

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

INSTITUTO DE INGENIERÍA

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA



“Producción de lipasa a partir de hongos filamentosos, como biocatalizador en la síntesis enzimática de biodiesel”

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA

LYDIA TOSCANO PALOMAR

DIRECTORA DE TESIS

DRA. GISELA MONTERO ALPÍREZ

CODIRECTORA DE TESIS

DRA. MARGARITA STILIANOVA STOYTCHIEVA

A la memoria de mi querida amiga, la Maestra Irma Alicia Mireles Lepe

A mis queridos hijos, Moisés Jesús, Luis Abraham y José Daniel

Agradecimientos

Quiero expresar mi profundo reconocimiento a todos aquellos que me acompañaron y apoyaron en estos arduos cuatro años de mi camino hacia el Doctorado.

Agradezco en especial a:

Mi familia, por el apoyo emocional e incondicional y por soportar y contener mis angustias permitiéndome avanzar.

La Dra. Gisela Montero Alpírez por su excelente e incondicional guía académica, por su excepcional apoyo afectivo y gran calidez y calidad humana.

La Dra. Margarita Stoytcheva por compartir conmigo su enorme cúmulo de conocimientos, por su excepcional e incondicional apoyo y por su constante preocupación a lo largo de este tiempo.

El Dr. Benjamín Valdés Salas por su constante guía académica acompañada de un permanente ánimo.

Los miembros del jurado por las sugerencias hechas para mejorar el contenido del presente trabajo. Al Dr. Campbell, mi agradecimiento por sus constantes consejos y asesorías.

El Instituto de Ingeniería de la UABC, Maestros y Personal por haberme formado y apoyado durante estos cuatro años.

El Departamento de Bioquímica y Microbiología de la Universidad de Plovdiv, en especial al Dr. Velizar Gochev por la colaboración en las tareas de investigación de este estudio.

El Dr. Miguel Beltrán del Departamento de Química de la Universidad Autónoma de Guadalajara por su apoyo en la realización de una estancia en este Centro de Estudios y asesoramiento en la identificación por PCR de las cepas microbiológicas utilizadas.

La Dra. Lourdes Cervantes Díaz por haberme aceptado dentro de su grupo de estudiantes, por su guía académica, asesoramiento y calidez humana. Mi agradecimiento al Personal del Laboratorio de Fitopatología del Instituto de Ciencias Agrícolas por permitirme el uso de sus instalaciones y equipos.

El Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ), en especial a la Dra. Mirna Estarrón Espinoza, por asesoramiento y permitirme hacer una estancia en este Centro para poder finalizar el trabajo de investigación.

El Instituto Tecnológico de Mexicali, por darme las facilidades y el apoyo para realizar estudios de posgrado y por permitirme gozar de la beca PROMEP durante los primeros tres años del Doctorado.

Finalmente quiero agradecer a Dios por darme la salud y la fortaleza que me permitieron realizar tan arduo trabajo y a mis queridas amigas que me acompañaron en el proceso.

RESUMEN

Seis cepas productoras de lipasa fueron estudiadas utilizando técnicas de acondicionamiento de cultivo con dos diferentes métodos de fermentación, en medio líquido conocido como Fermentación Sumergida (SmF) y en medio sólido conocido como Fermentación en Estado Sólido (SSF). El medio líquido tiene una composición mineral con sacarosa como fuente de carbono, urea y sulfato de amonio como fuentes de nitrógeno. Diferentes sustratos sólidos de subproductos agrícolas se utilizaron como soportes en la fermentación sólida. A todos los medios se les agregó 2% (v/w) de aceite de olivo como estimulante para la producción de lipasa y el pH se ajustó a 6. Las fermentaciones se incubaron a 29-30°C. En la fermentación sumergida se usó agitación de 100 rpm hasta por 7 días. Los microorganismos utilizados fueron identificados como *Aspergillus awamori*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Penicillium chrysogenum* y *Trichoderma harzianum*. Las cepas se preservaron en medio suelo orgánico-arena y se subcultivaron en medio Agar Dextrosa Papa (ADP) en la producción de esporas para su uso como inóculo de las fermentaciones. La evaluación cuantitativa de las lipasas se realizó con los ensayos de pHstat y del p-Nitrofenil Butirato (p-NPB). Las actividades se determinaron en extractos crudos y en lipasas liofilizadas. Las mayores actividades reportadas se obtuvieron del *Aspergillus flavus*, seguido de *Trichoderma harzianum*, *Penicillium chrysogenum* con valores de 28.3, 11.6 y 11.4 U/mg de lipasa cruda liofilizada respectivamente por el método de SSF. Se determinaron las condiciones óptimas de la actividad de la lipasa producida después de ser parcialmente purificada por diálisis. La lipasa disuelta en solución de NaCl 0.1 M expresó máxima actividad en buffer de fosfatos pH 8.2 a 45°C. El valor de la constante de Michaelis-Menten (K_m) para la enzima libre se estimó por las gráficas de Lineweaver-Burk y Hanes-Woolf calculándose en 6.59 mM y 6.67 mM para las diferentes gráficas. El valor de la velocidad máxima se obtuvo a partir de estas dos gráficas siendo 7.62 y 7.44 U/ml. Se realizaron estudios de inmovilización con soportes de polímeros hidrofílicos. Los resultados mostraron el 63, 49 y 74% de eficiencia de retención para el alginato, mezcla alginato-chitosán y mezcla alginato-alcohol polivinílico (PVA) respectivamente. La inmovilización con alginato mostró la mayor estabilidad al almacenamiento cuando se mantuvo húmedo a 4°C por 20 días, presentando una actividad relativa del 100%, comparado con el 62 y 32% para las mezclas alginato-

chitosán y alginato-PVA respectivamente. Las condiciones óptimas de la lipasa inmovilizada fueron pH 8.2 y 45°C. La estabilidad al pH de la lipasa inmóvil se presentó en un valor de 5 en buffer de acetato. A la temperatura de 60°C la lipasa inmovilizada en esferas de alginato/chitosán mantuvo su actividad lipolítica por 120 min. A los 30 días de almacenamiento a 4°C de temperatura, retuvo 90% de su actividad cuando la lipasa se inmovilizó en alginato/chitosán. Se realizó trabajo complementario para explorar la potencial producción de ácidos grasos libres y de metil ésteres a partir de aceite de olivo extra virgen catalizada por lipasa libre obtenida por SSF. Se obtuvo el 1.4% de ácidos grasos libres en 3 horas de hidrólisis. La producción de metil ésteres fue de 8.0% en la reacción de transesterificación bajo condiciones específicas.

Palabras Clave: Lipasa, hidrólisis, transesterificación, metil ésteres.

ABSTRACT

Six lipase producing strains were studied using conditioning techniques of cultivation with two different methods of fermentation. Liquid submerged fermentation known as (SmF) and solid medium known as Solid State Fermentation (SSF). The liquid medium has a mineral composition with sucrose as carbon source, urea and ammonium sulfate as nitrogen sources. Different agricultural byproducts substrates were used as supports in the solid fermentation. All media were added 2% (v/w) Olive oil as a stimulant for the production of lipase and the medium pH was adjusted to 6. The fermentation temperature was 29-30 °C. In submerged fermentation was used agitation of 100 rpm for up to 7 days. The microorganisms used were identified as *Aspergillus awamori*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma harzianum* and *Penicillium chrysogenum*. Strains were preserved in organic soil-sand and subcultured on Potato Dextrose Agar (PDA) for spores production to be used as inoculum. Quantitative evaluation of lipases was performed with pH-stat and p-Nitrophenyl butyrate (p-NPB) tests. The activities were determined in crude extracts and lyophilized lipases. The highest activities reported were obtained from *Aspergillus flavus*, followed by *Trichoderma harzianum*, *Penicillium chrysogenum* with values of 28.3, 11.6, and 11.4 U / mg of lyophilized crude lipase respectively by the method of SSF. Optimal conditions were

determined by the activity of the lipase produced after being purified by dialysis partially. The lipase dissolved in 0.1 M NaCl peak expressed in pH 8.2 phosphate buffer at 45 ° C. The value of Michellis-Menten constant (K_m) for the free enzyme was estimated by Lineweaver-Burk plots and Hanes-Woolf calculated at 6.59 mM and 6.67 mM. The value of the speed is obtained from the two plots to be 7.62 and 7.44 U / ml respectively. Immobilization studies were performed with hydrophilic polymer supports. The results showed 63, 49 and 74% retention efficiency of alginate, alginate-chitosan mixture and alginate-polyvinyl alcohol (PVA) mixture. Immobilization with alginate showed higher storage stability when kept moist at 4°C for 20 days, with a relative activity of 100%, compared with 62 and 32% for mixtures alginate-chitosan and alginate-PVA respectively. The optimum conditions of the immobilized lipase were pH 8.2 and 45°C. Immobilized lipase in alginate/chitosan beads showed its highest stability at pH 5 in acetate buffer. At temperature of 60°C the immobilized lipase in alginate beads / chitosan remained active for 120 min. After 30 days of storage at 4 ° C temperature, retained 90% of its activity when the lipase was immobilized in alginate / chitosan. Complementary work was carried out to explore the potential production of free fatty acids and methyl esters from extra virgin olive oil catalyzed by SSF free lipase. The hydrolysis reaction produced 1.4% of free fatty acids after 3 hours of reaction. The production of methyl esters was 8.0% in the transesterification reaction under specific conditions.

Keywords: Lipase, hydrolysis, transesterification, methyl esters.

PREFACIO

La presente Tesis Doctoral consta de un primer capítulo introductorio donde se detallan principalmente los objetivos de la presente investigación, un segundo capítulo en el que se presentan los marcos teóricos utilizados, en el tercer capítulo se expone un estudio de la estimación de la producción de biodiesel a partir de sebo animal obtenido del proceso de la estabilización de los residuos cárnicos de los rastros en el Estado de Baja California. Del capítulo 3 al 7 se presentan los estudios realizados con respecto a la identificación y preservación de hongos filamentosos nativos a partir de los cuales se obtuvo la enzima requerida en las siguientes etapas de la investigación. En estos capítulos se define el método de fermentación que produjo el mayor rendimiento de lipasa. Paralelamente a la producción de la lipasa se realizó su caracterización con la finalidad de establecer los parámetros óptimos de su actividad en las reacciones de hidrólisis y metanólisis que se requieren para la producción de metil ésteres. En el capítulo 8 se presentan los procedimientos y resultados de la inmovilización de la lipasa producida, evaluando su estabilidad térmica y de almacenamiento, por último en el capítulo 9 se realizan reacciones de hidrólisis y metanólisis con lipasa preservada por liofilización y obtenida a partir de los hongos filamentosos seleccionados. Estos últimos estudios se realizaron utilizando lipasa libre e inmóvil y los resultados se compararon con los obtenidos del uso de lipasa de páncreas de cerdo. En el Anexo se presentan las evidencias de los productos de publicación y divulgación de la investigación realizada.

CONTENIDO

	Página
AGRADECIMIENTOS	ii
RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
PREFACIO	vi
LISTADO DE FIGURAS	xii
LISTADO DE TABLAS	xv
NOMENCLATURA	xvii
 CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	
1.1 INTRODUCCIÓN.	1
1.2 HIPÓTESIS.	2
1.3 OBJETIVOS.	2
1.3.1 Objetivo general.	2
1.3.2 Objetivos específicos.	3
 CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES GENERALES	
2.1 BIODIESEL.	4
2.1.1 Métodos de producción de biodiesel.	4
2.2 MATERIAS PRIMAS PARA LA PRODUCCIÓN DE BIODIESEL.	6
2.2.1 Perfil de ácidos grasos.	8
2.2.2 Procesado de grasas y aceites.	11
2.3 PRODUCCIÓN ENZIMÁTICA.	11
2.3.1 Pretratamiento.	16
2.3.2 Enzimas libre e inmovilizada.	17
2.3.3 Uso de solventes.	18
2.3.4 Tipo de alcohol y agentes de adsorción.	18

2.3.5	Contenido de agua.	20
2.3.6	Tipo y dosis de enzima.	21

CAPÍTULO 3. ESTIMACIÓN DE LA OBTENCIÓN DE BIODIESEL A PARTIR DE RESIDUOS DE LA INDUSTRIA DE CÁRNICOS

3.1	RESUMEN.	22
3.2	OBJETIVOS.	22
3.3	INVENTARIO DE RASTROS E INDUSTRIAS DE RENDIMIENTO.	22
3.4	EL SEBO EN EL PROCESO DE MATANZA.	23
3.5	POTENCIAL ENERGÉTICO DE LA GRASA ANIMAL.	26
3.6	CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO 3.	27

CAPÍTULO 4. ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE LIPASA EXTRACELULAR POR FERMENTACIÓN SUMERGIDA

4.1	RESUMEN.	29
4.2	INTRODUCCIÓN.	29
4.3	MATERIALES Y MÉTODOS.	30
4.3.1	Cultivos e identificación.	31
4.3.2	Medio de crecimiento.	31
4.3.3	Producción de lipasa por SmF.	32
4.3.4	Determinación de masa molecular.	33
4.3.5	Determinación de actividad lipolítica.	33
4.4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	33
4.4.1	Identificación morfológica.	34
4.4.2	Identificación por secuenciación de DNA.	35
4.4.3	Producción de lipasa.	36
4.4.4	Velocidad de crecimiento fungal.	37
4.4.5	Temperatura y pH óptimos de la actividad lipolítica.	38
4.5	CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO 4.	38

CAPÍTULO 5. IDENTIFICACIÓN Y CONSERVACIÓN DE HONGOS FILAMENTOSOS PRODUCTORES DE LIPASAS

5.1	RESUMEN.....	39
5.2	INTRODUCCIÓN.....	39
5.3	ANTECEDENTES.....	41
5.4	PRESERVACIÓN DE CEPAS MICROBIANAS.....	41
5.4.1	Criocongelación.....	42
5.4.2	Liofilización.....	42
5.4.3	Métodos alternativos.....	43
5.5	TAXONOMÍA FUNGAL.....	44
5.6	MATERIALES Y MÉTODOS.....	45
5.7	REGISTRO Y DESCRIPCIÓN DE LA COLECCIÓN.....	46
5.8	DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	54

CAPÍTULO 6. PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LIPASA EXTRACELULAR A PARTIR DE CEPA NATIVA *TRICHODERMA HARZIANUM*

6.1	RESUMEN.....	55
6.2	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	55
6.3	CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO VII.....	60

CAPÍTULO 7. MEJORAMIENTO DE LA PRODUCCIÓN DE LIPASA POR FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO

7.1	RESUMEN.....	61
7.2	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	61
7.3	CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO 7.....	65

CAPÍTULO 8. INMOVILIZACIÓN DE LIPASA USANDO POLÍMEROS HIDROFÍLICOS EN FORMA DE ESFERAS DE HIDROGEL

8.1	RESUMEN.	66
8.2	INTRODUCCIÓN.	67
8.3	MATERIALES Y MÉTODOS.	68
8.3.1	Preparación de esferas.	69
8.3.2	Enzima inmovilizada.	69
8.3.3	Actividad enzimática.	70
8.3.4	Determinación de la estabilidad de la lipasa inmovilizada.	70
8.3.5	Caracterización de las esferas.	70
8.4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	71
8.4.1	Inmovilización de lipasa en diferentes hidrogeles.	71
8.4.2	Eficiencia de encapsulamiento.	75
8.4.3	Efecto del pH en la velocidad de hidrólisis de p-NFB.	76
8.4.4	Efecto de la temperatura en la velocidad de hidrólisis de p-NFB.	76
8.4.5	Estabilidad de la lipasa.	77
8.5	CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO 8.	80

CAPÍTULO 9. REACCIONES DE HIDRÓLISIS Y METANÓLISIS DE ACEITE DE OLIVO POR CATÁLISIS ENZIMÁTICA

9.1	RESUMEN.	82
9.2	INTRODUCCIÓN.	82
9.3	MATERIALES Y MÉTODOS.	83
9.3.1	Materiales.	83
9.3.2	Análisis de FAME por cromatografía de gases.	83
9.3.3	Hidrólisis de aceite de olivo.	84
9.3.4	Metanólisis de aceite de olivo.	84
9.4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	85
9.4.1	Hidrólisis de aceite de olivo.	85
9.4.2	Metanólisis de aceite de olivo.	86

9.5	CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO 9.....	89
	CONCLUSIONES GENERALES	90
	REFERENCIAS	92
	GLOSARIO	105
	ANEXOS	107

LISTADO DE FIGURAS

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES GENERALES

Figura		Página
1	Proceso convencional de producción de biodiesel.	5
2	Diseño de proceso ideal para la producción enzimática de biodiesel. .	6
3	Representación esquemática de un triglicérido con FFA.	6
4	Reacciones catalizadas por lipasas.	12

CAPÍTULO 3. EVALUACIÓN DE LA OBTENCIÓN DE BIODIESEL A PARTIR DE RESIDUOS DE LA INDUSTRIA DE CÁRNICOS

Figura		Página
5	Ganado en pie en Baja California en 2008.	23
6	Proceso básico de rendimiento para la extracción de grasa.	24
7	Balance de materia y energía del proceso de rendimiento.	25
8	Perfiles de los costos del sebo versus costos de crudo.	27

CAPÍTULO 4. ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE LIPASA EXTRACELULAR A PARTIR DE HONGOS FILAMENTOSOS

Figura		Página
9	Diagrama de flujo de la secuencia experimental.	32
10	Aspecto morfológico de cepas en medio ADP.	34
11	Perfil de actividad enzimática: <i>A. awamori</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. oryzae</i>	36
12	Perfil de actividad enzimática: <i>T. sp.</i> , <i>T. reesei</i> , <i>P. chrysogenum</i>	36
13	Velocidad de producción de biomasa: <i>A. awamori</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. oryzae</i> . .	37
14	Velocidad de producción de biomasa: <i>T. sp.</i> , <i>T. reesei</i> , <i>P. chrysogenum</i> . .	37
15	Temperatura y pH óptimos de actividad: <i>A. niger</i>	38
16	Temperatura y pH óptimos de actividad: <i>P. chrysogenum</i>	38

