunas acabadas de nacer, otras en proceso de división y otras al final de su ciclo celular; hay que tener en cuenta que a lo largo de las distintas fases del ciclo celular, las células varían su actividad metabólica (GÓDIA *et al.*, 1998).

El desarrollo microbiano se caracteriza por que presenta diferentes fases, iniciándose con un periodo de retardo o fase lag; luego de ésta el crecimiento ocurre a la máxima rapidez, denominándose a esta como fase de desarrollo logarítmico, luego pasa a la fase de descenso y finalmente cesa, ya sea por un producto inhibitorio o algún cambio en el ambiente fisicoquímico; después de que la biomasa alcanza un máximo, aparece generalmente una fase estacionaria durante la cual la biomasa permanece constante, más adelante ésta disminuye como consecuencia del metabolismo de mantenimiento o por autólisis (QUINTERO, 1993).

Los parámetros más importantes que se deben tomar en cuenta en la fermentación son generalmente temperatura y pH para el óptimo crecimiento del microorganismo productor de enzimas y coincide con las condiciones de máxima producción de la enzima (LÓPEZ, 2001).

### 2.1.3. Lipasas microbianas

Las lipasas (triacilglicerolacylhydrolases CE 3.1.1.3) son una clase de hidrolasas que catalizan la hidrólisis de los triglicéridos a glicerol y ácidos grasos libres en una interfaz aceite-agua. Además, las lipasas catalizan la hidrólisis y transesterificación de otros ésteres, la síntesis de ésteres presentan propiedades enantioselectivas (GRBAVČIĆ et al., 2007).

Las lipasas representan una clase versátil de biocatalizadores con numerosas aplicaciones en la industria incluida en la producción de biodiesel vía transesterificación catalizada por lipasas (YUy LUTZ, 2010).

Las lipasa pertenecen al grupo de hidrolasas, catalizan reacciones que implica la ruptura hidrolítica de enlaces químicos, como C = O, C–N, C–C como se muestra en la Figura 1. Las lipasas (glicerol éster hidrolasas) cortan las grasas (éster de glicerol) en di o monoglicéridos y ácidos grasos (CRUEGER, 1993). Las lipasas (acilglicerolhidrolasas E.C.3.1.1.3) actúan como catalizadores en reacciones lipolíticas (catabolismo de grasas y aceites) a través de la hidrólisis de los enlaces éster de acilgliceroles (HERNAIZ, 1997).

Las lipasas pueden, bajo apropiadas condiciones, promover la formación a través de la reacción de ácidos y alcoholes (esterificación) o de ésteres con ácidos (acidólisis), alcoholes (alcoholisis) u otros ésteres (interesterificación) (GUNSTONE, 1999). Permitiendo la modificación estructural de los lípidos al cambiar en forma selectiva la composición de los triacilgliceroles bajo condiciones de reacción muy suaves y controladas (VALENZUELA y NIETO, 1994). La producción se reprime por la presencia en el medio de mono y disacáridos así como de glicerol (GARCÍA *et al*, 1999). La

gran significación es la especificidad que muestran las enzimas, lo cual permite la formación de lípidos derivados no fácilmente producidos por procedimientos convencionales de laboratorio (GUNSTONE, 1999). Las lipasas son ampliamente usadas por su disponibilidad inmediata, bajo costo de producción y enorme utilidad en síntesis orgánica; existen lipasas comerciales de diferentes fuentes microbianas, cada una de estas lipasas poseen distinta especificidad de sustrato, regioselectividad y ésteroselectividad, siendo una de sus aplicaciones la síntesis de lípidos estructurados (GÓDIA *et al.*, 1998). Sin embargo, el interés en el estudio de las lipasas se ha incrementado recientemente a causa de su capacidad de trabajar en disolventes orgánicos, realizando reacciones de síntesis entre alcoholes y ácidos y produciendo ésteres, además de llevar a cabo transésterificaciones e interésterificaciones (PROYECTO LIPASA, 1997 y ESPAÑA, 2002).

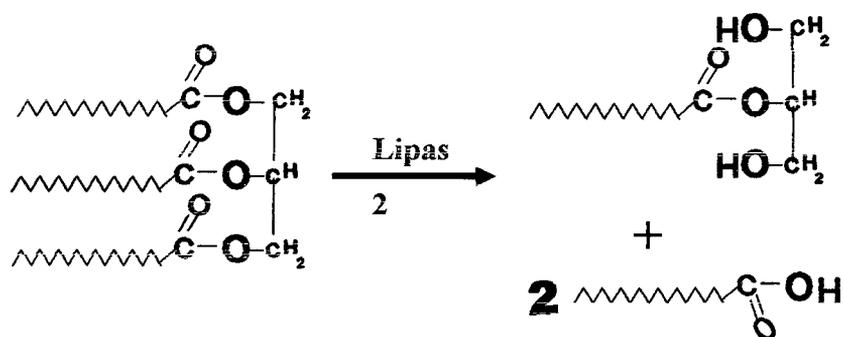


Figura 1. Separación de las grasas en monoglicéridos y ácidos grasos.

Fuente: CRUEGER (1993).

De todas formas las reacciones más importantes en las cuales las lipasas están implicadas son reacciones quirales, debido a la posibilidad de resolver mezclas racémicas. Esto es de una importancia esencial en

reacciones de química fina, debido a la necesidad en este campo de producir productos enantioméricamente puros, especialmente en el campo farmacéutico (PROYECTO LIPASA, 1997 y ESPAÑA, 2002).

Las lipasas reaccionan en sistemas heterogéneos, tales como las emulsiones de glicéridos en medio acuoso, su acción ocurre en la interfase (BERK, 1980). La mayoría de las lipasas trabajan a temperatura entre 30 a 40 °C; pero algunas son activas a temperaturas tan bajas como - 29 °C y presentan su pH óptimo entre 8 y 9 (Cuadro 1), también se ha reportado lipasas con pH óptimo en el rango ácido (LÓPEZ, 2001).

Cuadro 1. Temperatura y pH óptimo de algunas lipasas producidas por levaduras.

Microorganismos	pH óptimo	T° óptima (°C)
<i>Penicilliumchrysogenum</i>	6,2 – 6,8	37
<i>Pseudomonasfragi</i>	7,0 – 7,2	32
<i>Rhizopusdilemar</i>	5,6	35
<i>Aspergillusníger</i>	5,6	35
<i>Penicilliumroqueforti</i>	8,0	37
<i>Staphylococcus aureus</i>	8,5	45
<i>Geotrichumcandidum</i>	8,2	37
<i>Achromobacterlipolyticum</i>	7,0	37

Fuente: CRUEGER (1993).

#### **2.1.4. Producción de lipasas microbianas**

Las lipasas microbianas comerciales son principalmente producidos a partir de *Pseudomonas*, *Mucor*, *Geothricum*, *Rhizopus* y *Candidasp.*(GRBAVČIĆ *et al.*, 2007).

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 = Microorganismos + CO<sub>2</sub> + productos (intra y extracelular)

Producidas por fermentación en cultivos sumergidos, con diferentes procesos entre los que se incluyen batch, fed-batch y procesos en continuo; la fermentación puede ser aeróbica y anaeróbica.

CÁRDENAS (1999) y COCA (2001) mencionan que en 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.

#### **2.1.5. Actividad lipolítica**

Las reacciones catalizadas por enzimas pueden evaluarse espectrofotométricamente, ya que mucho de los sustratos o productos de las enzimas absorben la luz visible o no visible. Ésta es la forma más sencilla y

común de analizar enzimas y consiste en obtener curvas completas mediante control directo y continuo de la reacción (WISEMAN 1991).

La actividad lipasica viene definida como la capacidad que tienen las enzimas de hidrolizar los enlaces éster de los triglicéridos en la interfase formada entre el sustratoemulsificado insoluble y el medio acuoso en que está disuelta la enzima (CARDENAS, 1 999 y CÁRDENAS *et al.*, 2 000).

Un gran problema para los enzimólogos es cuantificar la actividad o concentración de una enzima, la única manera para detectar la actividad enzimática es evaluando lo que hace sobre su sustrato específico. Por lo tanto, la única forma de medición de la actividad o cantidad de una enzima, es por determinaciones en los cambios en su sustrato bajo condiciones controladas (FURIA, 1972).

La actividad de una enzima depende de condiciones tales como temperatura, pH y concentración; por ello es necesario especificarlas y usar las mismas condiciones para comparar actividades (GARCÍA *et al.*, 1999). La temperatura óptima para la mayoría de las reacciones enzimáticas se encuentra, con pocas excepciones, entre 30 a 40 °C donde la actividad enzimática es máxima; la actividad enzimática guarda también relación con el estado iónico de la molécula y especialmente, de la parte proteica, puesto que las cadenas polipeptídicas contienen grupos que pueden ionizarse (principalmente grupos carboxílicos y aminos de los aminoácidos constituyentes) en un grado que depende del pH existente (SCHMIDT y PENNACHIOTTI, 1982). Por otro lado cabe indicar que el pH óptimo de las

lipasas esta entre 8 y 9, disminuyendo su actividad con el descenso del pH (BENITES, 2 001).

Hay numerosas formas de expresar los resultados de los ensayos enzimáticos. La comisión sobre enzimas ha definido una unidad internacional de la actividad enzimática, el Katal; cantidad de enzima que transforma un mol de sustrato por segundo bajo condiciones experimentales estándar (SCRIBAN, 1985).

La potencia o actividad de una enzima no puede medirse en términos de su concentración, ya que puede estar en forma desnaturalizada y sin funcionalidad por esta razón se emplea la unidad internacional de actividad enzimática, definida como la cantidad de enzima que se requiere para transformar un micromol de sustrato por minuto (BADUI, 1994).

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* fue 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 *et al.*, 2 001). En el estudio "Novel microbiallipases: 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 2) y la actividad lipolítica de cuatro microorganismos en medios con diferentes inductores (Cuadro 3) 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 (SINISTERRA y SÁNCHEZ – MONTERO, 2001; CÁRDENAS, 1999 y CÁRDENAS *et al.*, 2000).

## **2.2. Naturaleza metabólica en la producción de enzimas**

### **2.2.1. Enzimas constitutivas**

Las enzimas constitutivas son las que se forman a velocidades constantes y en cantidades también constantes, independientemente de cual sea el estado metabólico del organismo. Se consideraba a los enzimas constitutivos como una parte de la maquinaria básica y permanente de la célula (LEHNINGER, 1979).

El grupo de enzimas cuya biosíntesis no es controlada debido a su necesidad, son las enzimas constitutivas las cuales están siempre presentes en la célula (se sintetizan siempre) en cantidades casi constantes independientemente del estado metabólico de la misma. Se necesitan siempre porque catalizan sobre todo reacciones de obtención de energía o de obtención de carbono (PLUMMER, 1958; BU'LOCK y BJORN, 1 991; GÓDIA *et al.*, 1 998 y HERNÁNDEZ, 2 004).

Cuadro 2. Actividad lipolítica de 14 microorganismos frente al aceite de oliva y tributirina.

Cepas productoras	Actividad lipolítica (UI/mL)	
	Aceite oliva	Tributirina
<i>A. Murorum</i>	0,72	5,18
<i>M. mucoroides</i>	3,02	4,31
<i>Monascus</i> sp.	2,35	2,37
<i>A. ciferrii</i>	1,43	1,89
<i>Fusarium</i> sp.	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</i> sp.	1,16	2,10

Fuente: CÁRDENAS (1 999).

Cuadro 3. Actividad lipolítica ( $\mu\text{mol}$  de ácido/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
Ácido oleico	60	350	40	80
Ácido miristoleico	NT	450	30	NT
Ácido palmitoleico	50	260	40	40
Ácido laurico	40	260	30	50
Ácido mirístico	30	260	40	50
Ácido palmítico	30	260	50	50
Ácido esteárico	30	270	10	30
Anhídrido oleico	NT	460	30	NT
Alcohol oleyl	380	260	60	150
Cloruro oleoyl	380	290	30	90

NT = No probado

Fuente: CÁRDENAS (1 999).

Dentro de la fisiología celular hay algunos procesos que suceden de forma continua y por ello necesitarán la presencia constante de enzimas constitutivas, de manera que su producción es independiente de las variaciones del medio celular (LACADENA, 2001). Estas enzimas constituyen la mayoría del total (HERNÁNDEZ, 2004).

La producción de enzimas constitutivas no está sometida a inducción o represión, es decir, se producen en igual medida independientes de los factores externos; su nivel de producción no está afectado por la presencia o ausencia de los sustratos o productos específicos en el medio; pero ello no significa que se produce a nivel máximo; los niveles de las enzimas constitutivas pueden afectarse por cambios no específicos en las condiciones (WISEMAN, 1986 y BYRNE, 2003).

### **2.2.2. Enzimas adaptativas**

La biosíntesis de éste grupo de enzimas es controlada, su presencia o ausencia está en relación con el medio, sólo se sintetizan cuando son necesarias, son las que están genéticamente reguladas, se sintetizan sólo como respuestas a la presencia de ciertos sustratos; la producción de éstas enzimas, aumentará o disminuirá según las circunstancias externas de la vida del medio ambiente, de la alimentación y el microorganismo generará más o menos según sea necesario para funcionar adecuadamente; existiendo dos tipos de enzimas adaptativas: represibles e inducibles (HERNÁNDEZ, 2004).

### **2.2.3. Enzimas inducibles**

Un enzima inducible se encuentra normalmente tan solo en pequeñas cantidades en una determinada especie, pero su concentración puede elevarse rápidamente hasta mil veces o más cuando se halla en presencia de su sustrato, particularmente cuando dicho sustrato es la única

fuerza de carbono de la célula; los enzimas inducibles se forman solamente cuando se necesitan (LEHNINGER, 1979).

Cuadro 4. Actividad lipolítica ( $\mu\text{mol}$  de ácido/mL) medido en los caldos de cultivos de los microorganismos usados para el estudio de inducción.