CAPÍTULO 5. IDENTIFICACIÓN Y CONSERVACIÓN DE HONGOS FILAMENTOSOS PRODUCTORES DE LIPASAS

Figura		Página
17	<i>Aspergillus awamori</i> . Con 7 días de crecimiento a 26°C.	47
18	<i>Aspergillus niger</i> . Con 10 días de crecimiento, a 27°C.	48
19	<i>Aspergillus oryzae</i> . Con 15 días de crecimiento a 26°C.	49
20	<i>Aspergillus flavus</i> . Con 6 días de crecimiento a 26°C.	50
21	<i>Penicillium chrysogenum</i> . Con 12 días de crecimiento a 25°C.	51
22	<i>Penicillium sp.</i> Con 12 días de crecimiento a 25°C.	52
23	<i>Trichoderma harzianum</i> . Con 3 días de crecimiento a 25°C.	53

CAPÍTULO 6. PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LIPASA EXTRACELULAR A PARTIR DE *TRICHODERMA HARZIANUM*

Figura		Página
25	Velocidad específica de crecimiento de biomasa.	56
26	Producción de lipasa y contenido total de proteína en SmF.	57
27	Producción de enzima y contenido total de proteína en SSF.	57
28	Temperatura óptima de <i>T. harzianum</i>	58
29	Efecto del pH en la actividad de lipasa: <i>T. harzianum</i>	58
30	Lineweaver-Burk gráfico para lipasa de <i>T. harzianum</i>	59
31	Hanes-Woolf gráfico para lipasa de <i>T. harzianum</i>	59

CAPÍTULO 7. MEJORAMIENTO DE LA PRODUCCIÓN DE LIPASA POR FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO

Figura		Página
32	Gráfico de Pareto del efecto de los factores.	64

CAPÍTULO 8. INMOVILIZACIÓN DE LIPASA USANDO POLÍMEROS HIDROFÍLICOS EN FORMA DE ESFERAS DE HIDROGEL

Figura		Página
33	Morfología de esferas de hidrogel.	72
34	Distribución de tamaño de partículas en esferas.	72
35	Espectros de FTIR de AlgNa/Chitosán.	73
36	Espectros de FTIR de AlgNa/PVA.	74
37	Efecto de pH en la velocidad inicial de la hidrólisis.	76
38	Efecto de la temperatura en la velocidad de hidrólisis.	77
39	Estabilidad al pH de lipasa inmovilizada.	78
40	Estabilidad térmica de lipasa inmovilizada.	79
41	Estabilidad al almacenamiento: Lipasa libre e inmovilizada.	80

CAPÍTULO 9. REACCIONES DE HIDRÓLISIS Y METANÓLISIS DE ACEITE DE OLIVO POR CATÁLISIS ENZIMÁTICA

Figura		Página
42	Avance de reacción de hidrólisis de aceite de olivo.	85
43	Efecto de la carga de lipasa en la conversión a FAME.	86
44	Efecto de la relación molar aceite/alcohol en FAME.	87
45	Efecto de tiempo de reacción en el rendimiento a FAME.	87
46	Efecto del contenido de agua en la reacción de alcoholisis.	88

LISTADO DE TABLAS

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES GENERALES

Tabla		Página
1	Distribución de cosecha mundial de aceites.	7
2	Nomenclatura de ácidos grasos.	8
3	Perfil de ácidos grasos de cultivos.	9
4	Perfil de ácidos grasos de origen animal.	10
5	Perfil de ácidos grasos de frutas.	10
6	Estudios en producción de lipasas microbianas.	14
7	Fuentes de lipasas y condiciones óptimas de acción.	16
8	Transesterificación enzimática de algunos aceites y grasas	19

CAPÍTULO 3. EVALUACIÓN DE LA OBTENCIÓN DE BIODIESEL A PARTIR DE RESIDUOS DE LA INDUSTRIA DE CÁRNICOS

Tabla		Página
9	Ganado de rendimiento y grasa no comestible en Baja California.	24

CAPÍTULO 4. ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE LIPASA EXTRACELULAR A PARTIR DE HONGOS FILAMENTOSOS.

Tabla		Página
10	Observaciones al microscopio en campo ocular.	34
11	Identificación de secuencias de productos de PCR.	35

CAPÍTULO 5. IDENTIFICACIÓN Y CONSERVACIÓN DE HONGOS FILAMENTOSOS PRODUCTORES DE LIPASAS

Tabla		Página
12	Identificación de colección de cepas en suelo orgánico.	46

CAPÍTULO 7. MEJORAMIENTO DE LA PRODUCCIÓN DE LIPASA POR FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO

Tabla		Página
13	Factores y resultados de la creación de un diseño factorial.	63
14	Análisis de varianza para actividad de lipasa.	64

CAPÍTULO 8. INMOVILIZACIÓN DE LIPASA USANDO POLÍMEROS HIDROFÍLICOS EN FORMA DE ESFERAS DE HIDROGEL

Tabla		Página
15	Relación entre hidrogeles, la formación y fuerza de las esferas.	71
16	Eficiencia de encapsulamiento y actividad residual.	75

CAPÍTULO 9. REACCIONES DE HIDRÓLISIS Y METANÓLISIS DE ACEITE DE OLIVO POR CATÁLISIS ENZIMÁTICA

Tabla		Página
17	Intervalo de estudio de las variables.	85

NOMENCLATURA

ADP	= Agar dextrosa papa
DNA	= Ácido desoxirribonucleico
EMA	= Extracto de malta agar
FES	= Fermentación en estado sólido
FFA	= Ácidos grasos libres
FFA	= Ácidos grasos libres (Free fatty acids)
FSm	= Fermentación sumergida
FTIR	= Espectroscopía de IR por Transformadas de Fourier
Novozym 435	= Lipasa de Candida antártica inmovilizada en resina de acrílico
PCR	= Reacción en cadena de polimerasa (Polymerase chain reaction)
<i>p</i> -NPB	= <i>p</i> -Nitrofenil Butirato
<i>p</i> -NPB	= <i>p</i> -Nitrofenil Butirato
PVA	= Alcohol polivinílico
PVA	= Alcohol polivinílico
SmF	= Fermentación sumergida (Submerged fermentation)
SSF	= Fermentación en estado sólido (Solid state fermentation)
TAG	= Triglicéridos
TAG	= Triglicéridos
WBC	= Salvado de trigo-bagazo de higuera
WBO	= Salvado de trigo-aceite de olivo

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1 INTRODUCCIÓN

La protección al ambiente y la reducción de las reservas de petróleo se han convertido en los retos principales que tiene que enfrentar la industria petrolera. El biodiesel ha atraído considerable atención durante la pasada década por ser un combustible renovable, biodegradable y no tóxico. El biodiesel se deriva de triglicéridos o de ácidos grasos libres por reacciones de transesterificación o esterificación con alcoholes de cadena corta.

La industria global del biodiesel ha crecido significativamente durante la pasada década. La producción de biodiesel en la Unión Europea ha presentado un crecimiento promedio anual del 54%. Como resultado de esto, la producción se incrementó de 1.9 millones de toneladas en el 2004 a 11 millones de toneladas en el 2011 [1]. La producción de biodiesel en los Estados Unidos también ha presentado un crecimiento marcado en los pasados años. Estados Unidos incrementó su producción de 2 millones de galones en el 2000 a 967 millones de galones en el 2011 [2]. Una rápida expansión en la capacidad de producción de biodiesel se ha observado no solamente en los países desarrollados sino también en países en desarrollo, tales como, China, Brasil, Argentina, Indonesia y Malasia. Se estima que el mercado mundial del biodiesel alcanzará los 37, 000 millones de galones para el 2016, con un crecimiento anual promedio de 42%. Europa continuará como el principal productor de Biodiesel en el mercado seguido de cerca por Estados Unidos para la siguiente década [3].

La principal tecnología a nivel global para la producción de biodiesel es la transesterificación homogénea alcalina (o alcoholólisis). En esta reacción un alcohol de cadena corta (usualmente metanol o etanol), se adiciona al aceite o grasa en presencia de un catalizador (bases y ácidos de Brønsted), generando una mezcla de glicerol y alquil ésteres de ácidos grasos llamada biodiesel. Catalizadores alcalinos, especialmente el hidróxido de sodio se ha convertido en el catalizador químico predominante debido a su bajo costo y rápida cinética [4]. La transesterificación homogénea alcalina presenta algunas desventajas tales como la necesidad de materias primas (aceites refinados y alcoholes) con bajo contenido de ácidos grasos libres, fosfolípidos y agua, exceso de alcohol y catalizador para

evitar reacciones reversibles, las cuales eventualmente dificultan la separación del biodiesel y la glicerina. Por lo tanto, catalizadores alternos han sido estudiados por ejemplo, bases orgánicas, complejos metálicos, óxidos, aluminosilicatos y enzimas. La principal característica de las enzimas es que pueden ser reusadas y no presentan la formación de jabón, facilitando la separación de los productos al final de la alcoholisis [5]. Por lo tanto el uso de biocatalizadores presenta ventajas sobre el proceso químico y éstas incluyen la esterificación tanto de triglicéridos como de ácidos grasos, la generación de un glicerol más limpio y el reúso en el caso de lipasas inmovilizadas. Sin embargo, existe la necesidad de resolver algunos problemas como el alto costo de las lipasas y su posible inhibición por la presencia de alcoholes de cadena corta, glicerol y otras impurezas presentes en las materias primas [4]. Por lo tanto, es de interés realizar un estudio de producción de lipasas para su utilización como biocatalizadores en la reacción de transesterificación evitando las reacciones paralelas e inconvenientes presentes en el proceso químico y caracterizar la lipasa obtenida, determinando los parámetros cinéticos óptimos de su actividad.

1.2 HIPÓTESIS

1. Es posible producir enzima lipasa a partir de hongos filamentosos, con alta actividad lipolítica, para su utilización como biocatalizador en las reacciones de hidrólisis, esterificación y transesterificación de grasas y aceites en la producción de metil ésteres.
2. Es factible establecer los parámetros óptimos de actividad lipolítica utilizando la lipasa producida y preservada por liofilización para su aplicación en reacciones de transesterificación utilizando metanol como donador de grupos acilos.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo general

Desarrollar un método de producción de enzima lipasa a partir de fermentaciones de hongos filamentosos la cual sea utilizada como biocatalizador en la producción enzimática de biodiesel.

1.3.2 Objetivos específicos

1. Estimar la generación preliminar de biodiesel a partir de residuos de la industria de cárnicos en Baja California.
2. Identificar las características taxonómicas de hongos filamentosos productores de lipasa por cultivos en medios selectivos.
3. Establecer la actividad lipolítica de las lipasas producidas a partir de hongos filamentosos por comparación en fermentación sumergida y fermentación en estado sólido.
4. Caracterizar la lipasa producida para la determinación de parámetros óptimos de actividad enzimática.
5. Inmovilizar la enzima en diferentes soportes hidrofílicos para su reutilización
6. Realizar reacciones de hidrólisis, esterificación y transesterificación catalizadas por la lipasa producida, utilizando aceite de olivo y metanol como materias primas e isooctano como co-solvente.

El desarrollo de cada objetivo específico de este estudio fue escrito en un capítulo por separado. Previo a estos capítulos se incluyó un capítulo de antecedentes generales.

CAPÍTULO 2

ANTECEDENTES GENERALES

2.1 BIODIESEL

El biodiesel es una mezcla de alquil ésteres de ácidos grasos y debido a sus propiedades similares con las del combustible diesel, puede ser utilizado como un sustituto natural de éste. El biodiesel es un combustible derivado de fuentes renovables, principalmente de aceites vegetales y grasas animales. Estas mezclas de ácidos grasos (FFA) y triglicéridos (TAG) se transforman en biodiesel a través de una reacción de transesterificación [6]. Los catalizadores investigados para esta reacción han sido ácidos y bases, ya sea líquidos o heterogéneos y también enzimas libres o inmovilizadas [7].

2.1.1 Métodos de producción de biodiesel

Actualmente el método más utilizado a nivel industrial en la producción de biodiesel es por transesterificación alcalina, donde la materia prima con altos contenidos de agua o ácidos grasos libres necesita pretratamiento con un catalizador ácido para esterificar los FFA [8] . El pretratamiento, ilustrado en la Figura 1, es necesario para reducir la formación de jabón durante la reacción y facilitar el manejo de la separación del biodiesel y del glicerol con la remoción del catalizador y del agua residual alcalina [7]. La cantidad de agua residual generada en una planta tradicional de biodiesel es aproximadamente 0.2 de tonelada por tonelada de biodiesel producido [9].

Eventualmente el tratamiento del agua residual y la necesidad del reúso de agua son un severo problema tanto desde el punto de vista de consumo de energía como ambiental. Por el contrario, la catálisis enzimática no forma jabones y puede esterificar a los FFA y TAG en una sola etapa de proceso sin necesidad del subsecuente lavado.

Las enzimas constituyen una interesante alternativa en la producción a escala industrial para la reducción de costos de producción. Este es especialmente el caso cuando se utilizan materias primas con alto contenido en FFA, tal como el aceite de arroz integral [10], aceite no comestible de la *Jatropha curcas* [11] o materias primas de segunda generación como aceites reusados, grasa animal y residuos similares con alto contenido de FFA y agua. Estos

materiales reducirían más el costo de producción del biodiesel al ser menos costosos que los aceites vírgenes [12].

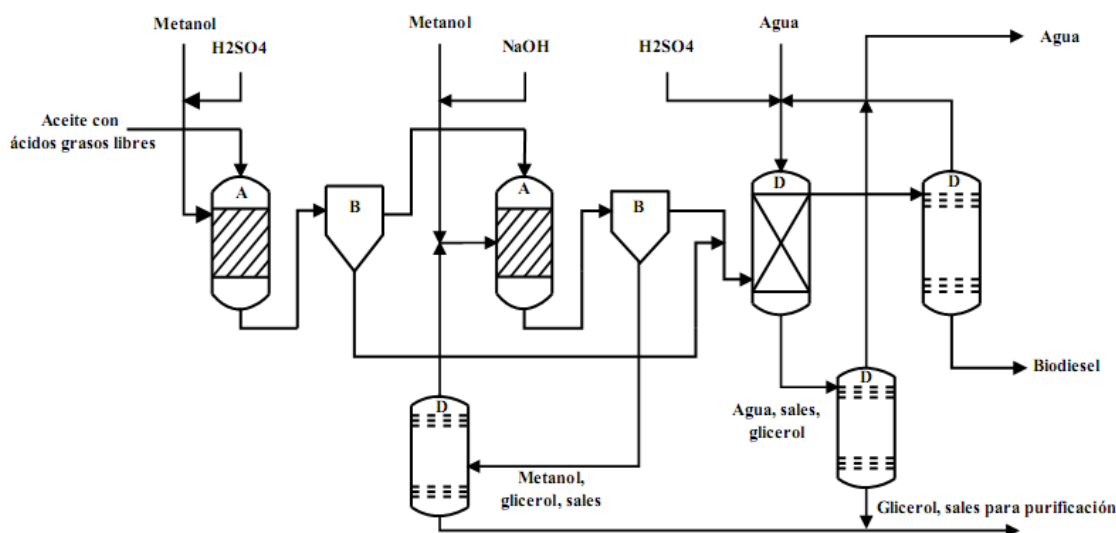


Figura 1. Proceso convencional de producción de biodiesel con pretratamiento ácido seguido de catálisis alcalina. (A) Reactor, (B) Separador, (D) Purificación de producto y recuperación de metanol.

Las principales ventajas del uso de las lipasas como biocatalizadores son las moderadas condiciones de reacción y la fácil recuperación del glicerol sin purificación o producción de residuos químicos, con el resultado de un producto de alta pureza. Aunado a esto, el contenido de ácidos grasos libres en el aceite puede convertirse completamente a metil ésteres sin la formación de jabón, por lo tanto se incrementa el rendimiento de biodiesel y se reducen los costos por purificación del combustible. La transesterificación de triglicéridos usando lipasas se considera uno de los más eficientes procesos de la producción de biodiesel a partir de aceites residuales [13]. Es evidente la simplicidad del procedimiento enzimático el cual se muestra en la Figura 2.

A pesar de las numerosas ventajas, el proceso enzimático presenta inconvenientes tales como: bajas velocidades de reacción, elevado costo de la enzima para escala industrial comparado con el costo del catalizador álcali y baja estabilidad enzimática en presencia de exceso de metanol [13]. Para poder hacer la transesterificación enzimática competitiva a escala industrial existen varios aspectos que tienen que resolverse: adecuación del solvente, inmovilización de la lipasa, la selección del aceptor acilo y la selección del reactor entre otros.

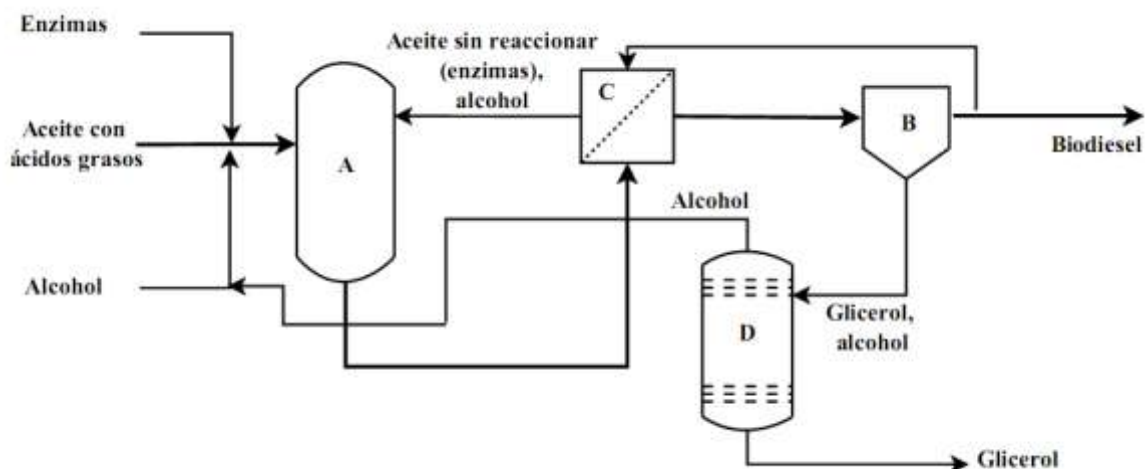


Figura 2. Diseño de proceso ideal para la producción enzimática de biodiesel. (A) Reactor; (B) Separación (centrífuga); (C) Filtro; (D) Recuperación de alcohol [13].

2.2 MATERIAS PRIMAS PARA LA PRODUCCIÓN DE BODIESEL

La principal materia prima para la utilización de las lipasas son las grasas y los aceites. Estos materiales están compuestos principalmente de triglicéridos, los cuales son glicerol ésteres con ácidos grasos saturados e insaturados de origen vegetal, animal o microbiológico. Una característica que distingue las grasas de los aceites es la ocurrencia de ácidos grasos insaturados y saturados en los triglicéridos: alto contenido de ácidos grasos saturados (ejemplo en Figura 3.), se refleja en altos puntos de fusión y la presencia de residuos sólidos a temperatura ambiente, lo cual es una característica de las grasas; por otro lado, los aceites presentan una elevada ocurrencia de ácidos grasos insaturados, lo que les permite permanecer líquidos a temperatura ambiente. Los aceites vegetales, además de los triglicéridos pueden presentar di- y monoglicéridos, ácidos grasos libres (FFA), fosfolípidos y materia insaponificable, tal como carotenoides, fitoesteroles, y clorofila [14].

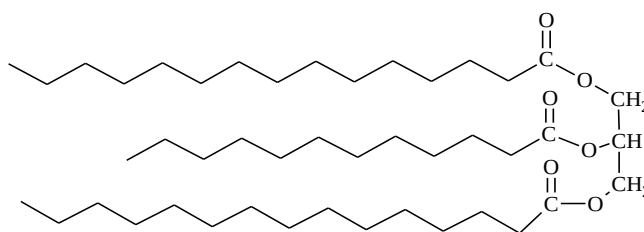


Figura 3. Representación esquemática de un triglicérido con ácidos grasos saturados

La función de las grasas y aceites en las plantas está relacionada con la reserva de energía, protección contra la pérdida de agua (por la formación de cera) y contra daños mecánicos (por generación de hormonas), cuando dichos componentes aparecen en hojas y frutos [15]. Es tal la importancia de los aceites y grasas en industria a nivel mundial, que la producción para la temporada 2010/2011 se estimó en 174.6 millones de toneladas. De ésta, el 86% representa aceites vegetales (Tabla 1), con las semillas de soya, palma, canola y girasol como principales fuentes [16].

Tabla 1. Distribución de cosecha mundial de grasas y aceites [16].

Grasas y aceites	Producción mundial (millón ton)	Principales productores
Grasa animal	24.4	Estados Unidos, China, Brasil, Alemania y Francia
Coco	3.7	Filipinas, Indonesia, India, Vietnam y México
Algodón	4.8	China, India, Pakistán, Uzbekistán y Estados Unidos
Nuez	5.3	China, India, Nigeria, Myanmar y Sudán
Lino	0.6	China, Bélgica, USA, Etiopía e India
Maíz	2.3	Estados Unidos, China, Japón, Brasil y Sudáfrica
Olivo	2.9	España, Italia, Grecia, Arabia Saudita y Túnez
Palma	23.9	Malasia, Nigeria, Tailandia, Colombia y Costa de Marfil
Canola	21.2	China, Alemania, India, Canadá y Francia
Cártamo	0.1	India, Estados Unidos y Argentina
Sésamo	0.9	Myanmar, China, India, Sudán y Japón
Soya	36.0	Estados Unidos, China, Brasil, Argentina e India
Girasol	13.0	Federación Rusa, Ucrania, Argentina, Turquía y Francia

Algunos cultivos de semillas oleaginosas, como la higuera (*Ricinus communis*), jatropha (*Jatropha curcas*), crambe (*Crambe abyssinica*), palma macaw (*Acrocomia aculeata*) y oiticica (*Licania rigida*), se han explorado como materias alternativas para la producción de biodiesel debido a su alta tolerancia a sequías y heladas, alta productividad y suelos de baja fertilidad [17]. El uso de materias primas con apropiadas características fisicoquímicas y amplia disponibilidad favorece la reducción de costos para la producción del

biocombustible, debido a que el costo por materia prima representa del 70-88% del precio final del biodiesel [18].

2.2.1 Perfil de Ácidos Grasos.

El perfil de ácidos grasos varía grandemente entre grasas y aceites y puede ser referido por su nomenclatura (Tabla 2).

Tabla 2. Nomenclatura de ácidos grasos [19]

Nombre común	Nombre sistemático	Estructura química ¹ x:y	Punto de fusión (°C)
Ácido Láurico	Ácido Dodecanoico	12:0	44.2
Ácido Mirístico	Ácido Tetradecanoico	14:0	54.4
Acido Palmítico	Acido Hexadecanoico	16:0	62.9
Acido Palmitoleico	Acido 9-Hexadecenoico	16:1	-0.1
Acido Estearico	Acido Octadecanoico	18:0	70.1
Acido Oleico	Acido 9-Octadecenoico	18:1	16.3
Acido Elaídico	Acido 9-Octadecenoico	18:1	43.7
Ácido Vacénico	Acido 11-Octadecenoico	18:1	44.0
Acido Linoleico	Acido 9, 12-Octadecadienoico	18:2	-6.5
Acido γ -Linolénico	Acido 6, 9, 12-Octadecatrienoico	18:3	-11.0
Acido α -Linolénico	Acido 9, 12, 15-Octadecatrienoico	18:3	-12.8
Acido Araquídico	Acido Eicosanoico	20:0	76.1
Acido Gadoleico	Acido 9-Eicosanoico	20:1	25.0
Acido Araquidónico	Acido 5, 8, 11, 14-Eicosatetraenoico	20:4	-49.5
Acido Behénico	Acido Docosanoico	22:0	80.0
Acido Erúxico	Acido 13-Docosenoico	22:1	33.4

¹ x:y nomenclatura, x representa el número total de carbonos, y representa el número de insaturaciones.

Puede comprender desde altas concentraciones de ácidos grasos saturados, como los aceites de palmas, tales como el de coco (*Cocos nucifera*), aceite de palma (*Elaeis guineensis*), y babasú (*Orbignya oleífera*) (Tabla 3), y grasas animales también (Tabla 4), hasta alto contenido de ácidos grasos monoinsaturados, que se encuentran comúnmente en frutas

oleaginosas (Tabla 5). Existen ciertamente, algunas excepciones de perfiles típicos, tales como el aceite de higuera, el cual tiene un alto contenido de ácido ricinoleico; el aceite de crambe con alto contenido en ácido erúico; el aceite de palma con similares cantidades de ácidos grasos saturados e insaturados (Tabla 3) [19].

Tabla 3. Perfil de ácidos grasos de cultivos [19]

Ácidos grasos ¹	Palma	Soya	<i>Jatropha curcas</i>	Crambe	Canola	Girasol	Higuera	Babassú
12 : 0	41-55	NR	NR	NR	NR	NR	NR	40-50
14 : 0	14-18	NR	NR	NR	<0.2	<0.5	NR	11-27
16 : 0	6.5-10.0	7-14	10-17	1.8-2.0	2.5-6.5	3.0-10.0	1.1	5.2-11.0
16 : 1	NR	<0.5	NR	NR	<0.6	<0.1	0.2	NR
18 : 0	1.3-3.0	1.4-5.5	5-10	0.7-1.0	0.8-3	1-10	1	1.8-7.4
18 : 1	12-19	19-30	36-64	16.0-17.2	53-70	14-35	3.3 ²	9-20
18 : 2	1-3.5	44-62	18-45	8.0-8.7	15-30	55-75	3.6	1.4-6.6
18 : 3	NR	4-11	NR	5.2-7.0	5-13	<0.3	0.32	NR
20 : 0	NR	<1.0	NR	3.4	0.1-1.2	<1.5	0.4	NR
20 : 1	NR	<1.0	NR	NR	0.1-4.3	<0.5	NR	NR
22 : 0	NR	<0.5	NR	NR	<0.6	<1.0	NR	NR
22 : 1	NR	NR	NR	56-66	0.7	NR	NR	NR
% aceite	45-50	18-20	26-35	35-60	40-50	22-36	35-55	65-68

¹ x : y nomenclatura, donde x representa el número total de átomos de carbono, y representa el número de insaturaciones, ²80-90% de ácido ricinoleico (similar al ácido oleico más un grupo hidroxilo en la posición 12). NR : no reportado.

Adicional a las fuentes de lípidos vegetal y animal presentadas en las Tablas 3-5, los ácidos grasos también pueden ser de origen microbiano. Recientemente revisado por Li et al. [20], las levaduras de los géneros *Cryptococcus*, *Lipomyces*, *Rhodospiridium*, *Rhodotorula*, *Trichosporon* y *Yarrowia* y también hongos filamentosos y bacterias pueden presentar hasta el 53% de contenido de lípidos en su masa seca, con mayor proporción de ácidos palmítico y oleico. En otro trabajo, se determinaron los perfiles de ácidos grasos de las microalgas *Spirulina sp.*, *Scenedesmus obliquus*, *Chlorella vulgaris* y *C. kessleri* [21]. Los autores observaron la prevalencia de ácidos grasos saturados (láurico, mirístico, palmítico y esteárico), con contenidos hasta de 46% en ácidos grasos totales. Esta diversidad de perfiles de ácidos grasos contribuye a la generación de biocombustibles con diferentes propiedades.

Por ejemplo, a mayor longitud de cadena de hidrocarburo en el ácido graso, mayor punto de enturbiamiento. Por esta razón la necesidad de calentamiento antes de la ignición del motor, se torna difícil el uso de un biodiesel con tales características sobre todo en regiones con bajas temperaturas ambientales.

Tabla 4. Perfil de ácidos grasos de origen animal [19]

Ácidos grasos	Mantequilla	Manteca	Sebo
< 14 : 0	11.0-23.8	0.5	0.9
14 : 0	8.2-12.0	1.3	3.0-3.7
16 : 0	21.3-29.0	23.8-25.0	24.9-27.0
18 : 0	9.8-13.0	12.0-13.5	7.0-18.9
16 : 1	1.8-2.0	2.7-3.0	4.2-11.0
18 : 1	20.4-28.0	41.2-45.0	36.0-48.0
18 : 2	1.8	10.0-10.2	3.1
18 : 3	1.2	1.0	0.6
% <i>grasa</i>	2-5	70-95	70-95

Tabla 5. Perfil de ácidos grasos de frutas [19]

Ácidos grasos	Aceituna	Aguacate	Nuez de Palma
12 : 0	NR	NR	0.1-1.0
14 : 0	0.7	<0.13	0.9-1.5
16 : 0	10-11.7	19.8-22.7	41.8-46.8
18 : 0	2.1	0.5-1.0	4.2-5.1
20 : 0	0.48	NR	0.2-0.7
16 : 1	1.45	3.9-5.6	0.1-0.3
18 : 1	73.8-78.0	60-71	37.3-40.8
18 : 2	7.0-9.8	7.1-15.3	9.1-11.0
18 : 3	NR	0.4-1.0	<0.6
% <i>aceite</i>	15-40	4-25	20-24

Otro factor concerniente al uso de ácidos grasos insaturados para la producción de biodiesel es que un menor número de dobles enlaces en las moléculas da como resultado un número de cetano alto del biocombustible (lo que significa una mejor calidad de combustión).

Grandes cantidades de enlaces insaturados generan moléculas químicamente inestables. Esto presenta inconvenientes debido a la oxidación, degradación y polimerización del biocombustible. En general, un biodiesel con altas cantidades de ésteres derivados de ácidos grasos monoinsaturados (ejemplo, ácidos oleico y ricinoleico) presentan mejores resultados como combustible [4].

2.2.2 Procesado de Grasas y Aceites.

El procesamiento de la grasa animal se le llama proceso de rendimiento, donde osamenta con material graso son tratados con vapor para la liberación de la grasa, con la subsecuente separación por centrifugación o por prensado. El procesado del aceite vegetal comprende algunos pasos, incluyendo pretratamiento mecánico (limpieza, clasificación y trituración), calentamiento, deshidratación, extracción por prensado mecánico y/o extracción por solventes, destilación de micela, desasolvatación y refinado [22].

Para la producción del biodiesel, el proceso de refinación del aceite juega un papel importante en el rendimiento de la etapa de conversión, debido a que las impurezas, como el agua, fosfolípidos y pigmentos pueden afectar la conversión de la mezcla de reacción y dificultar la separación del biodiesel, entre otros [22]. Otro factor importante del procesado de la materia prima es la valoración de los subproductos. Tal acercamiento contribuye a las ganancias de una planta industrial. Un ejemplo clásico es la harina de soya generada durante la extracción del aceite la cual se utiliza para la extracción de proteína e isoflavonas [23] y principalmente la obtención de la lecitina separada durante el desgomado que se utiliza como emulsificador natural [24].

2.3 PRODUCCIÓN ENZIMÁTICA.

Las lipasas son enzimas clasificadas como hidrolasas (glicerol éster hidrolasa, E.C. 3.1.1.3) y actúan en el enlace éster de diferentes compuestos, siendo los acilgliceroles los más apropiados sustratos. Catalizan reacciones de hidrólisis, síntesis trans- e interesterificación. La Figura 4 muestra las diferentes reacciones catalizadas por las lipasas.

Las lipasas son más activas en sustratos insolubles, especialmente en triglicéridos con ácidos grasos de cadenas por arriba de los diez átomos de carbono, mientras que las esterases son activas en sustratos solubles, especialmente ésteres simples, como el acetato

de etilo y triglicéridos con ácidos grasos de cadenas cortas con menos de seis carbonos. Las esterasas siguen la cinética de Michaelis-Menten, mientras que las lipasas necesitan una mínima concentración de sustrato para mostrar altos niveles de actividad [25].

La hipótesis más aceptada del mecanismo de catálisis de la lipasa es similar al de la catálisis de la serina proteasa debido a la similitud en el triad catalítico encontrado en las lipasas [26].

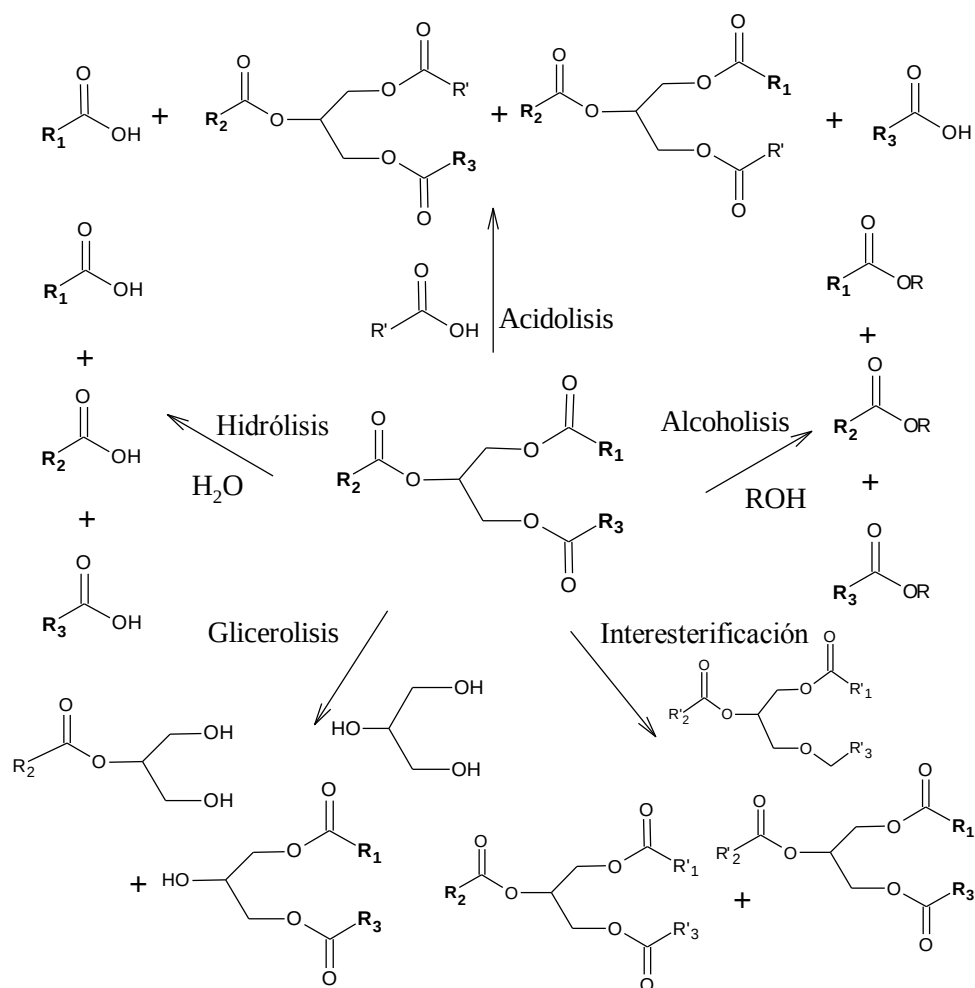


Figura 4. Reacciones catalizadas por lipasas

La reacción inicia con un ataque nucleofílico en el carbono del éster del sustrato por un grupo oxhidrilo de la serina residual del sitio activo, formando un complejo acil-enzima y liberando alcohol del lípido. Después, el complejo acil-enzima se hidroliza liberando a la lipasa regenerada.