Inductor	<i>B.</i> <i>linens</i>	<i>R.</i> <i>araucariae</i>	<i>F.</i> <i>oxysporum</i>	<i>P.</i> <i>chrysogenum</i>	<i>A.</i> <i>ciferri</i>	<i>S.</i> <i>fradiae</i>
Aceite de oliva	30	50	450	80	50	57
Ácido oleico	230	60	350	40	80	63
Ácido miristoleico	50	NT	450	30	NT	NT
Ácido palmitoleico	90	50	260	40	40	38
Ácido laurico	60	40	260	30	50	50
Ácido mirístico	80	30	260	40	50	38
Ácido palmítico	50	30	260	50	50	38
Ácido esteárico	50	30	270	10	30	13
Anhídrido oleico	190	NT	460	30	NT	NT
Alcohololeyl	90	380	260	60	150	38
Clorurooleoyl	80	380	290	30	90	NT
Ácido Lauricooleoyl						
éster	40	30	260	20	60	63
Ácido oleico laurel						
éster	NT	50	260	40	30	NT

NT = No probado

Fuente: SÁNCHEZ – MONTERO (2001).

Este fenómeno ocurre particularmente con enzimas degradativas, que no se producen a menos que el inductor apropiado se encuentre presente en el medio (WISEMAN, 1986). Estas enzimas son sintetizadas rápidamente y en mayor cantidad como respuesta a la presencia de sustrato en el medio (PLUMMER, 1958). La mayor parte de las enzimas comerciales son inducibles, es decir, requieren de una sustancia, generalmente el sustrato de la enzima, como inductor; este permite la síntesis de la enzima al unirse con el represor que bloquea al gen operador impidiendo su transcripción. Cabe señalar que existen inductores gratuitos, sustancias análogas o de estructura similar al sustrato o al producto, que pueden fingir como inductores. La concentración del inductor debe mantenerse baja, para evitar la represión catabólica (GARCÍA *et al.*, 1999; LACADENA, 2001).

Existe un represor que normalmente está activo y por lo tanto, se une al operador e inhibe la transcripción. El efector (en este caso inductor) se une al represor y lo inactiva evitando la represión del gen responsable de la síntesis de la enzima (HERNÁNDEZ, 2004).

En algunos casos, la regulación se ejerce como una inducción de la producción de enzimas como respuesta a la presencia de un inductor, que muchas veces es el mismo sustrato. En otros casos, la inducción enzimática se controla de forma inversa por el represor, es decir, la proteína represora es activa en ausencia del inductor, bloqueando la síntesis del mRNA. Cuando se añade el inductor, se combina con la proteína represora y la inactiva, liberando así la síntesis del mRNA (GÓDIA *et al.*, 1998); recíprocamente, las enzimas pueden desaparecer cuando ya no son necesarias, es decir cuando un

compuesto que necesita la célula existe gratuitamente para satisfacer las necesidades de la célula, esto se denomina represión; cuando el abastecimiento gratuito del compuesto ha terminado, las enzimas para la síntesis del material reaparecen (BU'LOCK y BJORN, 1991).

Se pueden usar una serie de ácidos grasos y derivados de ácidos grasos incluyendo ácidos saturados e insaturados, alcoholes y esterés, como inductores de lipasas de diversos microorganismos. En el siguiente cuadro se aprecia el efecto de diversos inductores, los cuales fueron usados en un 0,5 % de concentración final. En este cuadro se reporta la actividad de las lipasas usando trioleína como sustrato en diferentes medios de inducción.

Las lipasas de estos 06 microorganismos son mejor inducidas por ácido oleico y sus derivados particularmente por el anhídrido oleico. Los ácidos grasos saturados desligan valores de inducción inferior a los valores de los ácidos grasos insaturados (SÁNCHEZ – MONTERO, 2001).

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Lugar de ejecución

El trabajo de investigación se ejecutó en los laboratorios de Centro de Investigación para el Desarrollo Biotecnológico de la Amazonía (CIDBAM) y Análisis de Alimentos; ubicados en el campus universitario de la Universidad Nacional Agraria de la Selva (avenida universitaria s/n) en la ciudad de Tingo María a 1,5 Km. de la carretera central Tingo María – Huánuco. Situada a 660 m.s.n.m, con una humedad relativa de 80% y a una temperatura promedio de  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$  respectivamente.

La taxonomía de la levadura *Cryptococcus uchicensis* TMY9 se determinó en Universidad de Valencia, Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), con el apoyo del Grupo de Biotransformaciones de la Universidad Complutense de Madrid, España.

#### 3.2. Material biológico y sustratos

##### 3.2.1. Material biológico

Cepa de *Cryptococcus uchicensis* TMY9 obtenida después de realizar un screening taxonómico del banco de cepas del Centro de Investigación para el Desarrollo Biotecnológico de la Amazonía (CIDBAM).

### 3.2.2. Sustratos

- Oleína de palma - Palmerola (Industrias del Espino S.A.) Perú.
- Aceite de Soya - Liza (Cargill Agrícola S.A.) Perú.
- Aceite de Girasol - Ideal (Ameral S.A.A.) Brazil.
- Ácido Esteárico - Loba CHEMIE India.

### 3.3. Materiales, equipos y reactivos

#### 3.3.1. Materiales de laboratorio

- Vasos de precipitación de vidrio 50, 250, 500 y 1000 mL Pyrex USA.
- Pipetas de vidrio de 1, 2, 5 y 10 mL Kimax USA.
- Pipeta de vidrio con embolo de 10 mL Pyrex USA.
- Placas petri de 100 x 15 y 80 x 15 Pyrex USA.
- Matraces de vidrio de 50, 100, 250, 500 y 1000 mL Kimax USA, Schott Duran Germany.
- Probetas de vidrio de 50, 100, 250 y 500 mL Brand Germany.
- Fiolas de vidrio de 500 y 1000 mL Schott Duran Germany.
- Bureta graduada de vidrio semiautomática para titulación de 50 mL Brand Germany.
- Tubos de Ensayo de vidrio con tapa de 10 mL Schott Duran Germany.
- Mecheros de vidrio con alcohol.
- Frascos de vidrio color ámbar de 100 mL.
- Cubetas de polietileno para espectrofotómetro Brand, Germany.
- Recipiente de plástico de 4 L Duraplast, Perú.
- Asa de siembra.

- Picetas; goteros de plástico.
- Lentes protectores de mica.
- Espátula de acero inoxidable.
- Escobilla para lavar materiales.
- Guantes quirúrgicos.
- Algodón.

### **3.3.2. Equipos de laboratorio**

- Agitador orbital de bandeja Barnstead internacional lab-line, Modelo Max<sup>Q</sup> 2000, 220 - 240 V, 0,4 A, 45 w, 50/60 Hz, 500 rpm USA.
- Agitador para matraces GFL Type 3005, 230 V, 0,18 A, 0,04 KwGermany.
- EspectrofotómetroThermospectronic GENESYS 8, 100 – 240 V.Inglaterra.
- Estufa con aire forzado Tomos ODHG – 9240, 220 - 240 v, 1300 w, 100 °C, USA.
- AutoclaveNapcomodel – 9000 D, 32 psi, 130 °C, 230 V, 6,3 A, 1430 w, USA.
- Incubadora Labor MuszeripariMuver LP – 111, 220 V, 0,19 Kw, Húngara.
- Balanza electrónica analítica dp digital precisión, 220-240 V, sensibilidad 0,0001g Germany.

### **3.3.3. Reactivos y soluciones**

- Fosfato de potasiodibásico  $K_2HPO_4$  Merck Germany.
- Fosfato de potasimonobásico  $KH_2PO_4$  Merck Germany.

- Cloruro de potasio KCl Scharlau Chemie S.A. España.
- Cloruro de calciodihidratado  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  Merck Germany.
- Sulfato de magnesioheptahidratado  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  Merck Germany.
- Sulfato de hierroheptahidratado  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  LOBA CHEMIE India.
- Nitrato de sodio  $\text{NaNO}_3$  Merck Germany.
- Extracto de levadura granulado Merck Germany.
- Extracto de carne seco granulado Merck Germany.
- Cloruro de sodio NaCl, Merck Germany.
- Agar–Agar granulado Merck Germany.
- Pectona de carne obtenida por digestión pancreática granulado Merck Germany.
- Hidróxido de sodio en lentejas Merck Germany.
- Ácido clorhídrico fumante Hcl 37 % Merck Germany.
- Buffer fosfato 0,1 M pH 7.
- Agua destilada.
- Alcohol medicinal al 96%.
- Goma arábica 10% P/V Spectrum ChemicalMfg. Corp.
- Fenolftaleina al 1% Riedel – de Haën.

#### **3.3.4. Métodos de Análisis**

Durante la fermentación se realizaron los siguientes análisis:

- pH, método 11.032 (AOAC, 1997).
- Cuantificación de biomasa, se realizó por el método de turbidimetría para levaduras (SCRIBAN, 1985; TORTORA, 1993).

- La actividad lipásica, utilizando los distintos sustratos y valorando la cantidad de ácido liberado en función del tiempo (CÁRDENAS *et al.* 2001).
- Determinación de la productividad lipolítica (CARDENAS *et al.*, 2001)

### **3.4. Metodología experimental**

#### **3.4.1. Aspectos sobre la muestra**

La levadura *Cryptococcus uchicensis* TMY9 fue obtenida a través de un screening ecológico realizado en los diversos ambientes de la industria aceitera Palmas e Industrias del Espino, Santa Lucía – San Martín (NAKAYAMA, 1981) e identificada en los laboratorios de la Universidad de Valencia mediante el servicio que brinda la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) utilizando el sistema de API, siendo el ensayo de escualeno claro para diferenciar el tipo de microorganismo, clasificada seguidamente a través de un screening taxonómico para su estudio en la presente tesis.

#### **3.4.2. Descripción de la metodología de investigación**

La levadura *Cryptococcus uchicensis* TMY9 fue sembrada en medios sólidos y líquidos con emulsiones de aceite y ácido esteárico según el estudio del tipo de metabolismo de producción de lipasas, e incubados por 48 horas a 30°C (SZTAJER, 1988). Los pasos para la determinación de la naturaleza metabólica fueron:

### **3.4.2.1 Reanimación y acondicionamiento de la levadura al sustrato**

**Reanimación Fase 1:** De las placas del Banco de Cepas del CIDBAM se procedió a una resiembra de la levadura, tomándose con un asa de siembra en un radio de trabajo estéril, una porción de la colonia y sembrándose por estrías (TORTORA, 1993) en placas con medio BYPO con agar (Cuadro 5), a fin de adaptarlas al medio (CARDENAS, 1999), la incubación se realizó en placas en posición invertida a 30°C promedio por 48 horas (JAWETZ *et al.*, 1983).

**Fase 2:** Pasada las 48 horas de la fase anterior, la levadura fue sembrada por estrías en placas petri con medio BYPO con agar y emulsiones de aceite o ácido esteárico (el tipo de aceite y la concentración estuvo en función del estudio del metabolismo) (CRUEGER, 1993), a fin de adaptarlas al medio, la incubación se realizó en placas en posición invertida a 30°C promedio por 48 horas (JAWETZ *et al.*, 1983).

**Fase 3:** Pasada las 48 horas de la fase anterior la levadura fue sembrada por puntura en matraces de 250mL con 50mL de medio BYPO líquido y emulsiones o ácido esteárico (el tipo de aceite y la concentración estuvo en función del estudio del metabolismo) (SZTAJER *et al.*, 1988), y puestos en un agitador orbital a 150 rpm a temperatura de 30°C por 48 horas; para determinar la facilidad de crecimiento de la levadura sin adherencia de agar.

**Fase 4:** Pasada las 48 horas de la fase anterior la levadura fue sembrada en 50 ml de medio mínimo conteniendo emulsiones o ácido esteárico

(el tipo de aceite y la concentración estuvo en función del estudio del metabolismo), utilizando un inóculo del 10% del volumen del medio; empleándose matraces de 250 mL (SÁNCHEZ *et al.*, 1999); luego se puso en agitación orbital a 150 rpm a temperatura de 30°C por 48 horas; para que la levadura en estudio produzca lipasas. Los medios sólidos y líquidos que se emplearán en el acondicionamiento se detallan en el Cuadro 5.

#### **3.4.2.2 Fermentación**

Terminada la etapa de acondicionamiento fue sembrado el cultivo de la levadura *Cryptococcus uchiensis* TMY9, se utilizó una cantidad de 10% del volumen del medio de trabajo, lo que constituyó el inóculo de siembra para los biorreactores (CRUEGER, 1993); en matraces de 250 mL se preparó 50 mL de medio mínimo descrito en el Cuadro 5, adicionando aceite o ácido esteárico (el tipo de aceite y la concentración estuvo en función del estudio del metabolismo) como sustrato para la producción de lipasas (CÁRDENAS, 1999; FRENKEN *et al.*, 1992), se incubó a temperatura de 30°C y en ambiente acondicionado para procesos biotecnológicos (SCRIBAN, 1985 y QUINTEROS, 1993); con el sustrato (inductor y fuente de carbono) de acuerdo al porcentaje de trabajo.

Cuadro 5. Medios empleados para evaluar la naturaleza metabólica (1 L).

Medio	Selecciona	Componente (para 1 L)
Sólido:		
• BYPO sin inductor	Colonias puras	- Peptona, 10 g. - Extracto de levadura, 3 g. - Extracto de carne, 5 g. - NaCl, 5 g. - K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 7 g. - Agar-Agar, 15 g.
• BYPO con inductor (aceite).	Microorganismos productores de lipasas	- Ídem. Inciso anterior. - Aceite, 25 ml.
Líquido:		
• BYPO con inductor.	Microorganismos productores de lipasas	- Ídem. BYPO sólido con inductor (aceite) excepto agar.
Mínimo con inductor.	Hongos productores de lipasas	- NH <sub>4</sub> Cl 1 g - KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1 g. - K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2 g. - KCl, 0.1 g - Mg SO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O, 0.5 g. - CaCl <sub>2</sub> , 0.01 g - FeSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O, 0.012 g. - Extracto de levadura 1g. - Aceite, 20 ml.

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

Las evaluaciones se realizaron cada tres horas para determinar la biomasa, actividad lipolítica y velocidad de producción de lipasa de acuerdo al análisis realizado de adaptación, constitución e inducción; seguidamente fueron colocados en agitación constante a 150 rpm por un lapso de 48 horas.