La característica de su alta estabilidad en presencia de solventes orgánicos y de no requerir de cofactores para su acción, la ha convertido en un grupo de enzimas de gran interés tecnológico [27].

Las lipasas se encuentran ampliamente en la naturaleza y son producidas por muchos microorganismos y eucariotas superiores. En animales las lipasas del páncreas de cerdo y del humano son las mejor conocidas y más investigadas. En estos organismos, las lipasas actúan en diferentes etapas del metabolismo de lípidos incluyendo la digestión, adsorción y reconstitución de grasas y en el metabolismo de lipoproteínas.

En las plantas las lipasas están presentes en las semillas de plantas superiores como la higuera y la canola. También se encuentran en varias plantas en tejidos de reserva de energía [28]. Sin embargo, industrialmente se prefieren los microorganismos como fuentes de producción de lipasas debido a los cortos tiempos de generación, alto grado de conversión del sustrato en producto, gran versatilidad de adaptación al ambiente, simplicidad de manejo genético y condiciones de cultivo.

Los microorganismos, por lo general, producen varios tipos de lipasas con distintas especificidades de acuerdo a la utilización del sustrato y también al pH óptimo y rango de temperatura. Las lipasas pueden ser producidas por bacterias, hongos filamentosos y levaduras, permitiéndoles usar los lípidos de origen animal o vegetal como fuentes de carbono y energía para su crecimiento. Muchos microorganismos han sido reportados como productores de lipasas, especialmente los géneros *Candida*, *Rhizopus* y *Pseudomonas* son considerados las principales fuentes de lipasas industriales [27].

La Tabla 6 muestra un resumen de la producción de la lipasa. El uso de las lipasas en la industria todavía es limitado debido al costo de las enzimas comerciales, especialmente cuando se requieren grandes cantidades de enzima y cuando el producto final es de un bajo

costo agregado. Existe, por lo tanto un considerable interés por reducir los costos de producción de estos biocatalizadores.

El uso de la fermentación en estado sólido (SSF) como método de producción es una forma de reducir los costos de producción de la enzima, especialmente debido a que residuos agroindustriales pueden ser utilizados como medios de cultivo.

Un análisis económico comparativo mostró que la producción de lipasa a partir de *Penicillium restrictum* por SSF es económicamente más factible que su producción por fermentación sumergida (SmF), con un costo de producción del primero de 68% por debajo y un tiempo de recuperación de 1.5 años [29].

Lipasas a partir de diferentes microorganismos se han venido produciendo por SSF utilizando diferentes residuos sólidos, la mayoría en bioreactores de charolas y rindiendo altos niveles de productividad [30].

Tabla 6. Estudios en producción de lipasas microbianas

Microorganismo	Sustrato	Tipo de fermentación	Máxima actividad (tiempo de fermentación)	Referencia
<i>A. niger</i> 11T53A14	Salvado de trigo	SSF	62.7 U.g ⁻¹ (48 h)	[31]
<i>Penicillium</i> sp.	Aceite de olivo	SmF	21.0 U.g ⁻¹ (120 h)	[32]
<i>Rhizopus oryzae</i> NRRL 3562	Aceite de coco	SSF	96.2 U.g ⁻¹ (115 h)	[33]
<i>Bacillus subtilis</i> OCR-4	Bagazo de nuez	SSF	4.5 U.g ⁻¹ (48 h)	[34]
<i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11	Bagazo de caña azúcar	SSF	234 U.g ⁻¹ (96 h)	[35]
<i>Rhizopus chinensis</i>	Salvado de trigo, harina de trigo y aceite de olivo	SSF	24.4 U.g ⁻¹ (72 h)	[36]
<i>Pseudozyma hubeiensis</i> HB85A	Aceite de soya	SmF	5.3 U.g ⁻¹ (18 h)	[37]
<i>P. chrysogenum</i>	Grasa residual y salvado de trigo	SSF	46 U.g ⁻¹ (168 h)	[38]

SSF: Fermentación en estado sólido; SmF: Fermentación sumergida.

Las lipasas son enzimas altamente hidrofóbicas debido a la presencia de grupos alquilo en la superficie de su estructura [26]. Generalmente el primer paso para la purificación de las lipasas es el uso de cromatografía de interacción-hidrofóbica. Normalmente la prepurificación involucra la precipitación con sulfato de amonio, cromatografía de intercambio iónico y filtración en gel, entre los más utilizados [39].

Una lipasa de *Aspergillus niger* F044 fue purificada por precipitación con sulfato de amonio, DEAE-Sepharosa FF (intercambio iónico) y Sephadex G-75 (filtración en gel). Se obtuvo un rendimiento del 33% y el factor de purificación fue 73 [40].

Para purificar una lipasa de *Penicillium camembertii* U-159, Isobe et al. [41] utilizaron precipitación con etanol y con sulfato de amonio como primer y segundo pasos. Una secuencia de pasos por cromatografía se siguió posteriormente usando DEAE-Sepharosa (intercambio iónico), amino octil sepharosa (interacción hidrofóbica) y concanavalin-A sepharosa (afinidad). El rendimiento obtenido fue 27% y el factor de purificación fue 213.

Dependiendo de la fuente, las lipasas pueden presentar masa molar en un rango de 20 a 75 kDa, actividad enzimática a pH entre 4 y 9 y temperaturas desde 27 hasta 70°C.

Las lipasas son por lo general estables en soluciones acuosas neutras a temperatura ambiente, presentando en la mayoría de los casos una actividad óptima a 30-40°C. Su termoestabilidad puede variar considerablemente dependiendo del origen y de acuerdo a Sharma et al. [27], las lipasas microbiológicas presentan la mejor termoestabilidad.

La mayoría de las preparaciones lipolíticas comerciales están compuestas de mezclas de varias isozimas en diferentes proporciones, por ejemplo como las obtenidas a partir de *Candida rugosa*, *Candida antarctica*, *Rhizopus niveus* y *Chromobacterium viscosum*, entre otros. Cada isoforma tiene diferentes propiedades (por ejemplo, masa molar, especificidad, estereoselectividad, glicosilación, y preferencia de sustrato) [39].

Las principales fuentes de lipasas y sus propiedades se describen en la tabla 7.

Tabla 7. Fuentes de lipasas y condiciones óptimas de acción

Fuente	pH	T (°C)	Referencia
<i>Candida rugosa</i>	5-8	35-50	[42]
<i>Candida antarctica</i> A	6-10	35-70	[43]
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	6-9	30-50	[44]
<i>Aspergillus niger</i>	6-9	30-50	[40]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5.5-7.5	35-45	[45]
<i>Bacillus subtilis</i>	8-10	30-40	[46]
<i>Geotrichum candidum</i>	6.5-8.0	32-42	[47]
<i>Streptomyces rimosus</i>	8.5-10.0	45-60	[48]
<i>Yarrowia lipolytica</i>	4-7	30-45	[49]
<i>Rhizopus niveus</i>	5-7	30-45	[50]
<i>Rhizomucor miehei</i>	6.5-7.5	30-40	[51]
<i>Porcine pancreatic</i>	6-9	40-55	[50]
<i>Ricinus communis</i>	4.0-4.5	30-35	[52]

2.3.1 Pretratamiento

En la transesterificación enzimática, se logran altos rendimientos en la producción de biodiesel cuando se utilizan aceites refinados, si se compara con el uso de aceites crudos. Esto se debe a la presencia de compuestos fosfolípidos en los aceites no refinados, los cuales afectan la interacción entre la lipasa y el sustrato debido a la posible oclusión de los poros en el soporte de la lipasa cuando se utiliza lipasa inmovilizada. Por lo tanto, debe hacerse por lo menos la operación de desgomado antes de la reacción de transesterificación para obtener una mejor producción de biodiesel [4-5]. El desgomado del aceite se realiza por el método tradicional utilizando desgomado con agua, ultrafiltración y principalmente tratamiento ácido (ácido fosforoso o cítrico).

Desde 1990 se han reportado métodos enzimáticos de desgomado de aceites. Se presenta como una alternativa potencial a los procesos convencionales [53]. Esto involucra a las fosfolipasas, las cuales se clasifican en cuatro grupos. Las fosfolipasas tipo A1 (E.C.3.1.1.32) y A2 (E.C.3.1.1.4) catalizan el enlace éster en los fosfolípidos, liberando FFA y contribuyendo al incremento de rendimiento global del biodiesel. También existen

las fosfolipasas tipo C (E.C. 3.1.4.3) y tipo D (E.C. 3.1.4.4). Estas dos últimas están involucradas en el rompimiento de enlaces fosfato en los fosfolípidos y no contribuyen al incremento del contenido de los FFA en el aceite [54]. El desgomado enzimático se realiza a temperaturas normales (40-45°C) y a pH de 4.5-5.0 por períodos de 2-4 horas [55].

2.3.2 Enzimas libre e inmovilizada

El uso de enzimas libres para la producción de biodiesel da como resultado limitaciones técnicas y no confiables desde el punto de vista de práctico debido a la imposibilidad para su recuperación y reúso, lo que eventualmente encarece los costos de producción y se contamina el producto con enzima residual. Estas dificultades se pueden superar por el uso de estas lipasas en su forma inmovilizada, permitiendo el reúso del biocatalizador repetidas veces con lo que se reduce el costo y se mejora la calidad del producto [56].

Se han citado diferentes técnicas para la inmovilización de las lipasas, tales como adsorción, enlace covalente, atrapamiento, encapsulado y entrecruzamiento.

Nielsen et al. [57] revisaron los aspectos técnicos y económicos de la producción del biodiesel y concluyeron que la viabilidad de la producción de biodiesel enzimático utilizando lipasas inmovilizadas, las enzimas deben ser estables para producir 1200-7400 kg de biodiesel por cada kg de preparación enzimática, dependiendo de la fuente del sustrato y de la lipasa utilizada. La actividad catalítica y otras características de las enzimas pueden cambiar dependiendo del tipo de inmovilización y de la fuerza de interacción entre la enzima y el soporte utilizado, el cual en algunos casos puede causar distorsiones estructurales en la proteína.

La actividad catalítica en un medio particular puede cambiar al incrementar o disminuir la agitación, debido a la fragmentación del soporte por interacción entre el sistema de agitación y el soporte [56]. Por lo tanto es posible que ocurra pérdida de actividad durante la reacción de transesterificación, aún cuando se use lipasa inmovilizada, lo cual sea debido a pérdida de lipasa y no por inactivación enzimática. Por otro lado, si tal pérdida de lipasa no ocurre y la enzima permanece unida al soporte, el incremento de superficie de contacto puede favorecer al incremento de transferencia de masa y por lo tanto incrementar la eficiencia de la enzima como catalizador. Lipasas a partir de diferentes fuentes han sido

inmovilizadas y utilizadas en la producción de biodiesel, pero la más comúnmente reportada ha sido la lipasa obtenida a partir de *Pseudozyma antártica* y *Thermomyces lanuginosus* [58].

2.3.3 Uso de solventes

La producción enzimática del biodiesel puede realizarse usando solventes orgánicos (hexano, heptanos o éter de petróleo) o simplemente usando una mezcla de sustratos (lípidos y alcohol) dependiendo de la longitud de la cadena del alcohol. Si se utiliza metanol o etanol, un solvente puede facilitar la solubilidad del aceite en el alcohol y también disminuir la viscosidad de la mezcla reactiva, pero se tendría un costo adicional por la remoción del solvente (destilación o extracción) después de la reacción [59].

Knothe et al. [4] reportaron que la producción de biodiesel a partir de aceite de girasol usando éter de petróleo como solvente con lipasa de *Pseudomonas fluorescens* inmovilizada, alcanzó el 99% de rendimiento cuando se utilizó metanol, etanol o 1-butanol. En ausencia de solvente, los rendimientos se reducen al 30, 70 y 76% respectivamente.

Soetaert y Vandamme [60] reportaron el uso de lipasas a partir de *Mucor miehei* y *C. antártica* en la transesterificación de varios aceites usando hexano como solvente y encontraron que la lipasa de *Mucor miehei* es más eficiente en la conversión de alcoholes primarios (metanol, etanol, propanol y 1-butanol) con rendimientos de 95 y 98%, mientras que la lipasa de *C. antártica* es más apropiada para la conversión de alcoholes secundarios (isopropanol y 2-butanol) con rendimientos entre 61 y 84%. En la ausencia de solvente el rendimiento de los metil y etil ésteres decrece, particularmente cuando se utiliza metanol, con una reducción hasta de 19%.

2.3.4 Tipo de alcohol y agentes de adsorción

Muchos tipos de alcohol se pueden usar en la reacción de transesterificación enzimática. Algunos ejemplos se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Condiciones reportadas para la transesterificación enzimática de algunos aceites y grasas [61]

Alcohol	Fuente de lipasa	Materia prima	Solvente	Rendimiento (%)
Metanol	<i>C. antarctica</i>	Aceite de canola	Hexano	98
Metanol	<i>C. antarctica</i>	Aceite de algodón	-	92
Metanol	<i>C. antarctica</i>	Aceite de algodón	t-Butanol	97
Metanol	<i>C. antarctica</i>	Aceite de soya	-	94
Metanol	<i>T. lanuginosus</i>	Aceite de soya	-	90
Etanol	<i>P. cepacia</i>	Sebo de res	-	95
Propanol	<i>P. fluorescens</i>	Aceite de girasol	1,4-Dioxano	>95
2-Etil-1-hexano	<i>C. rugosa</i>	Aceite de canola	-	97
Metanol	<i>P. cepacia</i>	Aceite de palma	-	15
Etanol	<i>P. cepacia</i>	Aceite de palma	-	72
Metanol	<i>Mucor miehei</i>	Aceite de soya	Hexano	75
Etanol	<i>Mucor miehei</i>	Aceite de soya	Hexano	97
Metanol	<i>Mucor miehei</i>	Sebo de res	Hexano	95
Etanol (96%)	<i>Mucor miehei</i>	Sebo de res	Hexano	98
Etanol anhidro	<i>Mucor miehei</i>	Sebo de res	Hexano	68
Propanol	<i>Mucor miehei</i>	Sebo de res	Hexano	24
Butanol	<i>Mucor miehei</i>	Sebo de res	Hexano	20
Propanol	<i>C. antarctica</i>	Sebo de res	Hexano	61
Butanol	<i>C. antarctica</i>	Sebo de res	Hexano	84

La relación molar con el sustrato es una variable de gran influencia en la síntesis del biodiesel. El exceso de alcohol con respecto a la relación estequiométrica 3/1, se utiliza para asegurar una mayor velocidad de reacción y minimizar limitaciones difusionales. Sin embargo, excesivos niveles de alcohol pueden inhibir a la enzima, especialmente aquellos de cadenas cortas. Esto reduce la estabilización y remueve la capa acuosa asociada con la enzima inmovilizada [62]. Este efecto fue observado por Brusamarelo et al. [63], para la transesterificación del aceite de soya. La relación óptima de etanol-aceite fue 6/1 con una conversión de 93% después de 480 min de reacción. Cuando se incrementaron las relaciones de alcohol-aceite (9/1 y 12/1), la conversión disminuyó a 51 y 55% respectivamente para el mismo tiempo de catálisis. Por lo tanto, la adición gradual de alcohol puede mantener una lipasa estable por períodos mayores. Pandey [5] reportó que la adición gradual de metanol (en tres etapas, cada 16 horas de reacción), manteniendo la

misma enzima en el bioreactor, produjo un rendimiento del 98% de biodiesel y que la conversión se mantuvo por encima de 95% durante 50 ciclos.

La adición de sílica al medio reactivo ejerce un efecto positivo en el rendimiento debido a la absorción del glicerol y el agua, disminuyendo la inhibición de la lipasa [4].

2.3.5 Contenido de agua

Las reacciones de alcoholólisis no involucran al agua como reactivo. Sin embargo, el control del contenido de agua en el sistema reactivo es importante por las siguientes razones: la lipasa requiere de un mínimo de agua para mantener su conformación activa; un exceso de agua puede promover la hidrólisis del sustrato y generar limitaciones de difusión del sustrato y por lo tanto reducir el rendimiento de biodiesel; el agua puede influenciar negativamente la reacción de transesterificación cuando se usa metanol o etanol, pero no afecta si se utilizan alcoholes de cadenas más largas [59].

Drapcho et al. [64] reportaron el uso de lipasa a partir de *Pseudomonas cepacia* inmovilizada en una matriz de sol-gel polimérica para la transesterificación de aceite de sebo a 40°C por 1 h usando una mezcla de 10 g de grasa, 3 g de preparación lipolítica, 3 g de metanol o 5 g de etanol y diferentes cantidades de agua. Los autores observaron que cuando la concentración de agua era menor de 0.2%, la conversión disminuía significativamente y que después de 11 ciclos de reúso, la actividad decrecía en un 10%.

Pandey [5] reporta el uso de lipasa a partir de *Chromobacterium viscosum* en la transesterificación del aceite de jatropha con una concentración del 10%. Cuando el biocatalizador se utilizó en su forma libre, se observó un rendimiento de 62%, mientras que cuando la lipasa fue inmovilizada en Celita 545 se obtuvo el 71% de rendimiento. La adición de 1% de agua a la preparación de lipasa libre y el 0.5% de agua a la enzima inmovilizada se alcanzaron rendimientos de biodiesel de 73% y 92% respectivamente.

2.3.6 Temperatura

Altas temperaturas de reacción, que suelen ser adecuadas para el uso de lipasa a corto plazo, puede no ser lo más apropiado cuando se considera el reúso de la enzima, debido a que el tiempo de vida media de las lipasas disminuye al incrementarse la temperatura.