**Biomasa:** Se cuantificó la biomasa de la levadura por la técnica de turbidimetría, las mediciones de la densidad óptica fue a 660 nm cada 3 horas en el espectrofotómetro UV-VIS, diluyéndose el caldo de cultivo en agua destilada estéril para que las lecturas de absorbancia sea igual o menor a 0,600 según la metodología propuesto por (SCRIBAN, 1985; TORTORA, 1993; SINISTERRA y DALTON, 1996).

$$\text{cell/mL} = ((Ab + 0.0023)/0.011) \times 10^6 \text{ cell/mL}$$

Donde: Ab = Absorbancia

**Actividad lipolítica:** La actividad lipolítica de la levadura *Cryptococcus uchiensis* TMY9, consistió en determinar el tiempo medio de cultivo en el cual el microorganismo expresa su mayor actividad enzimática a diferentes concentraciones de sustrato.

Para determinar la actividad lipolítica se adicionó oleína de palma únicamente; para todos los análisis se cuantificó la actividad de lipasas de los microorganismos por valoración de ácido liberado en la hidrólisis de triglicéridos (CARDENAS *et al.*, 2001). La actividad de la enzima lipasa es medida en unidades de actividad (UA). Una UA es considerada como la cantidad de

enzima necesaria para liberar 1 $\mu$ Mol de ácido graso, bajo las condiciones de la prueba.

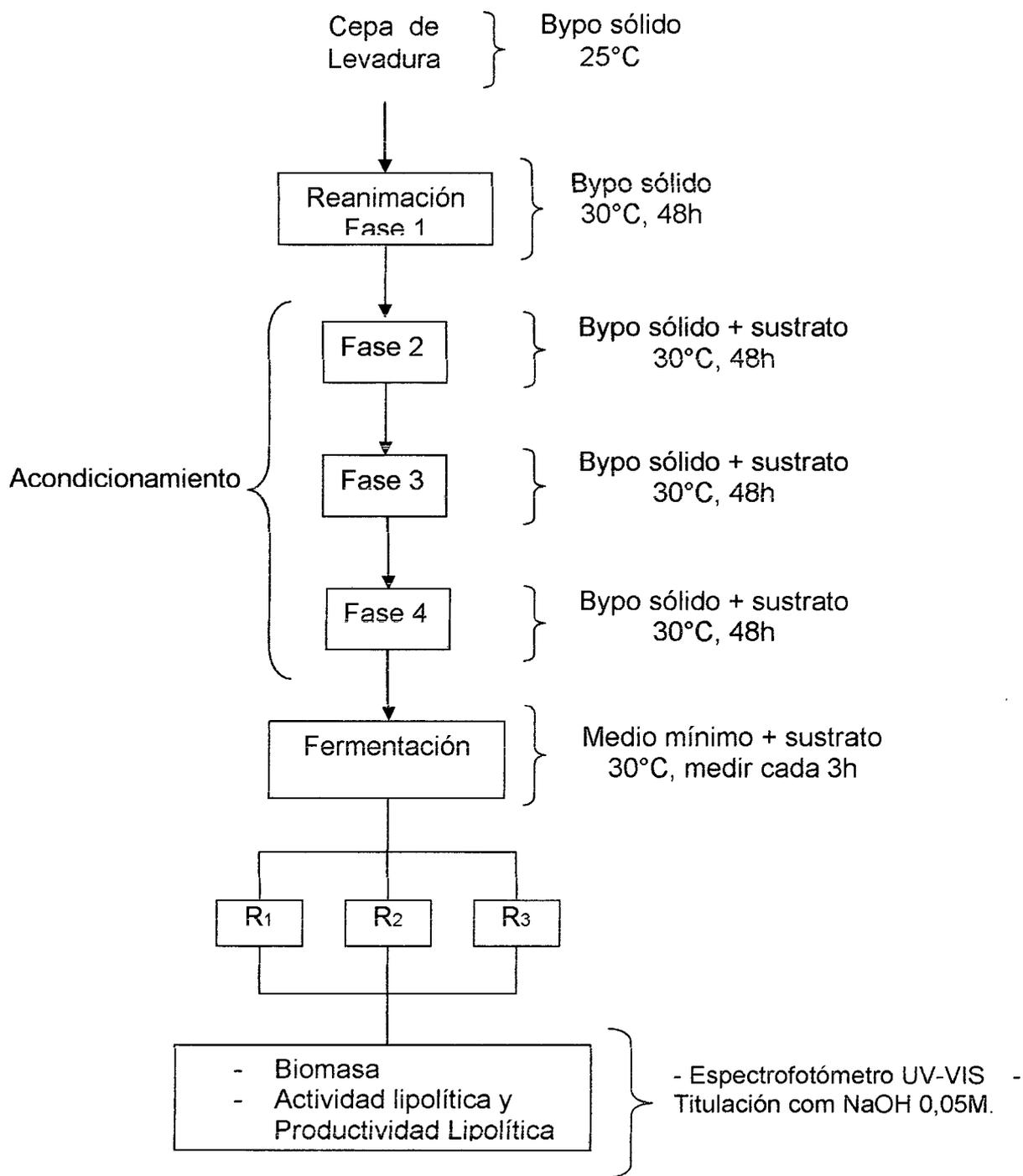
$$\mu\text{Moles de ácido liberado} = \text{gasto NaOH (mL)} \times 5 (\mu\text{mol/mL})$$

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

**Productividad lipolítica:** La productividad lipolítica de la levadura *Cryptococcus uchiensis* TMY9, consistió en determinar el tiempo medio de cultivo en el cual el microorganismo expresa su mayor productividad lipolítica a diferentes concentraciones de sustrato.

Se cuantificó la productividad de lipasas de los microorganismos por el cociente entre la actividad lipásica y el producto de biomasa, volumen y tiempo (CARDENAS *et al.*, 2001).

En la figura 2 se presenta la metodología experimental para la evolución de la biomasa, actividad y productividad lipolítica.



Leyenda: R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>: Repeticiones

Figura 2. Flujograma para la evaluación de la biomasa, actividad y productividad lipolítica.

### **3.4.2.3 Producción de lipasas constitutivas**

Para determinar si la levadura producía lipasas constitutivas, se empleó medio mínimo con 2% de ácido esteárico, evaluándose la biomasa, actividad y productividad lipolítica frente al sustrato oleína de palma.

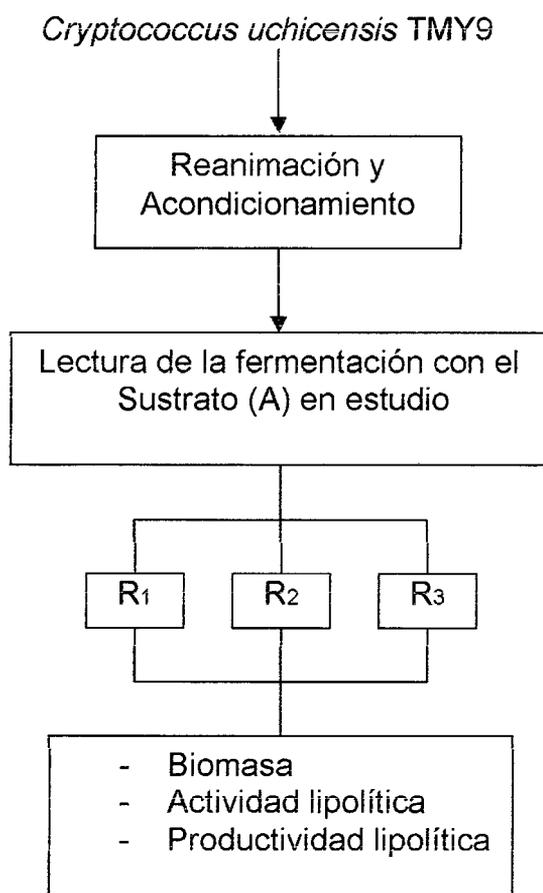
### **3.4.2.4 Producción de lipasas adaptativas**

Para determinar si la levadura producía lipasas adaptativas, los tratamientos en estudio emplearon medio mínimo con 2% de oleína de palma, 2% de aceite de soya y 2% de aceite de girasol, independientemente, evaluándose la actividad y productividad lipolítica frente al sustrato oleína de palma. En la Figura 3, se muestra el diagrama experimental, el cual se describe a continuación:

Variables independientes: Tipos de sustratos.

Variables dependientes: Biomasa, actividad y productividad lipolítica.

Para el cálculo de los resultados se utilizó el diseño completo al azar con tres repeticiones, utilizando el programa Statgraphics (VÁSQUEZ, 1990; LITTLE, 1991).

**Leyenda:**

(A): Oleína de palma, aceite de soya, aceite de Girasol.

R : Repeticiones

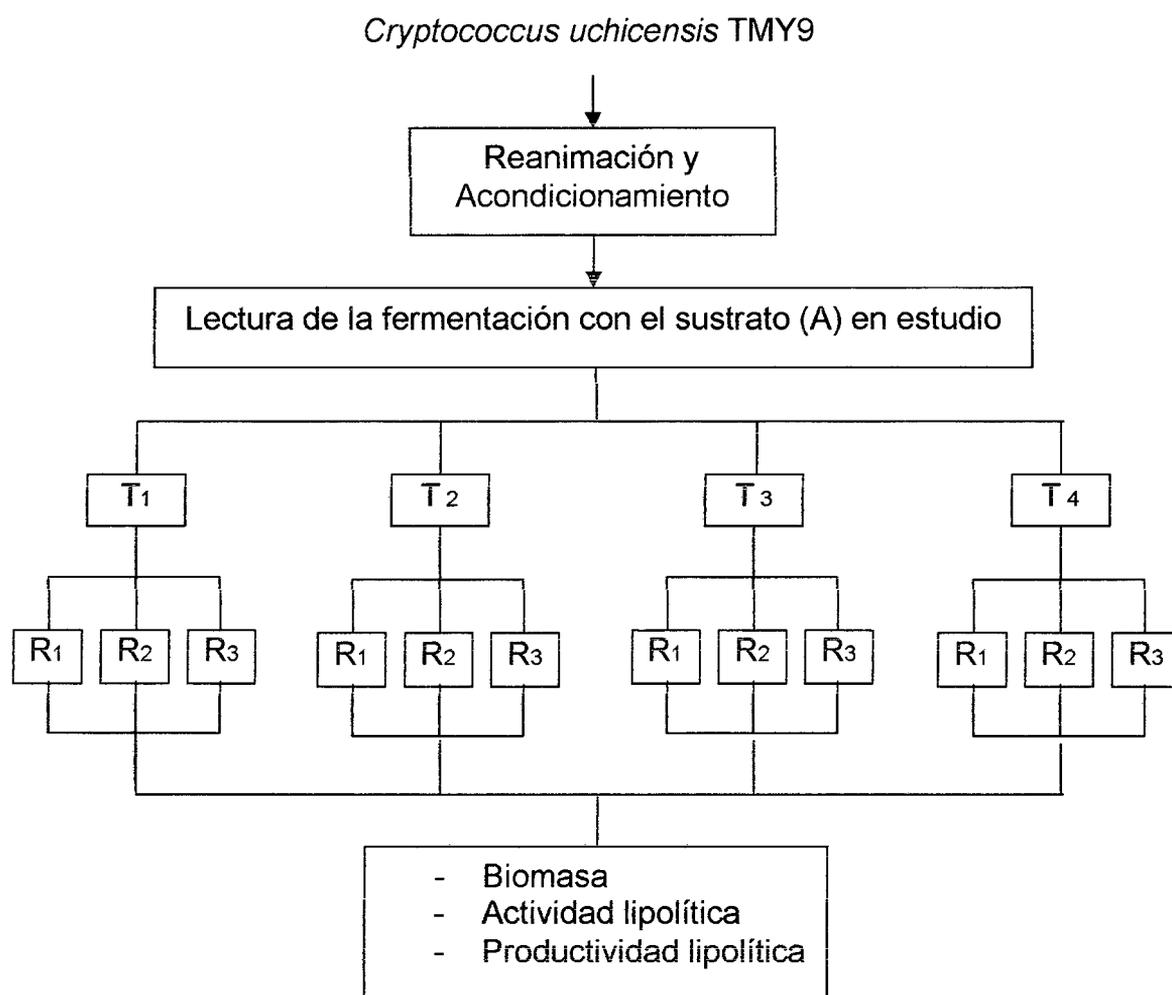
Figura 3. Diagrama experimental para determinar la producción de lipasas adaptativas.

### 3.4.2.5 Producción de lipasas inductivas

Para determinar si la levadura producía lipasas inductivas, los tratamientos en estudio emplearon cultivos con 0%, 1%, 2% y 3% de oleína de palma, aceite de soya, aceite de girasol y ácido esteárico, evaluándose la biomasa, actividad y productividad lipolítica; en la Figura siguiente se presenta el diagrama experimental.

Variables independientes: Tipo de sustrato y concentraciones de sustratos.

Variables dependientes: Biomasa, actividad y productividad lipolítica.



Leyenda:(A):Oleína de palma, aceite de soya, aceite de Girasol y ácido esteárico.

T<sub>1</sub>: Concentración 0%.

T<sub>2</sub>: Concentración 1%.

T<sub>3</sub>: Concentración 2%.

T<sub>4</sub>: Concentración 3%.

R : Repeticiones.

Figura 4. Diagrama experimental para determinar la producción de enzimas inductivas.

Para el cálculo de los resultados se utilizó el diseño Completo al Azar (DCA) con arreglo factorial con tres repeticiones, utilizando el programa Statgraphics (VÁSQUEZ, 1990; LITTLE, 1991).

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. De la producción de lipasas constitutivas

Para realizar esta parte del estudio, se empleó medio líquido debido a que las lipasas segregadas por la levadura actúan mejor en la interface agua-lípido (QUINTEROS 1993); la mayoría de las lipasas son producidas por procesos de fermentación en cultivos sumergidos, entendiéndose por esto aquellos en los que nutrientes y microorganismos se encuentran en la fase acuosa, considerando diferentes procesos, entre los que se incluyen batch, fed-batch y procesos en continuo.

En la Figura 5 (A-I), se muestra la variación de biomasa del cultivo de la levadura *Cryptococcus uchiensis* TMY9 en medio mínimo con 2% de ácido esteárico, donde se puede apreciar que hubo crecimiento celular de la levadura durante las tres primeras horas de cultivo alcanzando un máximo de  $70,527 \times 10^6$  cell/mL, esta fase (exponencial) es muy corta ya que el medio mínimo no tiene nutrientes adecuados para el crecimiento microbiano, requiriéndose adecuados nutrientes y condiciones de fermentación, para lograr un óptimo desarrollo y producción de lipasas (GRBAVČIĆ *et al.* 2007).

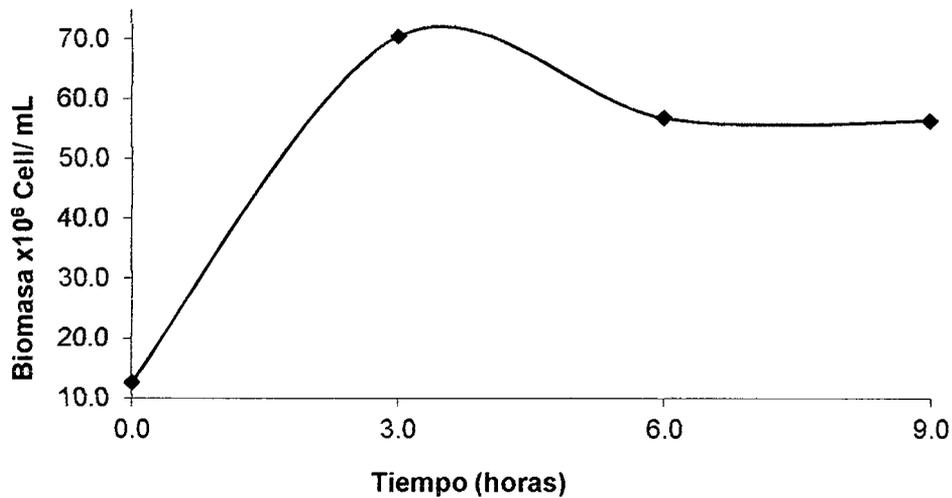


Figura 5. Biomasa de levadura *Cryptococcus uchiensis* TMY9 cultivada con 2 % de ácido esteárico.

El comportamiento de la actividad lipolítica se presenta en la Figura 6 (A-I), primero se observa un máximo de 52,5  $\mu\text{mol/mL.h}$  a las cero horas, luego un descenso del mismo durante las tres primeras horas hasta 50,0  $\mu\text{mol/mL.h}$  y se mantiene durante las tres horas siguientes, para luego caer. A pesar que hubo un crecimiento celular durante las tres primeras horas no hubo un aumento de actividad esto debido a que la producción de lipasas es más sensible a las concentraciones de glucosa y glicerol como fuentes eficientes de carbono, no actuando de la misma manera en el desarrollo celular (LEE *et al.* 2007).

Los microorganismos son seres vivos que por el contrario de las plantas, no sintetizan sus propios alimentos para lo cual necesitan segregar enzimas al medio en el que se están desarrollando y las únicas enzimas que se segregan al medio, sin haberlos inducido, son las que constituyen la célula; así

lo confirma GÓDIA *et al.* (1998) y HERNÁNDEZ (2004) quienes reportan que existen enzimas constitutivas dentro de una célula, que son necesarias y están presentes en todas las condiciones de crecimiento y, por tanto, se sintetizan siempre, en cantidades casi constantes independientemente de la presencia de sustratos o productos en el medio y del estado metabólico de la misma.

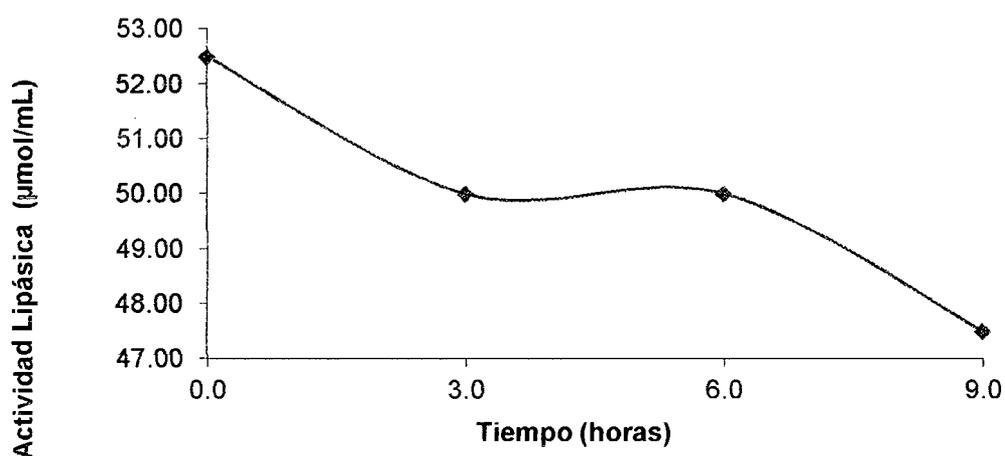


Figura 6. Actividad lipolítica de la levadura *Cryptococcus suchicensis* TMY9 cultivada con 2 % de ácido esteárico.

El comportamiento de la productividad lipásica de la levadura se muestra en la Figura 7(A-I), apreciándose que disminuye conforme pasa el tiempo, obteniéndose un valor medio de productividad lipásica de  $1,47 \times 10^{-3}$   $\mu\text{mol}/\text{cell.mL.h}$ ; en una investigación reciente se reporta que para mejorar la actividad, productividad y biomasa se requiere un medio orgánico complejo (TAKAC Y ERDEM, 2009).

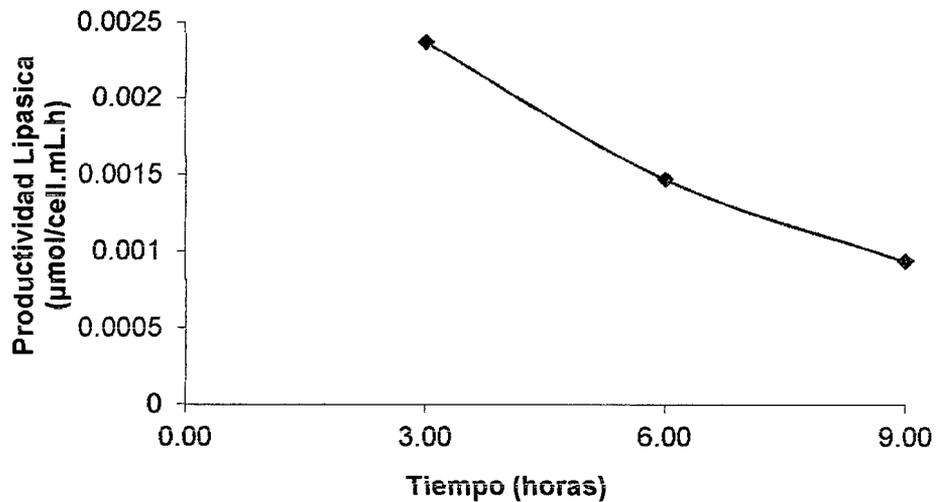


Figura 7. Productividad lipolítica de la levadura *Cryptococcus suchicensis* TMY9 cultivada con 2 % de ácido esteárico.

#### 4.2. De la producción de lipasas adaptativas

El crecimiento de levaduras en el medio líquido, se manifestó por la aparición de una turbidez homogénea, similar a lo descrito por SCRIBAN (1985), esto indicaría que la levadura *Cryptococcus suchicensis* TMY9 logró adaptarse al medio; el crecimiento de la levadura expresado en turbidez, varió con el medio de cultivo; se observó mayor crecimiento en medio mínimo con oleína de palma que con soya y girasol, se conoce que la insaturación de los ácidos grasos fueron una de las principales características de adaptación de colonias de levaduras, destacándose la utilización del ácido linoleico por levaduras psicrófilas (ROSS *et al.*, 2009). La oleína de palma, aceite de soya y girasol, presentan altos contenidos de ácido oleico C18:1 (39,8–43,9%), ácido linoleico C18:2 (49,8–57,1 % y 48,3–74,0 %), respectivamente (FAO/WHO, 1997).

La Figura 8 (A-II), nos demuestra que la actividad lipolítica de la levadura fue mayor al ser cultivada con aceite de girasol alcanzando un  $136\mu\text{mol/mL}\cdot\text{h}$  y menor con los aceites oleína de palma y soya; se conoce que, existen dos mecanismos principales que intervienen en la síntesis de lipasas: la represión del catabolismo de hidratos de carbono y la inducción de sustratos y productos de la acción de lipasas (ácidos grasos y glicerol). En consecuencia, la elección del medio de fermentación es de crucial importancia para la eliminación o reducción de la represión catabólica y la inducción de la biosíntesis de la lipasa (GRBAVČIĆ *et al.*, 2007).

Para comparar el efecto del sustrato sobre la producción de lipasas, se analizaron estadísticamente los valores de actividad lipolítica a tiempo medio de cultivo, determinándose diferencia estadística altamente significativa entre los sustratos empleados, mediante la prueba de Tukey (A-IV) que se determinó el tratamiento que produjo la mayor actividad lipolítica y fue cuando se cultiva en medio mínimo empleando aceite de girasol como inductor, alcanzando un valor de actividad de  $88,3\mu\text{mol/mL}\cdot\text{h}$ , seguido del aceite de soya con  $62,5\mu\text{mol/mL}\cdot\text{h}$  y de la oleína de palma con  $55,8\mu\text{mol/mL}\cdot\text{h}$ . Estos resultados indicaron que, la actividad de la lipasa y el crecimiento de células no estaban en correlación estricta. A saber, los inductores de cadena corta (ácido caprílico y cáprico) inhiben el crecimiento celular, pero mejoran la producción de lipasa (GRBAVČIĆ *et al.*, 2007).

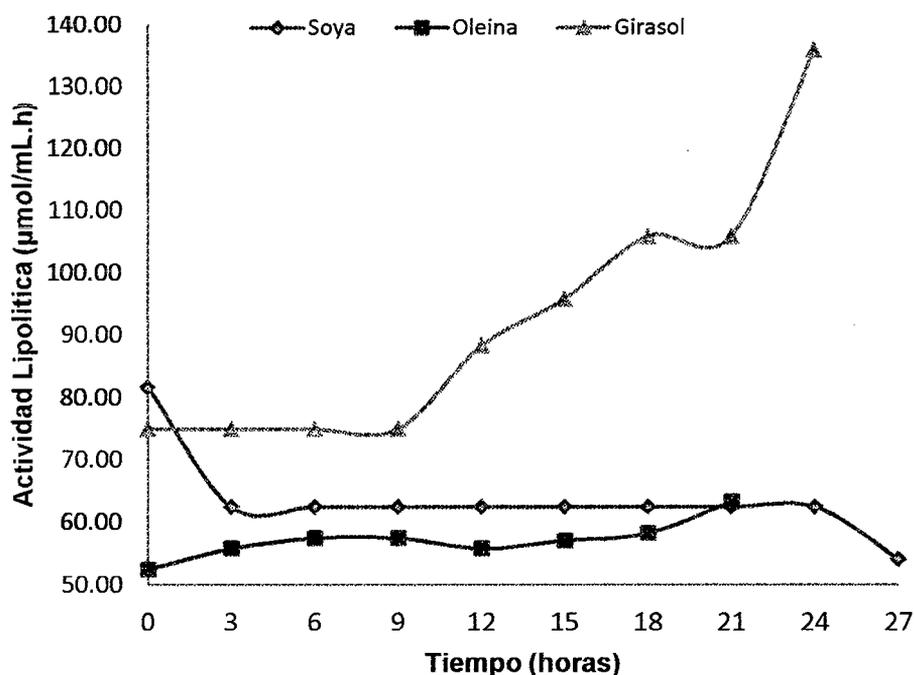


Figura 8. Actividad lipolítica de la levadura *Cryptococcus suchicensis* TMY9, cultivada en oleína de palma, aceite soya y aceite de girasol al 2%.

En la Figura 9 (A-VI), se presenta la actividad lipolítica media, con la finalidad de evitar la presencia de productos tóxicos o equilibrio iónico desfavorable que inhiban la actividad de las lipasas tal como lo refiere JAWETZ *et al.* (1983) y GÓDIA *et al.* (1998) y considerando lo sustentado por CARBALLEIRA (1999), quien indica 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.

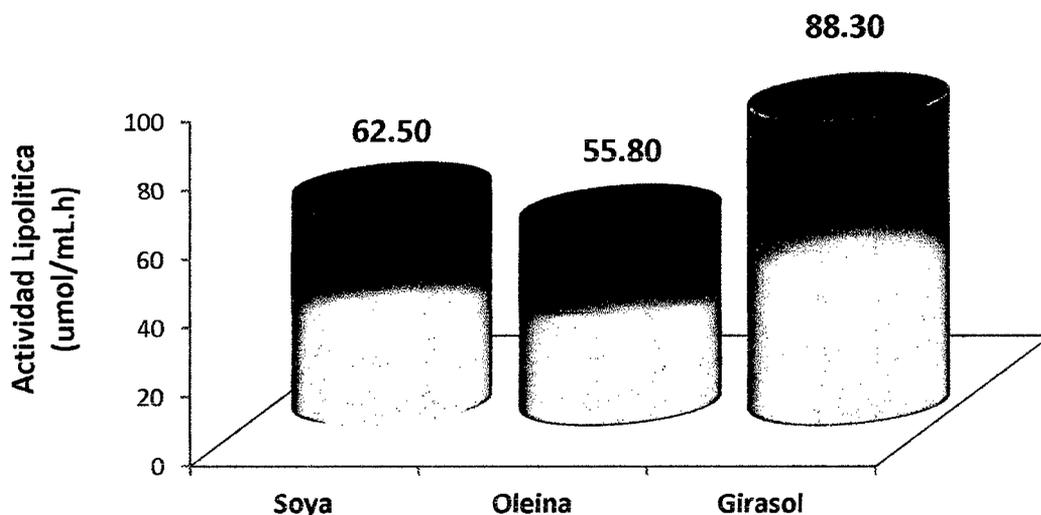


Figura 9. Actividad lipolítica de la producción de lipasas adaptativas a tiempo medio de cultivo (prueba de Tukey,  $\alpha = 0.01$ ).