Matassoli et al. [65] investigaron la influencia de la temperatura en la etanolisis del aceite de palma crudo catalizada con Lipozyme TL IM (3% p/p) con una relación molar etanol/aceite de 3/1, con la adición gradual del etanol. Observaron los mejores resultados a 50°C. Para la evaluación del efecto de la temperatura en la producción enzimática de biodiesel, Brusamarelo et al. [63] propusieron un modelo semiempírico. Los autores investigaron la producción de biodiesel a partir de aceite de soya utilizando una lipasa comercial Novozym 435, dentro de un rango de 45-70°C, observando el rendimiento más alto (92%) a 65°C.

2.3.7 Tipo y dosis de enzima

La cantidad de enzima adicionada a la reacción es un factor importante en la producción de biodiesel, debido a su efecto en la velocidad de reacción (a más alta dosis de enzima, mayor velocidad de reacción), pero existe un límite al cual la adición de más enzima ya no altera la velocidad de formación del producto o donde la cantidad de enzima utilizada hace al proceso prohibitivo. En este contexto, la producción enzimática de biodiesel se investigó usando dosis de lipasa *C. antarctica* (Novozym 435) de 1 a 20% (p/p) [63]. Los autores observaron la más alta conversión de los triglicéridos a etil ésteres (93%) cuando se utilizó el 10% (p/p) de enzima inmovilizada.

CAPÍTULO 3

EVALUACIÓN DE LA OBTENCIÓN DE BIODIESEL A PARTIR DE RESIDUOS DE LA INDUSTRIA DE CÁRNICOS.

3.1 RESUMEN

En los últimos cincuenta años, los combustibles derivados del petróleo han sido la principal fuente de energía en el mundo. Sin embargo, los altos costos del petróleo limitan su disponibilidad. Estudios prospectivos indican que los problemas económicos y ambientales inciden positivamente en la producción de biocombustibles a partir de biomasa y productos de desecho. Los metil ésteres de ácidos grasos a partir del sebo animal son considerados componentes potenciales para la producción de biodiesel que junto con la grasa residual en carne y huesos, constituyen una interesante fuente de materia prima para la producción de este biocombustible. Este trabajo presenta los inventarios regionales de la disponibilidad de grasa residual en rastros e industria de procesos cárnicos, así como el cálculo de la producción potencial de biodiesel. Se estimó que el biodiesel generado a partir del sebo de residuos cárnicos, combinado con el diesel de petróleo en una mezcla del 2% de biodiesel cubriría el 25% de los vehículos de carga y de pasajeros, registrados en el 2007 en Baja California.

3.2 OBJETIVOS

Los objetivos de este estudio fueron determinar el potencial que existe en el estado de Baja California para la producción de biodiesel a partir de desechos animales de la actividad ganadera, y la disponibilidad de los residuos grasos generados en los procesos de rendimiento de esa misma actividad.

3.3 INVENTARIO DE RASTROS E INDUSTRIAS DE RENDIMIENTO

Baja California tiene el 6° lugar nacional en producción de carne en canal bovino de acuerdo al Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) en su reporte de 2009. En el 2008 aproximadamente 327,086 cabezas de ganado (bovino, porcino, caprino y ovino) y 695,111 aves fueron sacrificados para producción de carne (cálculos propios en base a la información reportada por SIAP [66]). La Figura 5 muestra las cabezas de ganado

en pie en el 2008 para Baja California. El estado cuenta actualmente con 21 asociaciones ganaderas, 18 corrales de engorda, 6 rastros municipales y 4 establecimientos TIF (Tipo Inspección Federal).

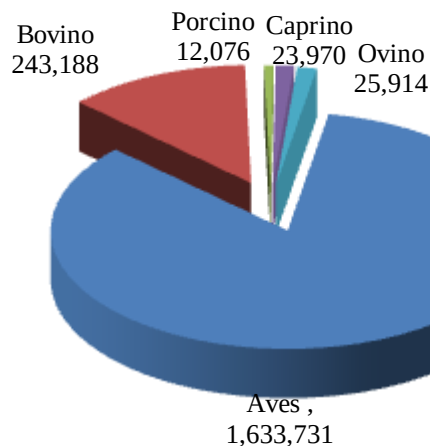


Figura 5. Ganado en pie en Baja California en 2008 [85].

3.4 EL SEBO EN EL PROCESO DE MATANZA

Los procesos de matanza generan grandes cantidades de residuos orgánicos que tienen el potencial para la producción de biocombustibles. Aproximadamente el 49% del peso de una res, el 44% del peso de un cerdo, el 37% del peso de aves son materiales no aptos para el consumo humano [67].

La composición de estos residuos varía, pero una aproximación global de sus valores sería 60% agua, 20% proteínas y minerales y 20% grasa antes de ser procesadas para rendimiento [68]. Estos materiales orgánicos son altamente perecederos y cargados de microorganismos, muchos de los cuales son patógenos tanto para humanos como para animales. El proceso de rendimiento ofrece un sistema seguro e integrado en el manejo de materia animal que cumple con todos los requerimientos fundamentales de calidad ambiental y control de enfermedades [68]. La Figura 6 muestra el proceso básico del rendimiento de las materias generadas en los rastros.

El sebo en la industria de rastros es un subproducto del proceso de rendimiento, el cual se realiza para reciclar las materias primas del tejido de los animales y darles un valor

agregado. La producción de mantecas y sebos en Baja California se puede estimar a partir del porcentaje de grasa en la materia de rendimiento para producción de grasa, aunque mucho depende del tipo de alimentación del ganado.

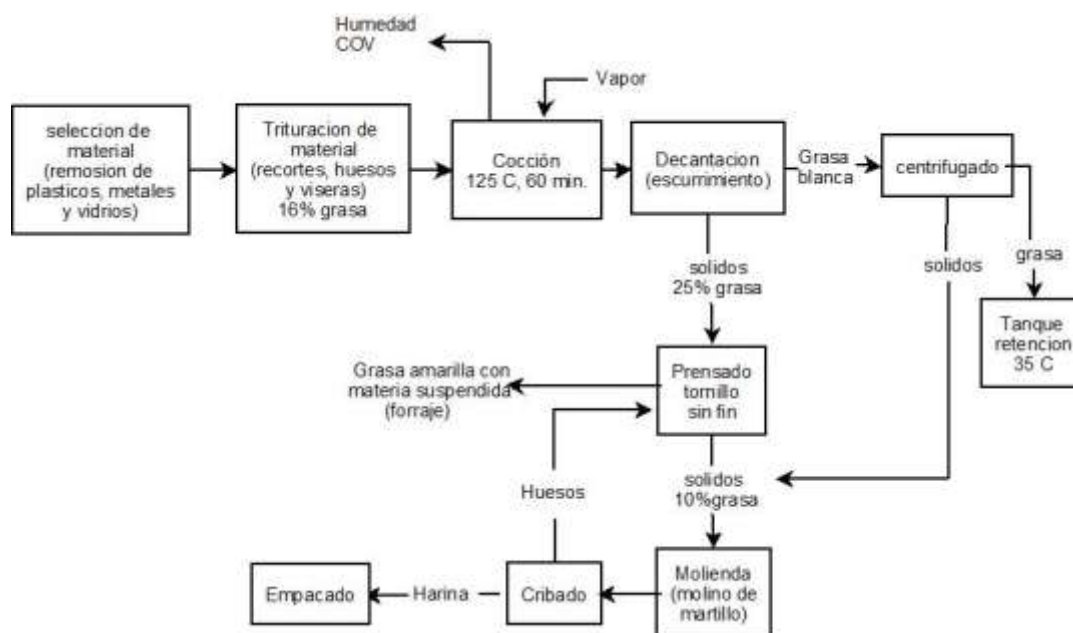


Figura 6. Proceso básico de rendimiento para la extracción de grasa (ProCarnes, 2009).

Tabla 9. Producción de ganado de rendimiento y grasa no comestible en Baja California en el 2008. Cálculos basados en los datos de INEGI y SIAP, 2009 [66, 69]

Ganado	Producción (toneladas)	*Subproducto (%)	*Subproducto (toneladas)	Grasa no comestible (toneladas)
Bovino	130,788	49	64,086	10,253
Porcino	1,724	44	758	121
Ovino	509	49	249	39
Caprino	419	37	155	24
Aves	1,564	37	579	92
Total	135,004		65,827	10,532

*Subproducto es considerado material no comestible.

En 2008 se produjeron en Baja California un total de 135,004 toneladas de ganado en pie de bovino, porcino, caprino, ovino y aves (SIAP, 2009), las cuales debieron haber generado 65,827 toneladas de material de rendimiento no comestible [68]. Si se considera que por cada tonelada de material animal para rendimiento se generan 0.16 toneladas de grasa [68], entonces se tiene una producción de 10,532 toneladas, la cual es ligeramente alta, sin

embargo, no existe información nacional acerca de la grasa animal producida en el estado y para fines de aproximación se consideran los datos de la tabla 9 para los cálculos.

El balance de materia y energía a partir del sebo y de los desperdicios generados en un rastro de ganado se presenta en la Figura 7. La producción de desechos en rastros se calculó a partir de la producción en toneladas de ganado reportada por SIAP, multiplicada por la fracción de material de no consumo humano.

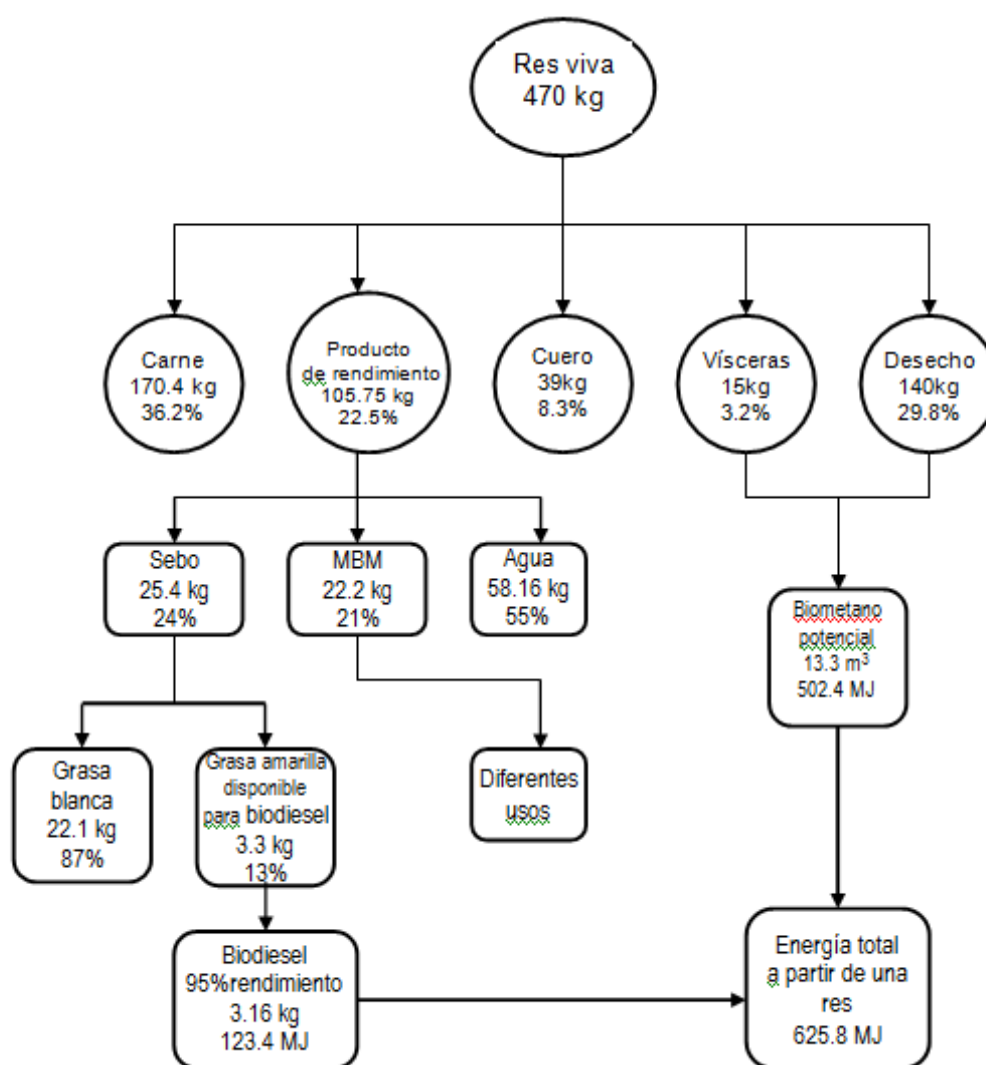


Figura 7. Balance de materia y energía generado del proceso de rendimiento en base al peso de una res. (a) 55% gas metano del biogás producido; valor energético del metano 37.78 MJ/m³ (b) valor energético del biodiesel 39 GJ/ton.

3.5 POTENCIAL ENERGÉTICO DE LA GRASA ANIMAL

Para este análisis, se asume que el 13.12% de la grasa obtenida del proceso de rendimiento de grasa no comestible, es grasa amarilla, la cual se extrae por prensado del producto sólido [70], y por tener una menor calidad y costo, se podría usar como materia prima para la producción de biodiesel. De acuerdo a la generación de residuos cárnicos en el 2008, se tendría un total de 1,382 toneladas de grasa amarilla. El rendimiento de la producción del biodiesel es del 95% con respecto al sebo de entrada al proceso [71] y el valor energético del biodiesel es 39 GJ/tonelada [72].

El potencial de energía disponible a partir del sebo sería de 51,197 GJ/año en Baja California. Esta energía representa el 0.27% de la energía suministrada por el diesel en Baja California (19 PJ en 2005) [73], de acuerdo al cálculo hecho a partir de la información obtenida del reporte [74], en donde el diesel genera el 26% de la energía suministrada por los combustibles para vehículos de transporte.

El cálculo de biodiesel posible de obtener a partir de la producción de sebo fue de 1,313 toneladas por año, cuyo volumen corresponde a 1,492 m³/año, si consideramos la mezcla de combustible B2 (2% biodiesel, 98% diesel) se tendrían 74,596.6 m³/año de mezcla B2. Este combustible es suficiente para surtir de combustible aproximadamente, a 10,710 vehículos/año, de carga y de pasajeros con motor diesel [75-76]. La reducción potencial de emisiones de CO₂ por el uso de esta mezcla se calcula en 3,730 tonelada/año, lo cual representa el 2.2% de reducción de emisiones de CO₂ por diesel. El consumo promedio de combustible considerado fue de 14.75 MJ/km [75]. El kilometraje promedio por vehículos en México fue de 16,995 km/año [76].

El sebo es un producto con un considerable valor en el mercado y los compradores potenciales de sebo para la producción de biodiesel tendrían que competir con otras industrias. El mercado del sebo incluye su uso en alimento para animales, elaboración de jabones, cosméticos e industrias oleo-químicas.

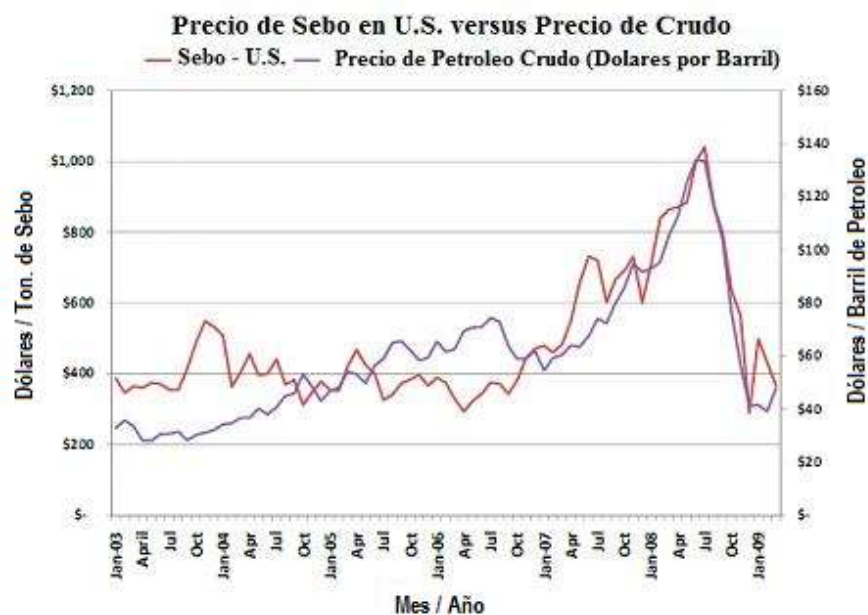


Figura 8. Perfiles de los costos del sebo en U.S. versus costos del barril crudo (NRA, 2009, [77]).

El futuro uso del sebo en plantas de biodiesel depende del crecimiento de la industria del biodiesel en México y también de la permanencia competitiva de los costos del sebo. Estimaciones de las posibles cantidades de sebo disponibles para producción de biodiesel en el futuro son por lo tanto problemáticas y sujetas a considerables cambios. En la Figura 8 se muestra un análisis comparativo del costo del sebo contra el costo del barril de crudo, observándose perfiles muy similares y costos de sebo elevados.

3.6 CONCLUSIONES

La energía disponible por el biodiesel generado a partir del sebo de residuos cárnicos se estimó en 51,197 GJ/año. Esta energía representa el 0.27% de la energía suministrada por el diesel de petróleo en Baja California (19 PJ en 2005), para vehículos de transporte y carga. El biodiesel generado a partir del sebo de residuos cárnicos, combinado con el diesel de petróleo, en una mezcla del 2% de biodiesel cubriría 10,710 vehículos de carga y de pasajeros, registrados en el 2007.