En la Figura 10 (A-III), se muestra la variación de la productividad lipolítica de la levadura en estudio, en función a los diversos sustratos; apreciándose un comportamiento similar para todos los casos, es decir un descenso de la productividad específica presentando valores similares al final del cultivo demostrándose la capacidad de adaptación de la levadura produciendo para ello lipasas, HERNÁNDEZ (2004) reporta que la biosíntesis de enzimas adaptativas es controlada, su presencia o ausencia está en relación con el medio, sólo se sintetizan cuando son necesarias, son lo que están genéticamente reguladas, se sintetizan sólo como respuestas a la presencia de ciertos sustratos; la producción de estas enzimas, aumentará o disminuirá según las circunstancias externas de la vida del medio ambiente, de la alimentación, y el microorganismo generará más o menos según sea necesario para funcionar adecuadamente.

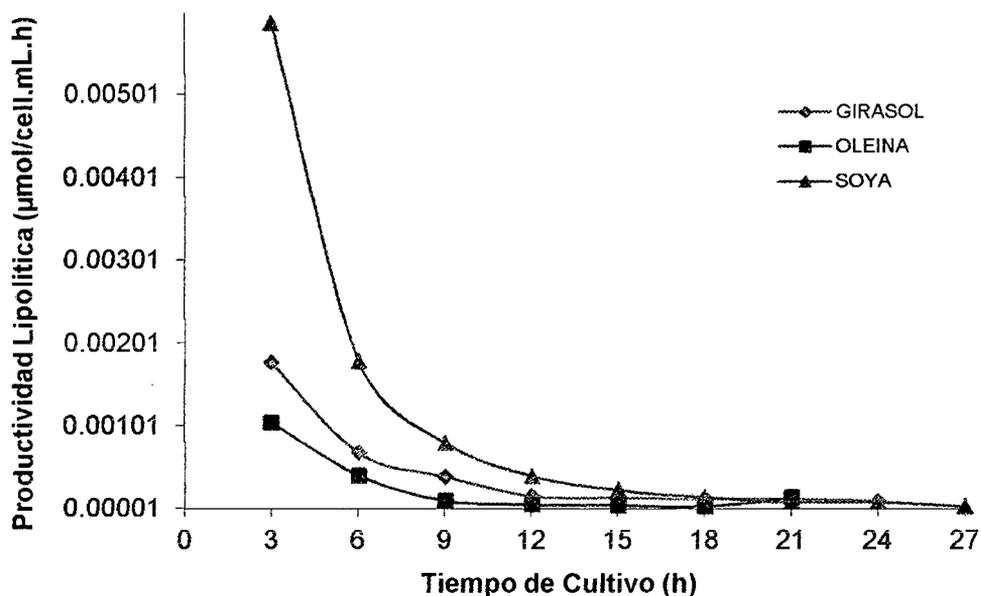


Figura 10. Productividad lipolítica de la levadura *Cryptococcus uchiensis* TMY9, cultivada en aceite de girasol, soya y oleína de palma al 2%.

En la Figura 11 (A-V), se muestran los resultados de la productividad lipolítica de enzimas adaptativas evaluadas a tiempo medio de cultivo, apreciándose que destaca la productividad lipolítica al emplearse aceite de soya como sustrato del cultivo. De acuerdo a la composición química de los aceites empleados como sustratos, la oleína de palma presenta un porcentaje casi equilibrado en el contenido de ácidos grasos palmítico y oleico, con el que se obtuvo un valor de productividad de lipasas a tiempo medio de  $5,68 \times 10^{-5} \mu\text{mol/cell.mL.h}$  y los aceites de soya y girasol presentan un mayor porcentaje de ácidos grasos insaturados oleico y linoleico (FAO/WHO, 1997); con los que se obtuvo  $2,37 \times 10^{-4} \mu\text{mol/cell.mL.h}$  y  $1,66 \times 10^{-4} \mu\text{mol/cell.mL.h}$  respectivamente; esto nos lleva a confirmar que la levadura *Cryptococcus uchiensis* TMY9 es

capaz de utilizar diversos sustratos de naturaleza lipídica y que es capaz de producir lipasas que le permiten hidrolizar estos medios y adaptarse.

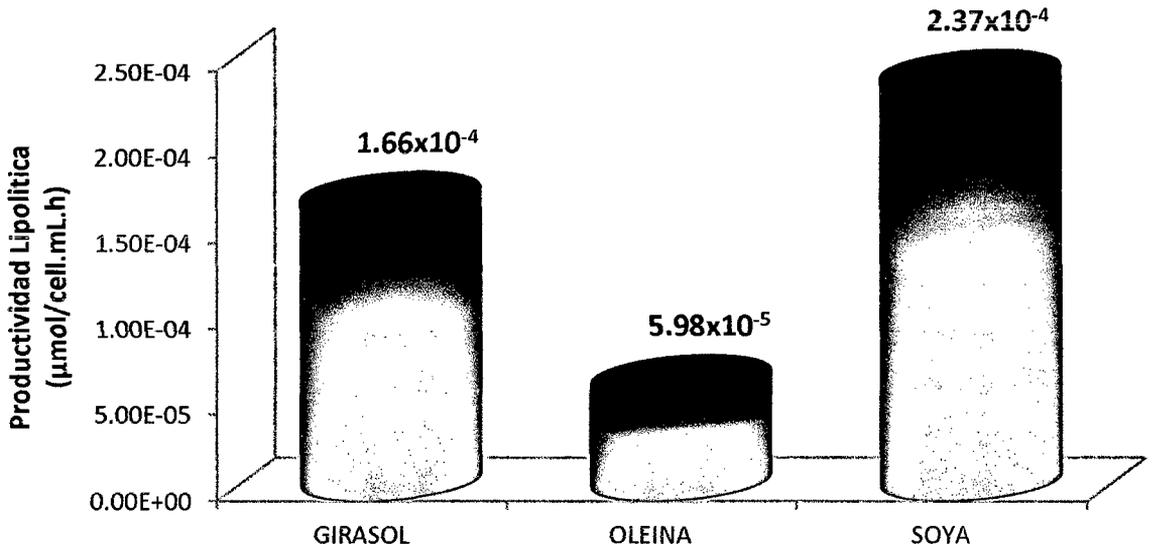


Figura 11. Productividad lipolítica de lipasas adaptativas evaluadas a tiempo medio de cultivo (prueba de Tukey,  $\alpha = 0.01$ ).

Por lo expresado anteriormente se puede entender que los diversos productos de la acción enzimática pueden actuar como antirepresor del gen represor de la producción de dichas lipasas, HERNÁNDEZ (2004), nos dice que existen dos tipos de enzimas adaptativas: represibles e inducibles; BERK (1980) indica que en el caso de las lipasas, la especificidad puede implicar la selectividad hacia distintos ácidos con preferencia hacia la posición de las uniones éster en el seno de la estructura de glicerol. A medida que se rompen gradualmente las uniones éster, se forman productos intermedios, monoglicéridos y diglicéridos. Las lipasas reaccionan en sistemas heterogéneos, tales como las emulsiones de glicéridos en medio acuosos; su acción ocurre en la interface.

El análisis estadístico de los resultados de la productividad lipolítica a tiempo medio de cultivo, indica diferencia altamente significativa entre las medias de las productividades lipolíticas y la prueba de Tukey (A-V) evidencia que la mayor productividad lipolítica de la levadura *Cryptococcus suchicensis* TMY9, se obtiene cuando se utiliza aceite de soya como sustrato.

### 4.3. De la producción de lipasa inductivas

En la Figura 12 (A-VI), se muestra la variación de biomasa cultivada empleando diversos sustratos, apreciándose como influye cada sustrato en diferentes concentraciones sobre el crecimiento de la levadura en estudio; se destaca el efecto de la oleína de palma al 2% con un valor máximo de células de  $1110,82 \times 10^6 \text{ cell/mL}$ , seguido por la soya al 3% con un valor de  $945,36 \times 10^6 \text{ cell/mL}$ , al respecto se ha reportado en un trabajo de investigación que el aceite de sésamo produjo la mayor biomasa (TAKAC y ERDEM, 2009).

Respecto al aceite de sésamo, se reportó que de tres variedades estudiadas, el principal contenido de ácidos grasos para cada variedad fueron: linoleico (C18:2), oleico (C18:1), palmítico (C16:0), esteárico (C18:0) y linolénico (C18:3), encontrándose el ácido linoleico en mayor concentración (YOSHIDA *et al.*, 2007); coincidiendo en cierta forma con los resultados obtenidos ya que los ácidos grasos que conforman los sustratos estudiados son: oleico, palmítico, linolénico; los cuales se encuentran en mayor proporción (TAKAC y MARUL, 2008).

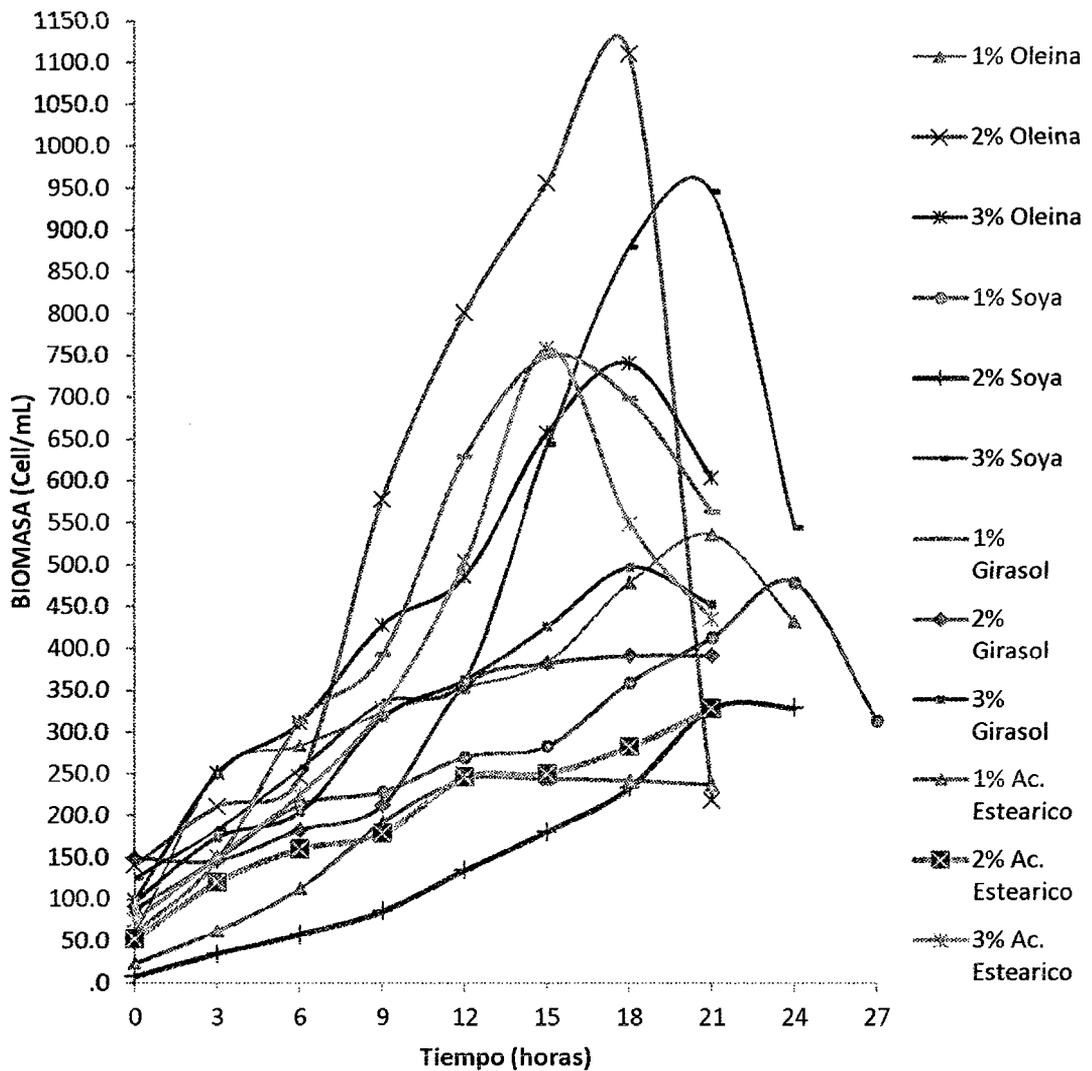


Figura 12. Variación de biomasa de *Cryptococcus uchiensis* TMY9, cultivada en oleína de palma, ácido esteárico, aceite de girasol y aceite soya.

En la Figura 13 (A-VII), se reporta la variación de la actividad lipolítica de la levadura *Cryptococcus uchiensis* TMY9 cultivada utilizando como inductores, oleína de palma, ácido esteárico, aceite de girasol y aceite de soya a diferentes concentraciones; observándose que la variación de la actividad lipolítica es producto de la inducción de los sustratos. COCA *et al.*

(2001), publicaron que la actividad lipolítica depende del tipo de microorganismo, del inductor y de las condiciones óptimas que se den durante la fermentación. Así como DOMINGUEZ (2003) demostró que la naturaleza del inductor controla el porcentaje del isoenzima; cuando cambia las concentraciones de los inductores, la isoenzima no se altera, difiriendo sólo en la actividad de la lipasa.