El análisis nos indica que este recurso permitiría reducir el uso de tierra para la producción de cultivos bioenergéticos, sin embargo el elevado costo del sebo por su alta demanda es un

factor negativo. Es necesaria una política energética más orientada hacia la producción y uso de los biocombustibles. Es esencial explotar el potencial energético de los residuos para la producción de energía y tener una apertura mayor hacia la generación de biotecnologías propias.

CAPÍTULO 4

ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE LIPASA EXTRACELULAR A PARTIR DE HONGOS FILAMENTOSOS.

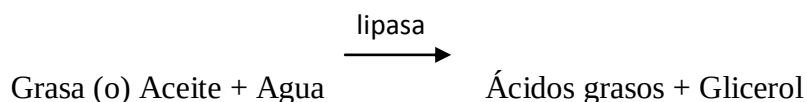
4.1 RESUMEN

Se probaron seis diferentes microorganismos productores de lipasa para medir su producción, usando fermentación sumergida (SmF) en medios selectivos que contenían aceite vegetal como única fuente de carbono y energía. Los microorganismos recién adquiridos se mantuvieron en medio agar dextrosa papa. Periódicamente se realizaron observaciones al microscopio para confirmar que las colonias no estuvieran contaminadas por la presencia de otros microorganismos y se almacenaron a 4°C para su continua transferencia. Posteriormente, de las seis cepas en estudio se confirmó la presencia de dos especies por extracción, purificación y secuenciación del DNA; *Aspergillus oryzae* y *Penicillium chrysogenum*. También por secuenciación se identificó la presencia de otras especies a partir del DNA de las muestras analizadas, *Aspergillus flavus*, *Penicillium sp.*, y *Penicillium aurantiogriseum*. Las especies de *Aspergillus niger* y *Aspergillus awamory* se identificaron solo por características y morfología de las colonias. Las especies de *Trichoderma sp.* y *Trichoderma reesei* no se pudieron observar al microscopio para determinar su taxonomía, se cree que en el proceso de transferencia de cultivos pudieron perderse. La producción de lipasa se realizó usando la solución de sales minerales modificada de Reese y Mandals suplementada con aceite de olivo como sustrato en matraces Erlenmeyer con agitación a $29\pm 1^{\circ}\text{C}$ y se hizo el seguimiento de la fermentación. De los 6 microorganismos estudiados, las especies *Aspergillus niger* y *Trichoderma sp* produjeron lipasas extracelulares con la mayor actividad lipolítica 3.5 y 4.3 U/ml respectivamente. Aunque la máxima biomasa fungal se presentó a las 60 h, la velocidad específica de crecimiento más alta se observó de las 6 a las 18 h con un valor de 0.30 h^{-1} .

4.2 INTRODUCCIÓN

Las lipasas son éster-glicerol hidrolasas (E.C. 3.1.1.3), las cuales hidrolizan el enlace éster del glicérido en la interface aceite-agua.

Durante la hidrólisis, las lipasas se unen al grupo acil del glicérido para formar un complejo acil-lipasa, el cual luego transfiere su grupo acil a grupos OH del agua [78]. La forma común de acción de las lipasas como biocatalizador es la siguiente:



El sector industrial prefiere las lipasas de origen microbiano debido a su disponibilidad en grandes cantidades ya que se pueden producir con altos rendimientos. La importancia de la utilización de las lipasas en la industria se debe a los siguientes factores: (1) actúan sobre un amplio rango de pH y temperatura, (2) presentan alta especificidad, (3) no requieren co-factores, y (4) catalizan un amplio rango de reacciones [79]. En las últimas décadas, el interés en la producción de lipasa microbiana se ha incrementado debido a su aplicación potencial en diferentes sectores industriales tales como alimentos, tratamiento de aguas residuales, cosméticos, oleo químicos, fármacos, detergentes [80] y en el sector de combustibles, en donde las lipasas se aplican como catalizadores para la síntesis de ésteres y para la transesterificación del aceite para la producción de biodiesel [81].

El presente estudio permitió identificar el microorganismo con el más alto rendimiento de lipasa, con las características necesarias para utilizarse en la síntesis de biodiesel. Para ello, se analizó la producción de lipasa a partir de 6 diferentes mohos (*Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus Awamory*, *Trichoderma sp*, *Trichoderma reesei* y *Penicillium chrysogenum*), teniendo en cuenta que las lipasas extracelulares pueden producirse a gran escala, bajo condiciones normales de laboratorio, el sustrato adecuado y los parámetros de proceso óptimos.

4.3 MATERIALES Y MÉTODOS

Las cepas utilizadas en este estudio fueron *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus Awamory*, *Trichoderma sp*, *Trichoderma reesei* y *Penicillium chrysogenum* donados por la Universidad de Tecnologías Alimenticias de Plovdiv, Bulgaria.

Los cultivos se mantuvieron en tubos de cultivo utilizando como medio Agar Dextrosa Papa (ADP). Los tubos completamente esporulados se almacenaron a 4°C y se subcultivaron cada tres semanas.

4.3.1 Cultivos e identificación

Las características observadas de los diferentes cultivos para su identificación fueron el diámetro de la colonia, color, exudado y textura de la colonia. En la observación al microscopio, se extrajo cuidadosamente una pequeña porción del cultivo en la placa con agar y se colocó en un portaobjeto cubriéndola con un cubreobjetos. Las características microscópicas para la identificación fueron la cabeza conidial, conidióforo, color y longitud forma de la vesícula, tamaño de conidia, forma y textura. Al final se compararon las características morfológicas con las especies estándar [82]. También se realizó una identificación de las cepas por extracción, purificación y secuenciación del DNA de los microorganismos. Esta etapa del estudio se realizó con la colaboración del Departamento de Química de la Universidad Autónoma de Guadalajara. Los productos del PCR (Reacción en Cadena de Polimerasa) purificados fueron secuenciados con un secuenciador ABI. Los cromatogramas de las secuencias del DNA fueron editadas con el Programa BioEdit Sequence Alignment Editor [83]. Todas las secuencias fueron analizadas por homología utilizando el buscador de nucleótidos de Gene Bank [84].

4.3.2 Medio de crecimiento

Para la especie de los *Aspergillus* se utilizó la Fermentación Sumergida (SmF) con un Medio de Crecimiento Mineral (MCM) conteniendo en g/L: NaH_2PO_4 12, KH_2PO_4 2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 y CaCl_2 0.1. Como fuentes de nitrógeno y carbono se utilizaron sulfato de amonio-urea al 0.75-0.34% y aceite de olivo al 2%, respectivamente. El pH inicial se ajustó a 6 [85]. Para las especies de *Trichoderma* y *Penicillium* también se utilizó la SmF donde el medio mineral contenía (en g/L): KNO_3 2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, KH_2PO_4 1.0, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.44, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.1 y $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2. Se usaron sulfato de amonio al 0.5%, peptona 0.25 g/L y aceite de olivo al 2%, como fuentes de nitrógeno y carbono respectivamente, para las especies *Trichoderma sp* y *Trichoderma reesei*. El pH inicial se ajustó a 5 [86]. El medio de crecimiento para el *Penicillium* fue similar al medio mineral de las especies *Trichoderma*, solo variando la composición de las fuentes de nitrógeno y carbono: sulfato de amonio 0.45%, aceite de oliva 0.5% y glucosa 0.25%. El pH inicial se ajustó a 6 [87].

4.3.3 Producción de lipasa por SmF

El cultivo se desarrolló en matraces Erlenmeyer de 125 ml conteniendo 20 ml del medio mineral. El contenido se esterilizó en autoclave a 121°C por 20 min. Después de enfriar, el medio estéril se inoculó con 1 ml de suspensión de células de un cultivo de 7 días de incubación. Los matraces se incubaron a 28-30°C en un agitador térmico, Shak-R-Bath marca Lab-Line, a 120 ciclos/min por 4 días. Al cuarto día, el contenido de los matraces se transfirió a matraces Erlenmeyer de 500 ml con medio mineral estéril y se incubaron a 28-30°C en un agitador térmico a 120 ciclos/min por 3 días. Cada 24 horas se analizaba la actividad lipolítica en cada matraz, bajo un ambiente controlado, para evitar la contaminación de los medios [88]. La Figura 9 muestra el procedimiento realizado en la producción y estudio de la lipasa.

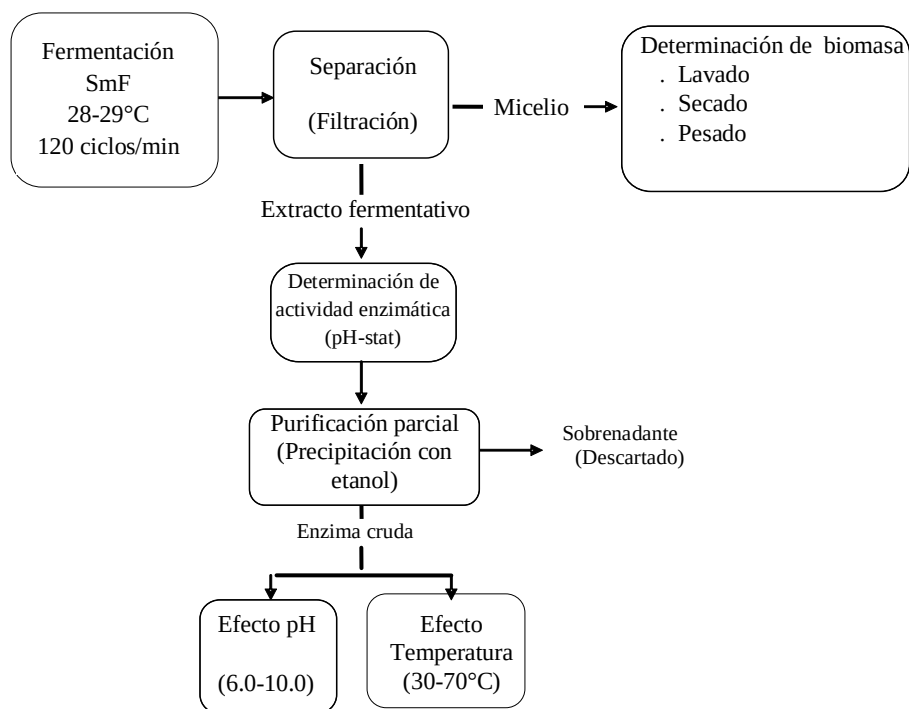


Figura 9. Diagrama de flujo de la secuencia experimental

4.3.4 Determinación de masa celular seca

Para determinar la biomasa fungal, el micelio se filtró utilizando papel Whatman No. 40, posteriormente, se lavó con agua destilada para remover las sales del medio. El micellium lavado se secó a 100 ± 1 °C a peso constante, y se determinó la masa.

4.3.5 Velocidad específica de crecimiento

Para determinar la velocidad específica de crecimiento (μ), se graficó el logaritmo natural de la biomasa ($\ln X$) contra tiempo (t). La pendiente de la recta en cualquier tiempo (t) corresponde a la velocidad específica de crecimiento en ese momento.

4.3.6 Determinación de actividad lipolítica

La actividad enzimática de la lipasa en el extracto del fermento, se determinó por el método “pH-stat titulación” en una emulsión formada de goma arábica y aceite de olivo como sustrato [89].

La reacción se realizó en vasos de precipitado de 100 ml a temperatura ambiente. La mezcla reactiva compuesta por 24 ml de emulsión-sustrato 75% goma arábica (3% goma arábica y 1.25% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) y 25% aceite de olivo, se diluyó con 11 ml de agua destilada y se ajustó el pH a 8 con NaOH 0.02N. Se adicionaron 5 ml de extracto de enzima diluida en solución de cloruro de sodio al 1% y se mantuvo el pH por 10 minutos por adición de la solución de hidróxido de sodio. La reacción se terminó llevando el pH a 10 para desactivar a la enzima y se mantuvo en este pH por 30 seg. El volumen de sosa consumido se comparó con un control preparado de la misma manera el cual se llevó directamente a pH de 10.

4.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.4.1 Identificación morfológica

La identificación de los microorganismos que se utilizaron en el estudio presente, es muy importante para confirmar la integridad de los cultivos de acuerdo a las pruebas que se realizaron durante su aislamiento en el Departamento de Bioquímica y Microbiología de la Universidad de Plovdiv. La Figura 10 y la Tabla 10 muestran el aspecto morfológico de las cepas en estudio.

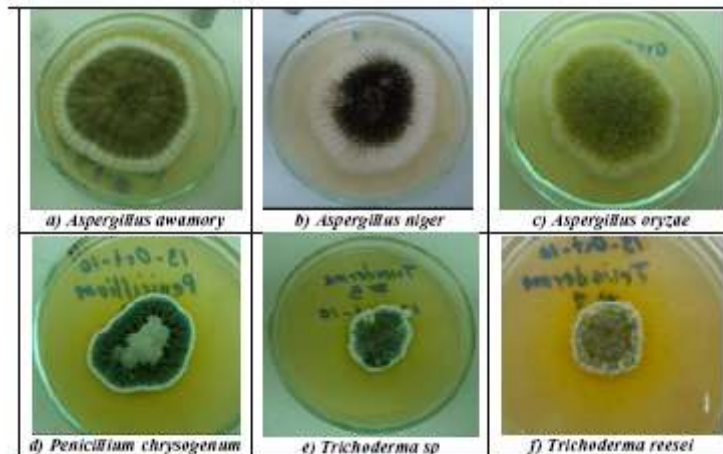
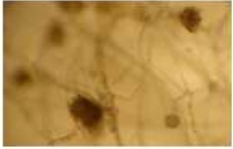


Figura 10. Aspecto morfológico de cepas en medio ADP. a) *A. awamory*, de aspecto algodonoso, conidias verde olivo y bordes de micelio blanco, b) *A. niger*, aspecto algodonoso, conidias negras y bordes de micelio blanco, c) *A. oryzae*, de aspecto algodonoso, conidias verde pálido y amarillo y bordes de micelio blanco, d) *Penicillium chrysogenum*, aspecto velutinosa, de color verde y exudado amarillo, bordes de micelio blanco en el centro y periferia, e) *Trichoderma* sp, de lento crecimiento y aspecto verde oscuro, exudado verde, bordes de micelio blanco, f) *Trichoderma reesei*, crecimiento lento y aspecto verde olivo, exudado amarillo.

Tabla 10. Observaciones al microscopio en campo ocular de las especies seleccionadas

Microorganismo	Observaciones al microscopio en portaobjeto de espécimen preparado*	
	Hifa	Otras observaciones
<i>Aspergillus awamory</i> 	Septada hialina, muy ramificada en ángulo agudo. Conidióforo de pared lisa alargada. Fiálides sumamente agrupadas, se originan de la porción media distal de la vesícula.	Cabeza conidial oscura y vesícula redonda. Conidias redondas y lisas, surgen de las fiálides sin ninguna organización.
<i>Aspergillus niger</i> 	Septada hialina, ramificación en ángulo de 90°. Conidióforo de pared lisa incolora. Fiálides cubiertas de gran cantidad de conidias sin organización característica.	La cabeza conidial cubre toda la vesícula. Los conidios son de color marrón y rugosos.
<i>Aspergillus oryzae</i> 	Septada hialina, ramificaciones en ángulo agudo. Conidias liberadas del penacho y dispuestas aleatoriamente. Conidióforo de pared lisa incolora.	Fiálides unidas directamente a la vesícula y sumamente agrupadas. Conidias redondas y lisas, surgen de las fiálides con organización en cadena.
<i>Penicillium chrysogenum</i> 	Septada hialina, ramificación en ángulo agudo. Conidióforo de pared lisa incolora. Vesícula redonda y pequeña, de ella se extienden las fiálides alargadas y delgadas.	Conidias de aspecto redondo y liso, surgen de las fiálides en dirección distal a la vesícula en organización en cadena. Aspecto de ramificación de árbol.

4.4.2 Identificación por secuenciación del DNA

Los resultados de la Tabla 11, muestran la identificación de las especies por secuenciación del DNA. Se observa la identificación de especies que no se tenían registradas como presentes en las cepas madres (*Aspergillus flavus*, *Penicillium sp* y *Penicillium aurantiumgriseum*) y solo dos cepas coinciden con la identificación de GenBank (*Aspergillus oryzae* y *Penicillium chrysogenum*). Las especies de *Aspergillus niger* y *Aspergillus awamory* solo se identificaron en base a su taxonomía, debido a la baja concentración de material genético para su secuenciación. Las cepas identificadas como *Trichoderma sp* y *T. reseei* tienen un alto porcentaje de homología con el género *Penicillium*. Se ignora la razón de la pérdida de las cepas *Trichoderma*. Puede ser que estas cepas se perdieran debido a las constantes transferencias realizadas durante su estudio.

Tabla 11. Identificación de secuencias de productos de PCR

Muestra ID	GenBank ID	Producto PCR (material gen.)	Homología (%)	Valor esperado ("BLASTN")
<i>Aspergillus awamory</i>	-	Insuficiente	-	-
<i>Aspergillus niger</i>	-	Insuficiente	-	-
<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Aspergillus oryzae</i> JQ717336	Suficiente	100	0.0
<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Aspergillus flavus</i> KC146411	Suficiente	100	0.0
<i>Penicillium chrysogenum</i>	<i>Penicillium chrysogenum</i> JN088238	Suficiente	100	5e-68
<i>Trichoderma reesei</i>	<i>Penicillium sp.</i> EU142900	Suficiente	98	2e-56
<i>Trichoderma sp.</i>	<i>P. aurantiogriseum</i> JN942860	Suficiente	99	0.0

En base a la taxonomía presentada por las cepas se confirma la ausencia de las especies *Trichoderma sp*, *Trichoderma reseei* y la presencia de las especies *Aspergillus niger*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium chrysogenum* y *Penicillium sp*.

4.4.3 Producción de lipasa

Se determinó el efecto del tiempo de incubación en la producción de lipasa por los microorganismos estudiados, con sales minerales de Mandel como medio suplementado y con aceite de oliva como sustrato; los resultados se observan en las Figuras 11 y 12.

En el caso de las especies de los *Aspergillus*, la producción de la lipasa inició a las 48 horas de incubación con una actividad de 1.5 U/ml para el *A. niger*, después de alcanzar la fase logarítmica de crecimiento. Esto sugiere que la producción de lipasa por *A. niger* estuvo parcialmente asociada con el crecimiento del microorganismo. Posteriormente, se observó que la actividad incrementó lentamente hasta el día 3 con una actividad de 2.5 U/ml. Para el día 4 la actividad alcanzó su valor máximo de 3.5 U/ml. Finalmente para el día 5 la velocidad de producción se encontró que había descendido a 3 U/ml, lo cual pudo deberse a la degradación proteolítica del sistema enzimático [88]. Un comportamiento similar presentaron el *A. awamory* y el *A. oryzae* solo que sus actividades lipolíticas fueron menores.

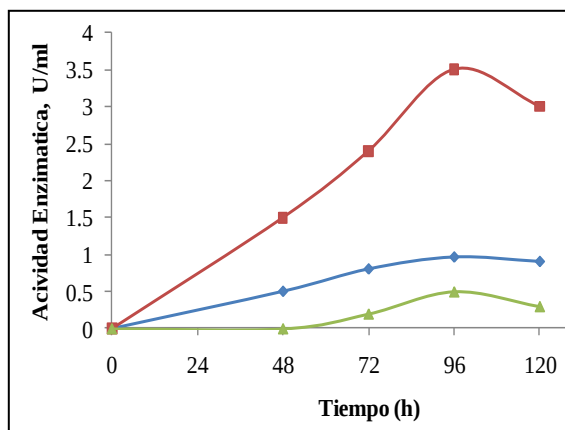


Figura 11. Perfil de actividad enzimática contra tiempos de fermentación. *A. awamory* (—●—) *A. niger* (—■—), *A. oryzae* (—▲—)

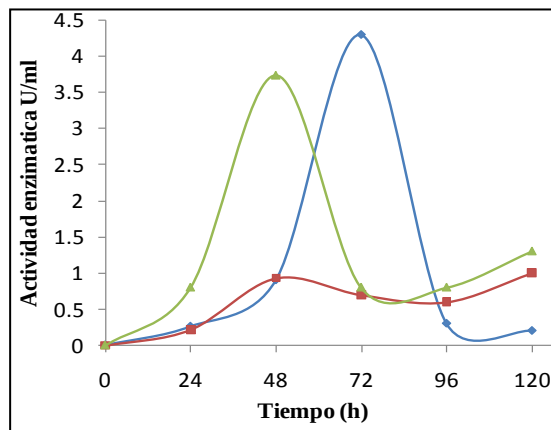


Figura 12. Perfil de actividad enzimática contra tiempos de fermentación. *Trichoderma sp* (—▲—) *Trichoderma reesei* (—■—), *P. chrysogenum* (—●—)

La producción de lipasa por *Trichoderma sp* se inició alrededor del primer día de fermentación con una activación de 0.8 U/ml. Posteriormente se observó un rápido incremento en la actividad alrededor del segundo día con un valor de 3.8 U/ml, siendo ésta la máxima actividad registrada. Posteriormente alrededor del día 3 la actividad decrece marcadamente hasta un valor 0.9 U/ml. La especie del *Trichoderma reesei* presenta comportamiento similar, pero con menores valores de actividad lipolítica. En cambio la

especie *Penicillium chrysogenum* inicia la producción de lipasa alrededor del día 2 con una actividad de 0.9 U/ml, para incrementarse rápidamente a 4.3 U/ml alrededor del día 3 donde alcanza su máxima actividad. En el día 4 la actividad del *Penicillium* desciende hasta 0.3 U/ml.

4.4.4 Velocidad de crecimiento fungal

La velocidad de crecimiento celular y la producción enzimática por microorganismos es importante para entender su patrón de fermentación. La Figura 13 muestra la velocidad de producción de biomasa durante la fermentación a 29 ± 1 °C por 72 horas de incubación.

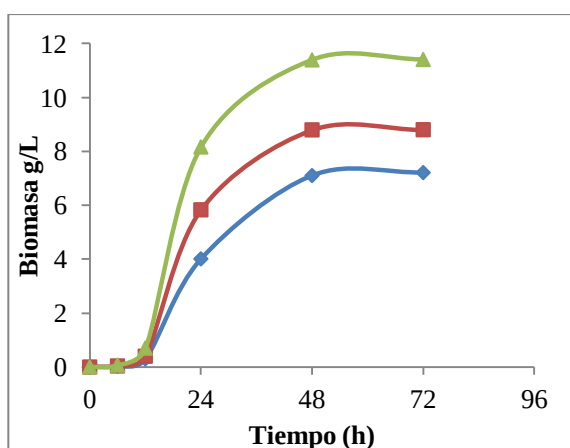


Figura 13. Velocidad de producción de biomasa durante la fermentación para *A. Niger* (—♦—) *A. oryzae* (—■—) y *A. awamory* (—▲—).

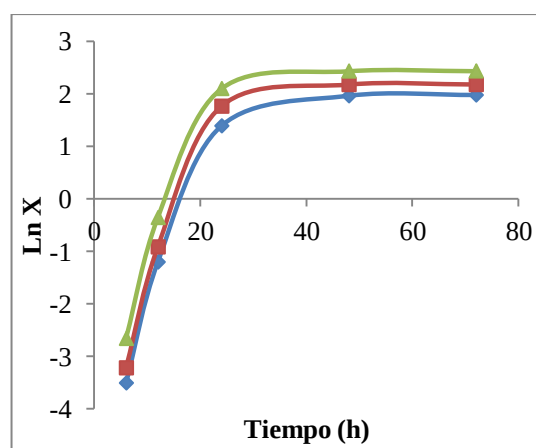


Figura 14. Velocidad específica de crecimiento de biomasa (μ) 0.300 h^{-1} *A. niger* (—♦—), 0.300 h^{-1} *A. oryzae* (—■—) y 0.301 h^{-1} *A. awamory* (—▲—) en el lapso de 6-18 horas de fermentación.

La máxima velocidad de crecimiento se observó entre 12 y 48 horas de fermentación. Después de las 60 horas, se observó una disminución en la masa micelial seca. La Figura 14 muestra que la fase de adaptación es seguida de un crecimiento exponencial entre las 6 y 18 horas, durante el cual se observó una velocidad específica de crecimiento (μ) de 0.30 h^{-1} . Después de eso, aunque la velocidad de crecimiento siguió incrementándose, la velocidad específica de crecimiento (pendiente de la curva en la Figura 14) decrecía. Una explicación posible es que en lugar de un crecimiento celular homogéneo, se empiezan a formar agregados miceliales para los cuales el suplemento de nutrientes y oxígeno se convierten en limitantes del crecimiento [90].

4.4.5 Temperatura y pH óptimos de la actividad lipolítica

La óptima actividad de la lipasa en el extracto crudo para las especies de *A.niger* y *P. chrysogenum* se observó al mismo pH de 8.0. La lipasa de *A. niger* presentó su máxima actividad en el rango de temperaturas de 40-45 °C (Figura 15), decreciendo drásticamente a los 60 °C. Se tienen reportes de lipasas producidas a partir de cepas de *A. niger* con temperaturas óptimas de actividad entre los 40 y 55 °C [91]. La lipasa producida a partir de *P. chrysogenum* mostró su óptima actividad alrededor de los 40 °C (Figura 16). Resultados similares han sido reportados en estudios anteriores [92].

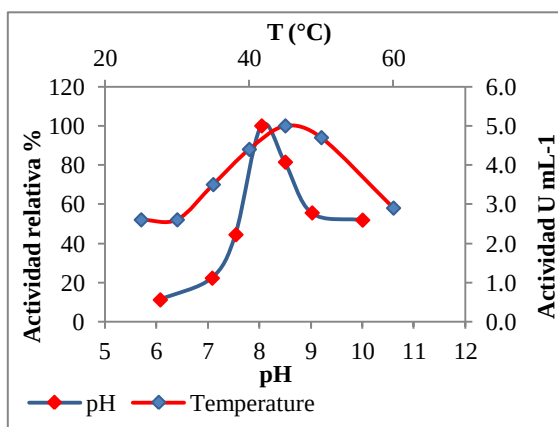


Figura 15. Temperatura y pH óptimos de actividad de lipasa de la especie *A. niger*.

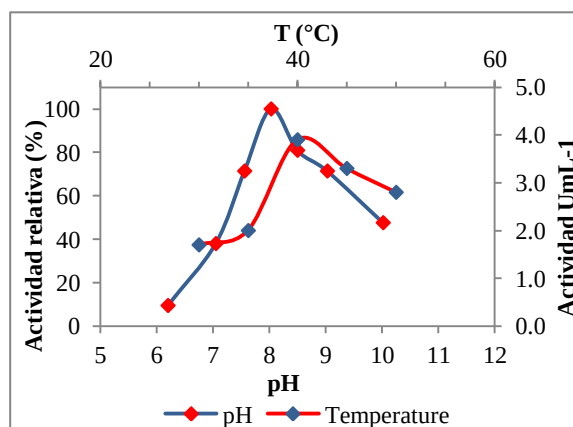


Figura 16. Temperatura y pH óptimos de actividad de lipasa de la especie *P. chrysogenum*.

4.5 CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos a partir de la fermentación sumergida, las seis cepas mostraron actividad lipolítica. Las dos cepas que presentaron las más altas actividades lipolíticas fueron seleccionadas para la producción y aislamiento de la enzima. La temperatura y pH óptimos fueron determinados para futuras pruebas de reacciones de hidrólisis y transesterificación.

CAPÍTULO 5

IDENTIFICACIÓN Y CONSERVACIÓN DE HONGOS FILAMENTOSOS PRODUCTORES DE LIPASAS

5.1 RESUMEN.

Mantener y conservar una colección de hongos es una tarea que demanda constante dedicación y vigilancia. Requiere conocer las características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas de los hongos, así como sus requerimientos en cuanto a los métodos de preservación. El objetivo del presente trabajo consistió en evaluar la viabilidad, pureza y estabilidad morfológica macroscópica y microscópica de seis cepas de hongos filamentosos donados y previamente identificados por el Departamento de Bioquímica y Microbiología de la Universidad de Plovdiv, Bulgaria. Las cepas identificadas como *Aspergillus niger*, *A. awamori*, *A. oryzae*, *Penicillium chrysogenum*, *Trichoderma reesei* y *Trichoderma sp.* fueron subcultivadas y preservadas en tubos inclinados con medio papa-dextrosa-agar durante 18 meses. Para la evaluación de los hongos se realizaron transferencias por diluciones seriadas, a partir de subcultivos de 12 meses de edad, con el objeto de realizar observaciones morfológicas para comparación con las claves taxonómicas reportadas en la bibliografía. El 50% de los aislamientos originales se conservaron puros y viables (*Aspergillus niger*, *A. awamori*, *A. oryzae*). La especie de *Penicillium* se encontró mezclada con *Aspergillus sp.* y no se encontró presente el género *Trichoderma*, identificándose correctamente éste como *Penicillium sp.* La preservación de las cepas identificadas se realizó mediante la inoculación de sustrato estéril (suelo y arena, 1:1), mantenidos en tubos de vidrio de 10 ml de capacidad y almacenando a 4°C.

5.2 INTRODUCCIÓN

El estudio de microorganismos tales como microalgas y hongos frecuentemente involucra el uso de cultivos vivos. Estos deben ser conservados con vida al menos durante el estudio y experimentos, y si son importantes, seguir manteniéndolos para trabajo futuro. Es entonces que se crean bancos de germoplasma, cuyo objetivo primordial es el de mantener cepas sin cambios morfológicos, fisiológicos o genéticos hasta que requieran usarse. Por su

parte, material genético de interés científico, de conservación o comercial, es mantenido en colecciones como organismos vivos o sus propágulos. Esta actividad permite tener accesibles líneas genéticas particulares o germoplasma de especies o grupos taxonómicos de interés para su estudio, comercialización o reintroducción a la naturaleza en forma de poblaciones vivas. Una de las tareas más importantes de este tipo es la preservación de las mismas que asegure que la reserva genética de estos organismos se encuentre disponible para investigación y desarrollo. Las técnicas de preservación van desde un crecimiento continuo hasta métodos que reducen la velocidad del metabolismo al punto en que éste es detenido [93]. Varios métodos para la conservación de cultivos fúngicos se han desarrollado principalmente desde el siglo pasado hasta estos días. Estos se basan ya sea en el metabolismo fúngico continuo o suspendido [94]. Estos métodos se dividen en dos principales grupos basados en el metabolismo continuo o suspendido del hongo. El primer grupo incluye la conservación en agua estéril [95], transferencias en agar, almacenamiento en frío a 5-8°C, congelación a -20°C, en aceite mineral o parafina, en granos o suelo a temperatura ambiente [96]. El segundo grupo incluye secado, sílica gel, liofilización, nitrógeno líquido y criogénesis a -70°C [94]. La criopreservación es considerada el mejor método disponible para la conservación de cultivos microbiológicos a largo plazo debido a la estabilidad en la producción de metabolitos secundarios y la minimización en la alteración genética [97]; sin embargo, tal método es costoso y existen factores que afectan la recuperación de las células [98]. La liofilización es más conveniente y favorable para colecciones numerosas [99]. Se extiende por períodos de 20-40 años de almacenamiento; no obstante hay restricciones tales como el tiempo de recuperación del aislamiento preservado para obtener una viabilidad óptima. Solo las conidias pueden sobrevivir este último método. El método de Castellani, además de ser simple y económicamente viable para laboratorios pequeños, presenta resultados satisfactorios para la preservación de la mayoría de las especies fúngicas [100], aún si la viabilidad parece estar ligada en algún microorganismo en particular, se sugiere la utilización de un segundo método de conservación y así retener la estabilidad morfológica y la viabilidad por largos períodos [101]. La transferencia repetida en agar es un método laborioso y que demanda tiempo, es susceptible a la contaminación y el subcultivo en medios sintéticos puede llevar a la pérdida en la habilidad de esporulación. Investigaciones recientes concluyen que características fisiológicas pueden verse afectadas por esta última técnica [102].

5.3 ANTECEDENTES

Los lineamientos para establecer y operar las colecciones de microorganismos los ha determinado la Federación Mundial para el Cultivo de Colecciones (WFCC, Word Federation and Culture Collection por sus siglas en inglés). Esta federación agrupa a 466 colecciones en 61 países. En México se han registrado 15 de ellas, y seis se encuentran en Centros CONACYT, dos de preservación de cepas de hongos en el INECOL y en la unidad Tapachula de ECOSUR, un banco de microalgas y otro de cianobacterias en CIBNOR. Además, existen dos bancos de germoplasma representativos de grupos de angiospermas. Uno de ellos es una colección del género *Agave* y sus relativos, especialmente de especies afines al henequén (*Agave fourcroides* Lem.); el otro es una colección de variedades de cocotero (*Cocos nucifera* L.). El cepario del INECOL tiene ya 20 años en funcionamiento, mientras que el de ECOSUR alrededor de diez. Los bancos de algas y cianobacterias del CIBNOR son aún más recientes (de cinco a ocho años desde su fundación). Los dos últimos han recibido un fuerte apoyo de la CONABIO. Los bancos de germoplasma de angiospermas, aun cuando han existido por varios años (especialmente el *Agave*), sólo recientemente han sido formalizados como tales [103].

5.4 MÉTODOS PARA LA PRESERVACIÓN DE CEPAS MICROBIANAS

Para evitar la degeneración y el envejecimiento de las cepas es necesario preservarlas adecuadamente y retardar, hasta donde sea posible, los cambios degenerativos normales que ocurren en las células. La declinación en las características deseables de una cepa, se han atribuido a diferentes factores que actúan en el almacenamiento de la misma, como son: carencia o agotamiento de los nutrientes en el medio de cultivo; alteración del pH en el medio; disminución en la concentración de oxígeno y la consecuente acumulación de CO₂ [104]. Entre los diversos procedimientos de conservación utilizados para hongos, se destacan el cultivo periódico en cuñas de agar, bajo aceite mineral, conservación de esporas en tierra, arena o sílica gel, cepas liofilizadas, congelación en nitrógeno líquido y en agua destilada [93].

Los métodos de elección o de conservación a largo plazo [97-98, 105-106] son los mejores porque en ellos se paraliza el crecimiento de las células microbianas, pero éstas no han

muerto. Los métodos de conservación pertenecientes a este grupo son dos: criocongelación y liofilización.

5.4.1 Criocongelación

Los microorganismos pueden ser preservados de -5 a -20° C por 1 a 2 años por congelación en caldo de cultivo o en suspensiones celulares en viales. Para los procesos de profunda congelación requieren crioprotectores como el glicerol o dimetil sulfóxido (DMSO), cuando son almacenadas a -70°C o en nitrógeno líquido de -156 a -196°C. Con caldos de cultivo se toman de la mitad o pasada la fase logarítmica del crecimiento y mezclado con un volumen igual de 10 a 20% (v/v) de glicerol o de 5 a 10% (v/v) de DMSO. Alternativamente, se puede preparar una suspensión de glicerol al 10% (v/v) de crecimiento del microorganismo desde las cajas petri. En este caso la suspensión es pipeteada a viales criogénicos o ampollitas, se congela y se almacena [98].

5.4.2 Liofilización

El principio básico para hongos es congelar la suspensión conidial y remover el agua por sublimación mediante vacío. Los equipos de liofilización para este propósito tiene tres componentes: un mecanismo de congelamiento, una fuente de vacío y una trampa para el vapor de agua. Para liofilizar se utilizan comúnmente dos métodos: el método de pre-congelamiento y la centrifugación. Para mejorar estabilidad y viabilidad se utilizan soluciones crioprotectantes, las cuales evitan la formación de cristales a nivel celular. Este es un método muy recomendable por su comodidad para el almacenamiento y para el envío de las cepas, pues una vez conseguidos los liófilos pueden almacenarse a temperatura ambiente (18°C-20°C), con lo cual su envío es muy cómodo [106].