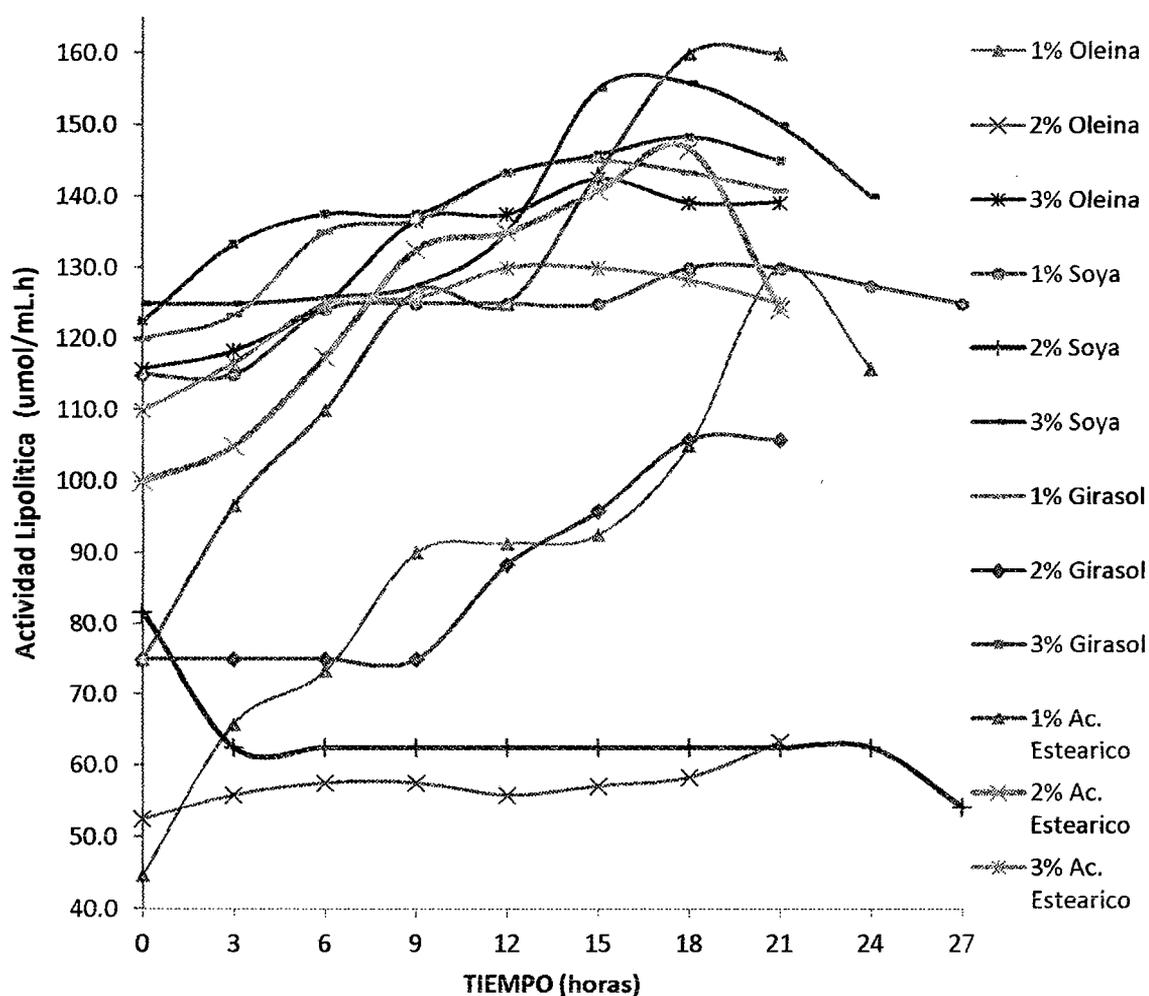


Figura 13. Variación de la actividad lipolítica de *Cryptococcus uchiensis* TMY9 frente a oleína de palma cultivada en oleína de palma, ácido esteárico, aceite de girasol y aceite de soya.

Los resultados del análisis estadístico realizado considerando la actividad lipásica al tiempo medio del desarrollo microbiano se presenta en el A-VIII en ella se muestra diferencia altamente significativa para la interacción sustrato Vs concentración y mediante la prueba de Tukey (A-IX y A-X), se determinó que los mejores resultados de actividad lipolítica de la levadura *Cryptococcusuchicensis*TMY9 se obtiene con aceite de girasol al 3%, con una actividad lipolítica de 143,33  $\mu\text{mol/mL.h}$ , seguido por la oleína de palma al 3%, con una actividad lipolítica de 137,50  $\mu\text{mol/mL.h}$ , tal como se muestra en la Figura 14, lo que nos lleva a deducir que estos sustratos son mejor utilizados por el microorganismo, induciendo la producción de lipasas que pueden hidrolizarlos, se ha reportado que esterres con C18 y C16 presentes en aceites vegetales, promueven alta producción de lipasas y estereras, respectivamente(TAKAC Y ERDEM, 2009).

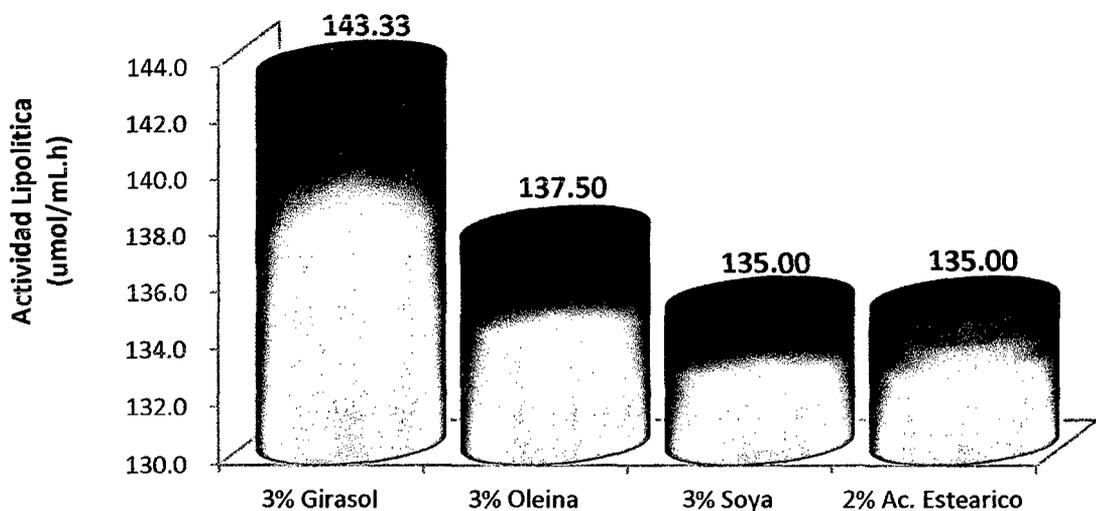


Figura 14. Actividad lipolítica de enzimas inductivas a tiempo medio de cultivo (prueba de Tukey,  $\alpha = 0.01$ ).

En los sustratos estudiados se encuentran en mayor proporción los ácidos grasos linoleico (C18:2), oleico (C18:1), palmítico (C16:0), esteárico (C18:0) y linolénico (C18:3), destacando la influencia del ácido linoleico (YOSHIDA *et al.*, 2007); de igual modo cuando se utiliza aceite de oliva, que presenta alto contenido de ácido oleico, se ha reportado que se obtiene una alta actividad lipasica (RYWIŃSKA *et al.*, 2008), existiendo correlación con los resultados obtenidos ya que los ácidos grasos que conforman los sustratos estudiados son similares (TAKAC y MARUL, 2008).

A la fecha no hay investigaciones realizadas sobre una cepa de *Cryptococcus* productora de lipasas y los resultados demuestran que la levadura estudiada tiene la capacidad de utilizar diversos sustratos de naturaleza lipídica para su crecimiento presumiéndose que pueden sintetizar isoenzimas de lipasas. DOMINGUEZ (2003) estudió la *Candida rugosa* tratada con diferentes inductores en varias fermentaciones con lipasas crudas, revelando que las isoenzimas Lip2, Lip3 y Lip1, son secretadas en proporciones diferentes según el inductor utilizado.

En la Figura 15 (A-XI y A-XII), se muestra la variación de la productividad lipolítica de la levadura, cultivada en diferentes sustratos y a diferentes concentraciones; apreciándose que la productividad disminuye, esto debido al incremento de la biomasa y al tiempo.

Para determinar que tratamiento fue el más conveniente, considerando el tipo de sustrato, concentración y tiempo medio de cultivo, se procedió a realizar el análisis estadístico correspondiente, los resultados de la productividad lipolítica a tiempo medio de cultivo de enzimas inductivas se

presenta en el A-XIII y A-XIV, según el análisis de varianza ( $\alpha = 0,01$ ) se encontró diferencia altamente significativa para la interacción sustratos concentración, deduciendo entonces que existe una combinación óptima entre los niveles de cada factor estudiado a tiempo medio de cultivo en función a la productividad lipolítica.

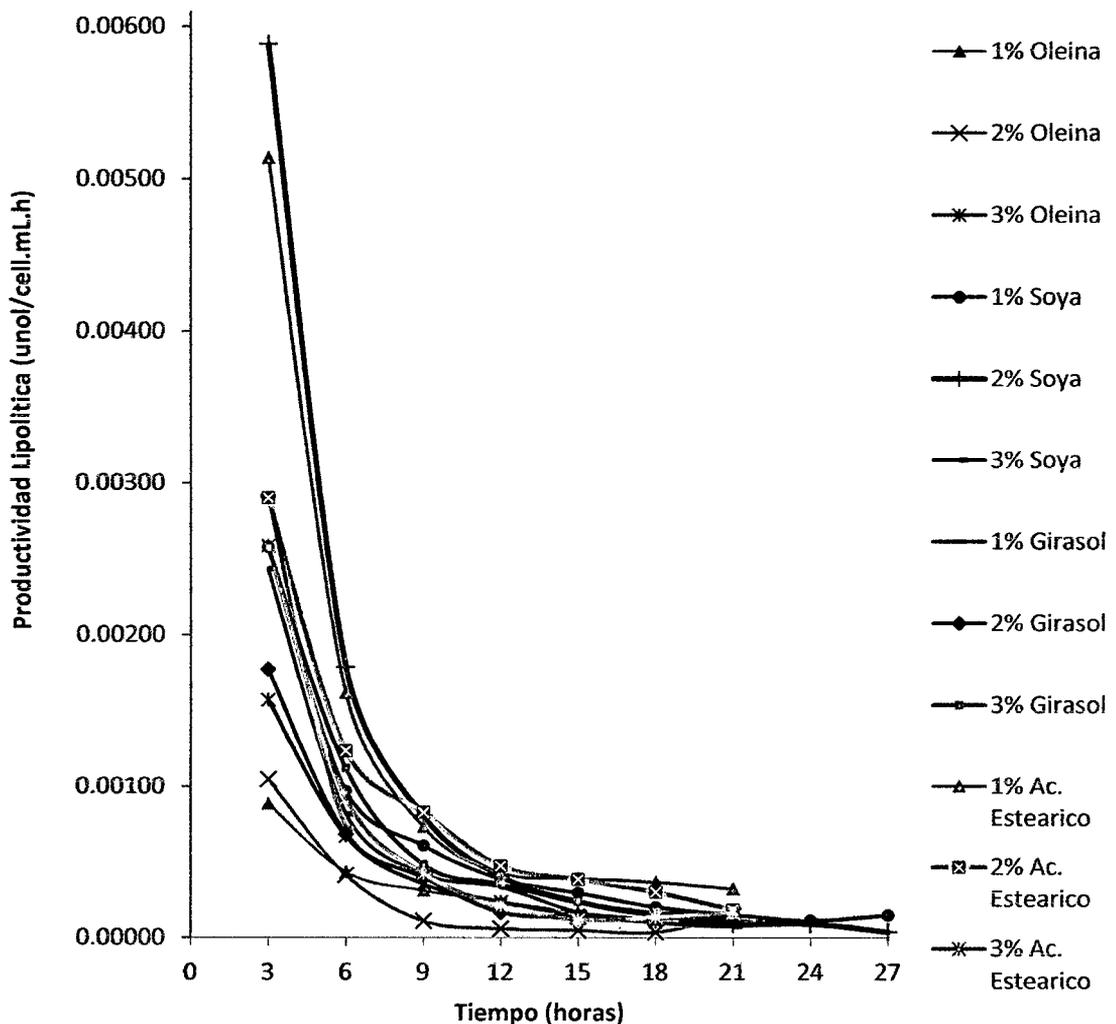


Figura 15. Variación de la productividad lipolítica de *Cryptococcus uchiensis* TMY9, cultivada en oleína de palma, ácido esteárico, aceite de girasol y aceite de soya.

Para determinar que combinación fue la más adecuada, se realizó la prueba de comparaciones múltiples de Tukey( $\alpha = 0,01$ ) (A-XV y A-XVI), apreciándose los mejores comportamientos cuando el cultivo de la levadura *Cryptococcus suchicensis* TMY9 se estudió en ácido esteárico al 2% obteniendo  $4,74 \times 10^{-4}$   $\mu\text{mol}/\text{mL}\cdot\text{h}$ , seguido por el aceite de soya al 2%, luego están los aceites de girasol y oleína al 3%, esto se puede apreciar gráficamente en la Figura 16.

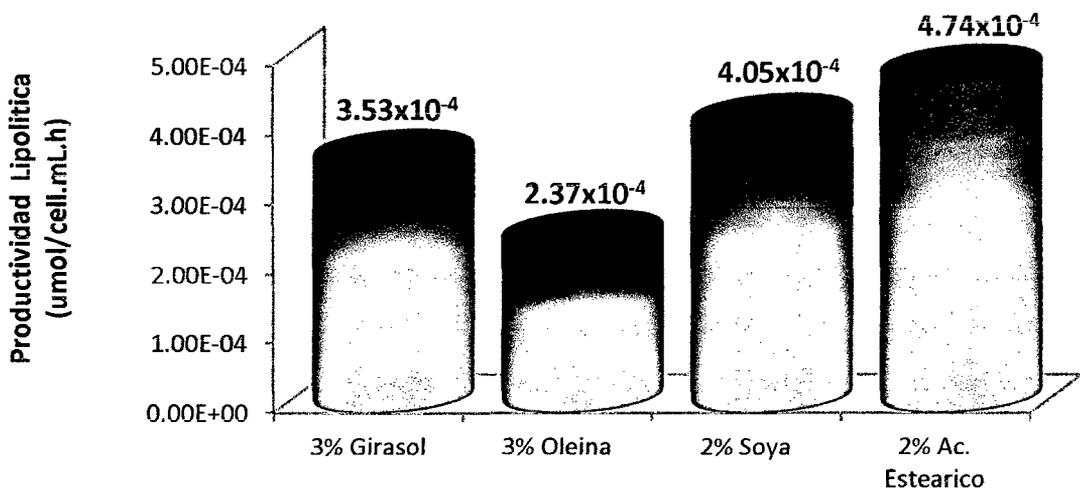


Figura 16. Productividad lipolítica a tiempo medio de cultivo, de enzimas inductivas.

Se observó que la productividad lipásica (Figura 16) al emplear ácido esteárico y aceite de soya a la concentración de 2% fueron  $4,74 \times 10^{-4}$   $\mu\text{mol}/\text{cell}\cdot\text{mL}\cdot\text{h}$  y  $4,05 \times 10^{-4}$   $\mu\text{mol}/\text{cell}\cdot\text{mL}\cdot\text{h}$ , respectivamente, valores que disminuyeron al aumentar la concentración del inductor. GARCÍA *et al.* (1999), indican que la concentración del inductor debe mantenerse baja, para evitar la represión catabólica. Por otro lado LAGUNA (1968) y MURRAY *et al.* (1994) reportaron que cuando la cantidad de sustrato ha sobrepasado la capacidad física de la enzima para recibirlo y poder transformarlo, la reacción prosigue a

la misma velocidad, independientemente de la cantidad de sustrato adicionado; se dice entonces que la enzima se halla saturada con su sustrato; JAGNOW y WOLFGANG (1991) menciona que la velocidad de una reacción enzimática depende de la concentración del sustrato.

Se ha determinado que la mayor productividad lipásica  $4,74 \times 10^{-4}$   $\mu\text{mol}/\text{cell.mL.h}$ , a tiempo medio de cultivo se obtiene con ácido esteárico al 2%, con un valor de actividad lipolítica de  $135,00 \mu\text{mol}/\text{mL.h}$  que no es el mejor valor de actividad, ya que con aceite de girasol al 3% se obtiene una actividad lipásica de  $143,33 \mu\text{mol}/\text{mL}$ , pero debe tenerse en cuenta que la productividad evalúa el tiempo de desarrollo microbiano, es decir en este caso, menos cantidad de microorganismos, en menos tiempo dan como resultado mayor productividad lipásica. BECKER (1999) manifiesta que la diferencia del periodo de duplicación de un microorganismo en condiciones diferentes se debe al tiempo y la energía que el microorganismo debe emplear en un medio para sintetizar los metabolitos con respecto al otro medio.

## V. CONCLUSIONES

1. Se demostró la presencia de lipasas constitutivas en la levadura *Cryptococcus uchicensis* TMY9, al ser cultivada con ácido esteárico, obteniéndose una actividad lipolítica frente a la oleína de palma de 50  $\mu\text{mol/mL.h}$  y una productividad lipolítica de  $1,47 \times 10^{-3}$   $\mu\text{mol/cell.mL.h}$  a las 6 horas de cultivo.
2. Se produjo lipasas adaptativas, con la levadura *Cryptococcus uchicensis* TMY9 habiendo obtenido actividades lipolíticas a tiempo medio de cultivo, de 62,5  $\mu\text{mol/mL.h}$ , 57,5  $\mu\text{mol/mL.h}$  y 88,0  $\mu\text{mol/mL.h}$  al ser cultivada empleando los inductores aceites de soya, oleína de palma y girasol respectivamente.
3. Las lipasas inducibles que produjo la levadura *Cryptococcus uchicensis* TMY9, al emplearse los inductores aceite de girasol y oleína de palma al 3%, dio actividades lipolíticas de 143,33  $\mu\text{mol/mL.h}$  y 137,50  $\mu\text{mol/mL.h}$ , respectivamente. Determinándose productividades lipásicas de  $4,74 \times 10^{-4}$   $\mu\text{mol/cell.mL.h}$  y  $4,05 \times 10^{-4}$   $\mu\text{mol/cell.mL.h}$ , al emplear ácido esteárico y aceite de soya a la concentración de 2 %.

## **VI. RECOMENDACIONES**

- Evaluar la producción de lipasas, en fermentadores con paletas a nivel laboratorio y piloto.
- Investigar microorganismos obtenidos de diversos ambientes naturales, no solamente para producir lipasas, sino para evaluar las posibilidades de producción de otras enzimas útiles en la industria de alimentos.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

- ARIAS, E., LASTRA, J. 1997. Biotecnología; Cinética de Crecimiento. México, Sinexi S.A. [En línea]: Biotecnología – Monografías.com, ([www.monografias.com/trabajos10/10cincrec/10cincrec](http://www.monografias.com/trabajos10/10cincrec/10cincrec), Cinética de Crecimiento, 20 Mayo 2005).
- A. RYWIŃSKA, D. WITKOWSKA, P. JUSZCZYK, W. RYMOWICZ, A. KITA (2008). "Waste Frying Oil as Substrate for Lipase Production by *Geotrichum candidum* Strains." Polish Journal of Environmental Studies 17(6): 925-931.
- BADUI. 1994. "Química de los alimentos". México D.F., Alhambra. 648 p.
- BECKER, J. M., CALDWELL, A., ZACHGO, A. 1999. Biotecnología; Curso de Practica de Laboratorio. Zaragoza – España, Acribia S.A. 285 p.
- BENITES, J., JUAN, C. 2001. Aplicaciones Industriales de las Enzimas. Salamanca – España, Copyright. [En línea]: Enzimas, ([html.rincondelvago.com/enzimas](http://html.rincondelvago.com/enzimas), Enzimas reacciones químicas, 20 Mayo 2005).
- BERK, Z. 1980. Introducción a la Bioquímica de los Alimentos. México D.F., El Manual Moderno S.A. 358 p.
- BU'LOCK, J., BJORN, K. 1991. Biotecnología Básica. Zaragoza - España, Acribia S.A. p. 292-293.

- BYRNE, O. 2003. Academia Iberoamericana de Medicina Biológica y Odontostomatología [En línea]: (Curso VII-Homotoxicología, members.tripod.com/cmbick0/id31.htm, 20 de Marzo del 2003).
- CARBALLEIRA, R. J. D., GARCIA BURGOS, C., ALVAREZ, E. and SINISTERRA J. V. 1999. Effects of inducers in the production of lipase by *Rhizomucormiehei* 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. Madrid – España. Facultad de Farmacia Universidad Complutense de Madrid.
- CARDENAS, F., ÁLVAREZ, E., ELSON, S., SÁNCHEZ-MONTERO, J.M., 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.
- CARDENAS, F., ALVAREZ, E., DE CASTRO, M. S., SÁNCHEZ-MONTERO, J. M., VALMASEDA, M., ELSON, S., SINISTERRA, J. V. 2001. Screening and catalytic activity in organic synthesis of novel fungal and yeast lipases. Journal of molecular catalysis B: Enzymatic 14 (2001) 111-123.
- COCA, J., HERNANDEZ, O., BERRIO, R., MARTINEZ, S., DIAZ, E., 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., CRUEGER, A. 1993. “Biología; Manual de Microbiología Industrial”. Trad. por Paloma Liras Padín. 3 ed. Zaragoza – España, Acribia S.A. 413 p.
  - DÉAK, T., BEUCHAT, L. R. 1996. *Handbook of Food Spoilage Yeasts*. CRC Press, Boca Ratón, Florida. [In line]: (<http://www.unsa.edu.ar/matbib/hongos/09htextolevaduras.pdf>)
  - DOMINGUEZ DE MARIA, SÁNCHEZ-MONTERO, J. , ALCANTARA, A., VALERO, F., SINISTERRA, J. 2005. Rational strategy for the production of new crude lipase from *Candida rugosa*. *Biotechnology Lett.* 2005, 27,499-503.
  - FAO/WHO. 1997. CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. Twenty-second Session, Geneva, 23–28 June 1997. [on line]: <http://www.fao.org/docrep/meeting/005/W3963E/W3963E00.htm>.
  - FRENKEN, L., EGMOND, R., BATENBURG, A., WIL BOS, J., VISSER, C., VERRIPS, C. 1992. Reproducción del gen de la Lipasa de los *glumae* de las *pseudomonas* y de la determinación de los residuos activos del sitio. *Aplicación Rodee Microbiology*. 58: 3787 - 3791.
  - FURIA, T. 1972. *CRC Handbook of food additives*. 2 ed. New York – EE.UU., CRC Press. p.27-52, Vol. 1.
  - GARCÍA, M., QUINTERO, R., LÓPEZ-MUNGUÍA, A. 1999. *Biología Alimentaria*. Trad. Grupo Noriega. 1 ed. México D.F., Limusa S.A. 636 p.

- GÓDIA, F., LÓPEZ, J., CASAS, C., GONZÁLEZ, G., LAFUENTE, F. J., LEMA, J. M., MONTESINOS, J. L., ROCA, E., SOLÁ, C., VALERO, F. 1998. Ingeniería Bioquímica. Ed. Por F. Gódia, J. López Madrid – España, Síntesis S.A. 350 p.
- GRBAVČIĆ, S., DIMITRIJEVIĆ. 2007. Effect of fermentation conditions on lipase production by *Candida utilis*. Journal of the Serbian Chemical Society, National Library of Serbia. **72**: 757-765.
- GUNSTONE, F. 1999. Review Enzymes as biocatalysts in the modification of natural lipids. In *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 79: 1535 - 1549.
- HERNÁNDEZ, S. 2004. Biología (08) CBC Cátedra Nasazzi; (apuntes tomados en 2004). Sede Montes de Oca 1200 4° piso, aula 42. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Buenos Aires – Argentina. [En línea]: Biología (08) CBC Ciclo Básico Común (<http://c.1asphost.com/biologico/clase07.html>. Clase 7. 09 Set. 2004).
- JAGNOW, G., WOLFGANG, D. 1991. Biotecnología; Introducción con Experimento Modelo. Zaragoza – España, Acribia S.A. 252 p.
- JAWETZ, E., MELNICK, J., ADELBERG, E. 1983. Manual de Microbiología Médica. Novena edición. México, El Manual Moderno S.A. 595 p.
- JAY, J. M. 1994. Microbiología Moderna de los Alimentos. 2 ed. Zaragoza-España, Acribia S.A. 441 p.
- LACADENA, J. 2001. HISTORIA “NODELADA” DE LA GENÉTICA; Concepto y Método. Instituto de España, Real Academia de Farmacia. p 45. [En línea]:

([www.ranf.com/pdf/discursos/numero/lacadena.pdf](http://www.ranf.com/pdf/discursos/numero/lacadena.pdf) Genética Nov. 2001).

- LAGUNA, J. 1968. Bioquímica. 2 ed. México, La prensa medica mexicana. 785 p.
- LEE, G., BAE, J., SUH, M., KIM, H. 2007. "Optimal culture conditions for the production of a novel extracellular alkaline lipase from *Yarrowialipolytica* NRRL Y-2178." Journal of Applied Biological Chemistry **50**(2): 46-51.
- LEHNINGER, A. 1979. Bioquímica; Las bases moleculares de la estructura y función celular. 2 ed. Barcelona-España, Omega S.A. p. 990-991.
- LITTLE, T. 1991. "Métodos Estadísticos para la investigación en la Agricultura". 2 ed. México, Trillas. 270 p.
- LÓPEZ, E. 2001. Tratamientos enzimáticos en la industria de alimentos. Bogotá - Colombia, Área Tecnológica de Centro Nacional de Tecnología para la Industria Alimentaria (CENTIA). 22 p.
- MURRAY, R., GRANNER, D., MAYES, P., RODWELL, V. 1994. Bioquímica de Harper. Décima tercera edición. México - Santa fe de Bogotá, Moderno S.A. 961 p.
- NAKAYAMA K. 1981. Biotechnology Microbial Fundamentals. VerlagChemie. Weinheim. p. 355-410 Vol. 1.
- NURANDA, L., HARIYADI, P., DEWANTI-HARIYADI, R., BUDIYANTO, S. 2002. Production of lipase with ésterification activity from moulds isolated from moulds isolated from Indonesian fermented foods. [En

linea]: Departamento of food technology and Human Nutrition. Bogor Agricultural University. Indonesia.

([http://ift.confex/ift/2001/techprogram/paper\\_8562.htm](http://ift.confex/ift/2001/techprogram/paper_8562.htm), Journals, 18 Jul. 2002)

- PLUMMER, T. 1958. *Bioquímica Práctica*. Bogotá – Colombia, Presencia S.A. 354 p.
- PROYECTO LIPASA. 1997. Departamento de Ingeniería Química. Universidad Autónoma de Barcelona. 2 p. [En línea]: (<http://eq3.Uab.es/lipasa/webesp2.html>).
- QUINTEROS, R. 1993. *Ingeniería Bioquímica*. México D.F., Alhambra. 332 p.
- ROSSI M, BUZZINI P, CORDISCO L, AMARETTI A, SALA M, RAIMONDI S, PONZONI C, PAGNONI UM, MATTEUZZI D(2009). "Growth, lipid accumulation, and fatty acid composition in obligate psychrophilic, facultative psychrophilic, and mesophilic yeasts." *FemsMicrobiologyEcology* **69**(3): 363-372.
- SÁNCHEZ, A., DE LA CASA, R., SINISTERRA, J., VALERO, F., SÁNCHEZ-MONTERO, J. 1999. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 80: 65-75.
- SÁNCHEZ – MONTERO, J. 2001. "Nuevas Lipasas Microbianas Aplicación a la resolución de mezclas racémicas". Madrid – España. Universidad Complutense. 12 p.
- SINISTERRA, J., DALTON, H. 1996. Influence of the immobilization methodology in the stability and activity of *P. putido* UV. Immobilized.

- SINISTERRA, J. , SÁNCHEZ-MONTERO, J. 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
- SCHMIDT-HEBBEL, H., PENNACHIOTTI, I. 1982. Las Enzimas en los Alimentos; Su importancia en la química y la tecnología de los alimentos. Ed. por Fundación Chile. 93 p.
- SCRIBAN, R. 1985. Biotecnología. Trad. Por Dra. María Del Consuelo Hidalgo y Mondragón. México D. F., El Manual Moderno. pp. 1 - 3.
- SZTAJER, H., MALISZEWSKA, I., WIERCZOREK, J. 1988. Production of exogenous lipases by bacteria, fungi and actinomycetes. *Enzyme Microbiology Technology*. 10: 492–497.
- TAKAC, S.; ERDEM, B.2009. "Media Formulation using Complex Organic Nutrients for Improved Activity, Productivity, and Yield of *Candida rugosa* Lipase and Esterase Enzymes." *Preparative Biochemistry & Biotechnology***39**(3): 323-341.
- TAKAÇ, S.; MARUL, B. 2008. "Effects of lipidic carbon sources on the extracellular lipolytic activity of a newly isolated strain of *Bacillus subtilis*." *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology***35**(9): 1019.
- TORTORA J. 1993. Introducción a la microbiología. Zaragoza - España, Acribia S.A. 289 p.

- VALENZUELA, B., NIETO, S. 1994. Biotecnología de Lípidos; Uso de lipasas para la modificación estructural de grasas y aceites. *Grasas y Aceites*, Barcelona - España. 45(5): 337-343.
- VÁSQUEZ, A. 1990. "Experimentación Agrícola". Lima – Perú, Amarú S.A. 278 p.
- WISEMAN, A. 1986. Principios de Biotecnología. Zaragoza – España, Acribia S.A. 252 p.
- WISEMAN, A. 1991. Manual de Biotecnología de las Enzimas. Trad. Por M. Calvo, E. Sevillano. Zaragoza – España, Acribia S.A. 444 p.
- YUI S., LUTZ S. 2010. Improved triglyceride transesterification by circular permuted *Candida antarctica* lipase B. **105**: 44.
- YOSHIDA H., TANAKA M., TOMIYAMA Y., MIZUSHINA Y. 2007. Antioxidant Distributions and Triacylglycerol Molecular Species of Sesame Seeds (*Sesamum indicum*). **84**: 165.

## ABSTRACT

Was investigated metabolic nature of lipases produced by the yeast *Cryptococcus uchiensis* TMY9 (LCU), using different conditions of development, determining its production capacity of constituent lipases, adaptive and inductive. It showed the presence of constitutive enzymes in the LCU, when grown with stearic acid, yielding a lipolytic activity (LA) with palm olein 50  $\mu\text{mol/mL.h}$  and a lipolytic productivity (PL) of  $1,47 \times 10^{-3} \mu\text{mol/cell.mL.h}$ , at 6 hours of culture. Adaptive enzymes are metabolized, obtaining the LCU, AL medium time of 62,5  $\mu\text{mol/mL.h}$ , 57,5  $\mu\text{mol/mL.h}$  and 88,0  $\mu\text{mol/mL.h}$ , when grown inductors using soybean oil, palm olein and sunflower respectively. Inducible enzymes produced by the LCU, gave AL 143,33  $\mu\text{mol/mL.h}$  and 137,50  $\mu\text{mol/mL.h}$ , when used, inductors sunflower oil and palm olein to 3%, respectively. Determining PL  $4,74 \times 10^{-4} \mu\text{mol/cell.mL.h}$  and  $4,05 \times 10^{-4} \mu\text{mol/cell.mL.h}$ , if used stearic acid and soybean oil at 2%.

**ANEXO**

**A-I:** Variación de biomasa, actividad y productividad lipolítica promedio de la levadura *Cryptococcusuchicensis* TMY9 cultivada sin inductor.

HORA	CELL/mL.	ACTIVIDAD LIPASICA	PRODUCTIVIDAD LIPASICA
0.00	12.709	52.5000	
3.00	70.527	50.0000	2.37E-03
6.00	56.891	50.0000	1.47E-03
9.00	56.345	47.5000	9.37E-04

<sup>†</sup> Actividad lipolítica evaluada usando oleína de palma como sustrato.

**A-II:** Actividad lipolítica promedio de la levadura *Cryptococcusuchicensis* TMY9 cultivada en aceite de soya, oleína de palma y aceite de girasol a 2%.

Hora	Soya	Oleina	Girasol
0.00	81.6667	52.5000	75.0000
3.00	62.5000	55.8333	75.0000
6.00	62.5000	57.5000	75.0000
9.00	62.5000	57.5000	75.0000
12.00	62.5000	55.8333	88.3333
15.00	62.5000	57.0833	95.8333
18.00	62.5000	58.3333	105.8333
21.00	62.5000	63.3333	105.8333
24.00	62.5000		135.8333
27.00	54.1667		

<sup>†</sup> Actividad lipolítica evaluada usando oleína de palma como sustrato.

**A-III:** Productividad lipolítica promedio de la levadura *Cryptococcusuchicensis* TMY9 cultivada en aceite de soya, oleína de palma y aceite de girasol a 2%.

Hora	Soya	Oleína	Girasol
0.00			
3.00	5.89E-03	1.05E-03	1.78E-03
6.00	1.79E-03	4.14E-04	8.85E-04
9.00	8.07E-04	1.11E-04	4.97E-04
12.00	4.05E-04	5.98E-05	2.66E-04
15.00	2.37E-04	4.83E-05	1.41E-04
18.00	1.49E-04	3.68E-05	1.29E-04
21.00	9.14E-05	1.47E-04	1.29E-04
24.00	9.14E-05		9.96E-05
27.00	3.80E-05		

<sup>†</sup> Actividad lipolítica evaluada usando oleína de palma como sustrato.

**A-IV:** Prueba de Tukey de la actividad lipolítica Vs sustratos de enzimas adaptativas ( $\alpha = 0.01$ ).

Sustratos	Count	LS Mean	HomogeneousGroups
Oleína de Palma	2	55.80	X
Aceite de Soya	2	62.50	X
Aceite de Girasol	2	88.30	X

**A-V:** Prueba de Tukey de la productividad lipolítica Vs sustratos de enzimas adaptativas ( $\alpha = 0.01$ ).

Sustratos	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
Oleína de Palma	2	0.0000598	X
Aceite de Soya	2	0.000237	X X
Aceite de Girasol	2	0.000266	X



**A-VII:** Variaciones de actividad lipolítica de *Cryptococcus uchiensis* TMY9 cultivada 0% de inductor; en oleína de palma, aceite de soya, aceite de girasol y ácido esteárico a 1%, 2% y 3%.

HORA	0%	OLEINA			SOYA			GIRASOL			ACIDO ESTEARICO		
		1% Oleína	2% Oleína	3% Oleína	1% Soya	2% Soya	3% Soya	1% Girasol	2% Girasol	3% Girasol	1% Ac. Esteárico	2% Ac. Esteárico	3% Ac. Esteárico
0	52.50	44.67	52.50	115.83	115.00	81.67	125.00	120.00	75.00	122.50	75.00	100.00	110.00
3	50.00	65.83	55.83	118.33	115.00	62.50	125.00	123.33	75.00	133.33	96.67	105.00	116.67
6	50.00	73.33	57.50	125.00	124.17	62.50	125.83	135.00	75.00	137.50	110.00	117.50	125.00
9	47.50	90.00	57.50	136.67	125.00	62.50	127.50	136.67	75.00	137.50	126.67	132.50	125.83
12		91.25	55.83	137.50	125.00	62.50	135.00	143.33	88.33	143.33	125.00	135.00	130.00
15		92.50	57.08	142.50	125.00	62.50	155.00	145.00	95.83	145.83	143.33	140.83	130.00
18		105.00	58.33	139.17	130.00	62.50	155.83	143.33	105.83	148.33	160.00	146.67	128.33
21		130.00	63.33	139.17	130.00	62.50	150.00	140.83	105.83	145.00	160.00	124.17	125.00
24		115.83			127.50	62.50	140.00			135.83			
27					125.00	54.17							

<sup>†</sup> Actividad lipolítica evaluada usando oleína de palma como sustrato.

**A-VIII:** ANVA del Diseño Completo al Azar (DCA), con arreglo factorial 4 X 4 de la actividad lipolítica de enzimas inductivas ( $\alpha = 0.01$ ).

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Concentraciones	232829.0	3	77609.7	459.91	0.0000
Sustratos	59026.0	3	19675.3	116.59	0.0000
Concentraciones * sustratos	86549.0	9	9616.55	56.99	0.0000
Residual	5400.0	32	168.75		
Total (corrected)	383804.0	47			

**A-IX:** Prueba de Tukey de la actividad lipolítica Vs sustratos de enzimas inductivas ( $\alpha = 0.01$ ).

Sustratos	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
Ácido Esteárico	12	135.00	X
Aceite de Soya	12	135.00	X
Oleina de Palma	12	137.50	X
Aceite de Girasol	12	143.33	X

**A-X:** Prueba de Tukey de la actividad lipolítica Vs concentraciones de enzimas inductivas ( $\alpha = 0.01$ ).

Concentraciones	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
0%	12	50.00	X
2%	12	135.00	X
1%	12	136.67	X X
3%	12	143.33	X

**A-XI:** Variaciones de productividad lipolítica de *Cryptococcus uchiensis* TMY9 cultivada a 0% de inductor; en oleína de palma y aceite de soya a 1%, 2% y 3%.

HORA	0%	OLEINA			SOYA		
		1% Oleina	2% Oleina	3% Oleina	1% Soya	2% Soya	3% Soya
0							
3	2.37E-03	8.87E-04	1.05E-03	1.57E-03	2.58E-03	5.89E-03	2.43E-03
6	1.47E-03	4.33E-04	4.14E-04	6.72E-04	9.71E-04	1.79E-03	8.18E-04
9	9.37E-04	3.11E-04	1.11E-04	3.55E-04	6.08E-04	8.07E-04	4.22E-04
12		2.38E-04	5.98E-05	2.37E-04	3.88E-04	4.05E-04	3.35E-04
15		1.64E-04	4.83E-05	1.47E-04	2.94E-04	2.37E-04	1.66E-04
18		1.25E-04	3.68E-05	1.05E-04	2.01E-04	1.49E-04	9.85E-05
21		1.16E-04	1.47E-04	1.11E-04	1.50E-04	9.14E-05	7.56E-05
24		1.12E-04			1.12E-04	9.14E-05	1.11E-04
27					1.48E-04	3.80E-05	

**A-XII:** Variaciones de productividad lipolítica de *Cryptococcus uchiensis* TMY9 cultivada en aceite de girasol y ácido esteárico a 1%, 2% y 3%.

HORA	GIRASOL			ACIDO ESTEARICO		
	1% Girasol	2% Girasol	3% Girasol	1% Ac. Esteárico	2% Ac. Esteárico	3% Ac. Esteárico
0						
3	2.92E-03	1.78E-03	2.57E-03	5.14E-03	2.90E-03	2.59E-03
6	7.24E-04	6.85E-04	1.12E-03	1.62E-03	1.24E-03	9.23E-04
9	4.18E-04	3.97E-04	4.83E-04	7.33E-04	8.28E-04	4.25E-04
12	1.94E-04	1.66E-04	3.53E-04	4.28E-04	4.74E-04	2.16E-04
15	1.31E-04	1.41E-04	2.31E-04	3.91E-04	3.84E-04	1.17E-04
18	1.20E-04	1.29E-04	1.66E-04	3.66E-04	3.00E-04	1.36E-04
21	1.33E-04	1.29E-04	1.53E-04	3.21E-04	1.84E-04	1.67E-04
24		9.96E-05				
27						

**A-XIII.** Productividad lipolítica de enzimas inductivas de la levadura *Cryptococcus* *uchicensis* TMY9 cultivada con cuatro sustratos a cuatro concentraciones.

Productividad Lipolítica ( $\mu\text{mol}/\text{cellmL h}$ )								
[C]	Oleína de Palma	Tiempo 1/2 de cultivo	Aceite de Soya	Tiempo 1/2 de cultivo	Aceite de Girasol	Tiempo 1/2 de cultivo	Ácido Esteárico	Tiempo 1/2 de cultivo
0%	2.44E-03	3 horas	2.44E-03	3 horas	2.44E-03	3 horas	2.44E-03	3 horas
	2.50E-03		2.50E-03		2.50E-03		2.50E-03	
	2.18E-03		2.18E-03		2.18E-03		2.18E-03	
1%	2.01E-04	15 horas	2.82E-04	15 horas	1.37E-04	15 horas	4.80E-04	15 horas
	1.47E-04		3.19E-04		1.11E-04		3.54E-04	
	1.44E-04		2.84E-04		1.44E-04		3.38E-04	
2%	1.10E-04	9 horas	3.57E-04	12 horas	2.66E-04	12 horas	4.78E-04	15 horas
	1.04E-04		3.21E-04		3.49E-04		3.37E-04	
	1.17E-04		5.36E-04		3.27E-04		3.39E-04	
3%	2.14E-04	12 horas	1.25E-04	15 horas	2.39E-04	12 horas	4.21E-04	9 horas
	2.54E-04		2.07E-04		3.78E-04		4.26E-04	
	2.42E-04		1.67E-04		4.43E-04		4.28E-04	

<sup>†</sup> Actividad lipolítica evaluada usando oleína de palma como sustrato.

**A-XIV:** ANVA del Diseño Completo al Azar (DCA), con arreglo factorial 4 X 4 de la productividad lipolítica de enzimas inductivas ( $\alpha = 0.01$ ).

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Concentraciones	3.53656E-4	3	1.17885E-4	2374.84	0.0000
Sustratos	4.61574E-6	3	1.53858E-6	31.00	0.0000
Concentraciones * sustratos	2.3602 E-6	9	2.62245E-7	5.28	0.0002
Residual	1.58846E-6	32	4.96393E-8		
Total (corrected)	3.62221E-4	47			

**A-XV:** Prueba de Tukey de la productividad lipolítica Vs sustratos de enzimas inductivas ( $\alpha = 0.01$ ).

Sustratos	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
Oleína de Palma	12	0.00023687	X
Aceite de Girasol	12	0.00035322	X
Aceite de Soya	12	0.00040464	X
Ácido Esteárico	12	0.00047435	X

**A-XVI:** Prueba de Tukey de la productividad lipolítica Vs concentraciones de enzimas inductivas ( $\alpha = 0.01$ ).

Concentraciones	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
3%	12	0.00044336	X
2%	12	0.00053649	X
1%	12	0.00048027	X
0%	12	0.0025016	X