Los factores que hay que tener en cuenta para hacer una buena liofilización son los mismos que influyen en la congelación, a los que habrá que añadir otros que surgen como consecuencia de la deshidratación. La congelación puede hacerse rápida o lentamente, la primera sumergiendo los tubos en nitrógeno líquido. Respecto a los crioprotectores, se pueden utilizar varios dependiendo del tipo de microorganismo, pero para liofilizar no se debe utilizar glicerol, debido a su elevado punto de evaporación y a su higroscopicidad, que provoca que los liófilos queden muy viscosos. Por lo tanto, para la liofilización se

recomiendan como crioprotectores el inositol para la mayoría de las bacterias y la leche descremada para hongos y actinomicetos [105].

5.4.3 Métodos alternativos

Son los que se utilizan cuando no se pueden emplear los métodos de elección, bien por carecer de los equipos necesarios, o bien porque la cepa microbiana no resiste los tratamientos de la conservación por estos métodos. Conviene tener en cuenta que nunca se debe usar un único método alternativo, sino que se recomienda conservar el microorganismo empleando varios de estos métodos.

- Conservación por transferencia periódica. La cepa microbiana se guarda en forma de cultivo activo en el medio de cultivo en el que ha crecido. Sin embargo, estas células no pueden permanecer indefinidamente en el mismo tubo, porque al seguir activas excretan productos tóxicos del metabolismo que se acumulan, provocando el envejecimiento y muerte celulares, por lo que es necesario transferirlas a otro tubo con medio de cultivo fresco. Este es el peor método para conseguir la estabilidad genética.
- Conservación por suspensión en agua destilada o en agua de mar estéril. Es un método alternativo muy utilizado y que da altos porcentajes de viabilidad en diversos tipos de microorganismos, tanto hongos filamentosos como levaduras y algunas bacterias. Consiste en suspender en agua estéril unas cuantas células del cultivo que se quiere conservar. Se pueden preparar en criotubos. En este caso la concentración celular no debe ser superior a 10^4 - 10^5 células/ml en el caso de bacterias y levaduras. Para los hongos filamentosos que no esporulan, se pueden poner en suspensión trocitos de agar con el crecimiento del hongo. En el caso de microorganismos marinos, la suspensión se hace en agua de mar diluida.

5.4.4 Métodos restringidos

En este grupo se engloban métodos no empleados habitualmente, pero a los que es necesario recurrir a la hora de conservar grupos de microorganismos muy determinados que no resisten bien la liofilización o la congelación, como por ejemplo los géneros bacterianos

Spirillum, *Rhodospirillum*, etc. Los métodos que se citan se basan en la paralización del crecimiento por eliminación del agua disponible para las células.

- Desecación en papel de filtro. Se utiliza un papel bastante absorbente (Whatman n° 3) que se impregna con una solución muy densa de células y se deja secar al aire (en condiciones estériles). También es posible desecarlos por el procedimiento que se llama desecación líquida (L-Dry) porque se utiliza para ello el liofilizador, pero sin que haya habido congelación previa de las células.
- Desecación en suelo, arena, sílica gel, etc. Se añaden las células a estos sustratos que las protegerán al desecar. Los microorganismos productores de esporas se pueden conservar durante bastante tiempo por este método. El método consiste en esterilizar y secar el suelo el cual es utilizado como medio absorbente para una pequeña cantidad de inóculo; los cuales se han mantenido viables en un período de tres años a temperatura ambiente y más de ocho años bajo refrigeración a 5°C [93].

5.5 TAXONOMÍA FUNGAL

Los sistemas de clasificación fungal han sido soportados a lo largo de la historia en las observaciones de sus características morfológicas y sus comparaciones. En consecuencia, es requisito el desarrollo de cultivos fungales para disponer del crecimiento de estructuras fundamentales aplicadas a la identificación. El grupo más importante de características a ser observadas son las conidias y el proceso involucrado en su formación. Adicionalmente, la pigmentación y forma de la hifa, la presencia o ausencia de septa, la ocurrencia de esclerocios, clamidiosporas o cualquier otro elemento hifal puede ser de gran ayuda en la clasificación de la fase, ya sea anamorfa (estado asexual) o teleomorfa (estado sexual). Estos métodos requieren de experiencia tomando en cuenta su complejidad. Avances en la filogenética y la integración de técnicas en biología molecular, en particular el análisis de secuencias de nucleótidos del DNA, han influenciado profundamente y derivado cambios en los conceptos sistemáticos tradicionales. Este nuevo concepto ha sido principalmente conveniente para grupos fúngicos de reproducción asexual [107]. Muchos intentos se han realizado para clasificar a los hongos de acuerdo al patrón de producción de metabolitos secundarios. Sin embargo, el uso de estos métodos en la taxonomía fungal ha sido muy

discutido debido a que la producción de estos compuestos puede ser afectada por el medio ambiente y las condiciones del cultivo [108].

5.6 MATERIALES Y MÉTODOS

Se seleccionaron 6 cepas de hongos filamentosos de los géneros y especies siguientes las cuales fueron donadas por la Universidad de Tecnologías Alimenticias de Plovdiv, Bulgaria: *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus awamori*, *Trichoderma reesei*, *Trichoderma sp* y *Penicillium chrysogenum*. Los cultivos se mantuvieron en tubos de cultivo inclinados utilizando como medio Agar Dextrosa Papa (ADP). Los tubos se mantuvieron a 4°C por 18 meses. Durante este período se hicieron subcultivos en ADP para la producción de esporas en su uso como inóculo en la producción de lipasa.

- *Aislamiento e Identificación de cepas.* La técnica empleada fue la de transferencia de esporas en agua destilada estéril a diferentes diluciones, 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-4} . Se utilizaron tubos de ensaye de 10 ml con tapón de rosca, conteniendo 4.5 ml de agua destilada estéril. Se usaron alícuotas de 0.5 ml de inóculo a partir del cultivo preservado en tubos con agar inclinado. A partir de estas diluciones se subcultivó por duplicado en placas de Petri con ADP y se incubaron a 25-27°C para observaciones macroscópicas y microscópicas para la confirmación de la integridad de las cepas. Una vez que las cepas desarrollaron en las placas Petri se compararon sus características morfológicas con claves taxonómicas para la identificación de los hongos [109-114]. Se observó el crecimiento de las cepas subcultivando en cajas Petri con Agar Extracto de Malta (AEM). Las observaciones al microscopio se realizaron por la técnica del cintazo usando lactofenol azul de algodón como colorante para la tinción de las estructuras [115].
- *Preparación de cepario:* Se preparó una mezcla de suelo orgánico y arena malla No. 35 en una relación 1:3 v/v y se esterilizó con vapor a 120°C por dos horas. La mezcla de suelo se dejó al ambiente por 24 horas para permitir la germinación de esporas no eliminadas y se repitió el proceso de esterilización. A las 24 horas se rellenaron con esta mezcla tubos de vidrio de 15 x 100 mm con tapón de rosca a 2/3 partes de capacidad y se esterilizaron con vapor a 120°C por dos horas. Después de

enfriarse los tubos se sellaron las tapas con Parafilm. Se prepararon suspensiones de esporas a partir de cultivos puros de los hongos desarrollados por 10-12 días en placas Petri en medio ADP. Se agregaron 5 ml de agua destilada estéril a cada placa Petri completamente esporulada y se desprendió el material micelial junto con las esporas por raspado con una espátula estéril. Se agregaron 2ml de suspensión por cada tubo con sustrato estéril y se cuantificó la concentración de esporas por lecturas en cámara de Neubauer. Después de 2-10 días de crecimiento a temperatura ambiente, los tubos son almacenados a 4°C. Para la recuperación de los hongos, unos pocos granos de suelo son dispersos en medio ADP fresco e incubados a 27-29°C [116]. Cada tubo es rotulado con una clave que lo identifica.

5.7 REGISTRO DE LA COLECCIÓN (FICHAS TAXONÓMICAS)

Para una colección pequeña en investigación (i.e., menos de 500 cultivos) el método de registro menos costoso y todavía efectivo es por el uso del índice de tarjetas o ficheros. Para hongos filamentosos los registros originales se ordenan alfabéticamente por el nombre de la especie. El fichero lleva el número de registro del tubo de ensaye con el cual fue rotulado (Tabla 12). La información se completa con la fecha de inicio de preservación, origen de la cepa, características y morfología [116].

Tabla 12. Identificación de colección de cepas conservadas en suelo orgánico

Especie	Identificación	Inóculo No.esporas/ml	Origen	Fecha
<i>Aspergillus awamori</i>	AaBu061211	2.26×10^7	Bulgaria	06-Dic-2011
<i>Aspergillus niger</i>	AnBu151211	1.90×10^7	Bulgaria	15-Dic-2011
<i>Aspergillus oryzae</i>	AorBu131211	1.50×10^7	Bulgaria	13-Dic-2011
<i>Aspergillus flavus</i>	AflMe131211	2.35×10^8	México	13-Dic-2011
<i>Penicillium chrysogenum</i>	PchrBu211211	4.30×10^8	Bulgaria	21-Dic-2011
<i>Penicillium sp.</i>	PspBu201211	1.60×10^8	Bulgaria	20-Dic-2011
<i>Trichoderma harzianum</i>	TcM071211	1.55×10^8	México	07-Dic-2011

Ficha No.1

Especie	<i>Aspergillus awamori</i>
Clasificación	Fungi, Fungi anamorfo, <i>Aspergillus</i>
Sinónimo(s)	<i>Aspergillus niger</i> var. <i>awamori</i>

Características de la colonia. Colonia en Agar Dextrosa Papa de crecimiento rápido a temperatura ambiente (25-27°C), 7 cm en 10 días en oscuridad. Colonia velutinosa, inicia con micelio blanco algodonoso, abundantes estructuras conidiales con bordes de micelio blanco, conidias verde olivo con tonos grises. Toma tonalidades color café en colonias viejas. El reverso de la colonia no presenta coloración (Figura 17).

Microscopía. Conidióforo globoso de medida variable dentro de una misma cepa de 125-300 micras de diámetro con fiálides hialinas de donde emergen las conidias en forma de cadena. Vesícula conidial de 30 micras de longitud y 50 micras de ancho. Hifas septadas muy alargadas de más de 1 mm. Fiálides regordetas (muy gruesas) con longitud de 12 micras y 7.5 micras de ancho, crecen muy estrechas alrededor de la vesícula. Conidiogénesis abundante, con diámetros de 3-5 micras de lisas a rugosas de forma ovoide café claro.

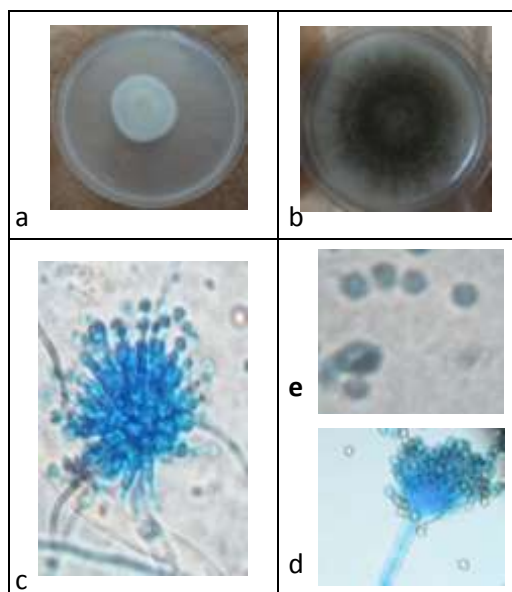


Figura 17. *Aspergillus awamori*. Colonia con 7 días de crecimiento a $26\pm 1^\circ\text{C}$ en medio: a) EMA, ocupando un cuarto del área de la placa; b) ADP, ocupa la totalidad de la placa; c y d) cabezas conidiales X400; e) conidia X1000. Preparaciones realizadas con azul de lactofenol.

Ficha No.2

Especie	<i>Aspergillus niger</i>
Clasificación	Fungi, Fungi anamorfo, Aspergillus
Sinónimo(s)	Sterigmatocystis nigra, Asperfilloopsis nigra

Características de la colonia. Colonias en Agar Extracto de Malta con crecimiento restringido 2.5 a 3.0 cm. de 12 a 15 días a temperatura ambiente (25-27°C) en oscuridad. Consiste de micelio blanco, compacto y algodonoso sin presencia de esporas. Colonias en Agar Dextrosa Papa presentan rápido crecimiento, extendiéndose en toda el área de la placa Petri de 10 a 12 días a temperatura ambiente (25-27°C) en oscuridad. Inicia con micelio blanco algodonoso y aparición de esporas color negro en el centro de la colonia. Presenta estructuras conidiales abundantes y densas (Figura 18).

Microscopía. Cabezas conidiales grandes oscuras, muy ramificadas. Vesícula redondeada de 50-70 micras. Hifa septada hialina, ramificaciones menor de 90° muy alargadas de más de 1 mm con diámetro de 13 a 15 micras. Presentación de fiálides de primer orden cilíndricas cubiertas por una gran cantidad de conidias. Conidia globosa, rugosa color café oscuro de 4 a 5 micras.

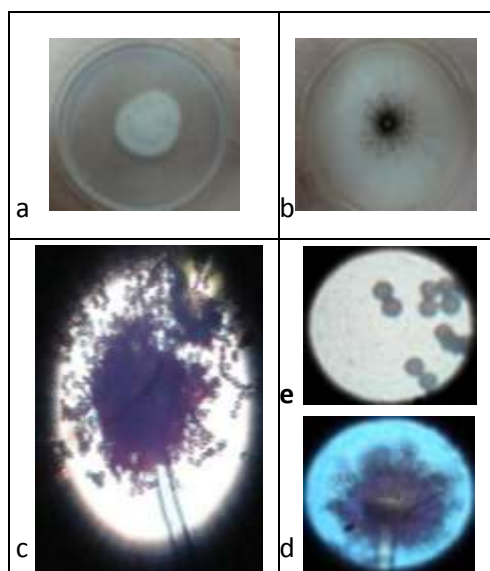


Figura 18. *Aspergillus niger*. Colonia con 10 días de crecimiento, incubada a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ en medio: a) EMA, ocupando un cuarto del área de la placa Petri 2 cm de diámetro; b) ADP ocupa la totalidad de la placa Petri, con presencia de esporas negras en el centro de la colonia; c) y d) cabezas conidiales X400; e. conidia, X1000.

Ficha No.3

Especie	<i>Aspergillus oryzae</i>
Clasificación	Fungi, Fungi anamorfo, Aspergillus
Sinónimo(s)	Eurotium oryzae, Aspergillus flavus

Características de la colonia.- Colonia de crecimiento rápido, inicia con un micelio blanco de crecimiento concéntrico. Aparición de esporas verde pálido y amarillo que se torna en diferentes tonos de verde con la madurez de la colonia hasta un color café pálido en la colonia vieja (Figura 19).

Microscopía. Conidióforos muy largos de 2 a 3 mm, cabeza conidial de 150 a 200 micras. Vesícula conidial subesférica de 25 a 60 micras de diámetro. Hifas septadas se bifurcan y presentan longitudes de 2080 micras con 10 micras de ancho. Fiálides en forma de botella con longitud de 10 micras y 5 micras de ancho, crecen muy estrechas alrededor de la vesícula. Conidias de pared lisa de forma ovoide color amarillo claro o café claro, 7 micras.

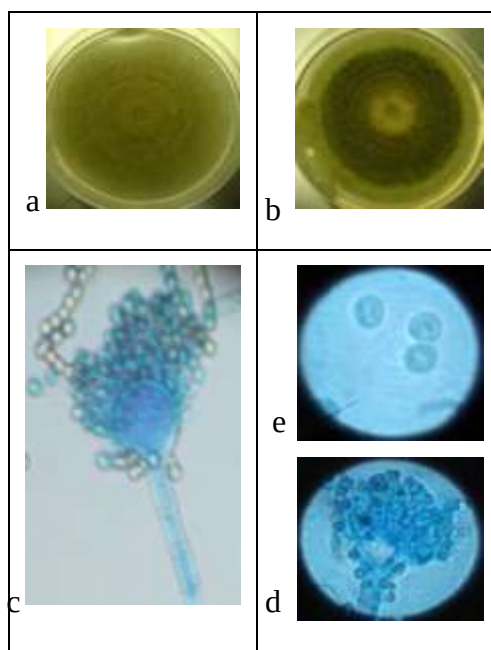


Figura 19. *Aspergillus oryzae*. Colonia con 15 días de crecimiento a 26 ± 1 °C en medio: a) EMA, cubre toda la placa; b) En medio ADP cubre toda la placa con una mayor densidad de esporas; c) y d) cabezas conidiales X400; e) conidia, X1000. Preparaciones realizadas con azul de lactofenol.

Ficha No.4

Especie	<i>Aspergillus flavus</i>
Clasificación	Fungi, Ascomycota, Aspergillus
Sinónimo(s)	<i>Monilia flava</i>

Características de la colonia.- Colonia de crecimiento rápido en Agar Dextrosa Papa y Extracto de Malta Agar a temperatura ambiente (25-27°C), 6.5 cm en 6 días. Inicia con un micelio blanco algodonoso pasando por diferentes tonalidades de amarillo hasta verde chicharo, color amarillo por el reverso de la colonia, abundantes estructuras conidiales en toda la colonia con bordes de micelio blanco. Ausencia de exudado (Figura 20).

Microscopía. Conidióforos vesiculares con cabezas radiadas de 50 – 100 micras de ancho, soporte de conidióforo muy largo hasta 500 micras por 8 micras de diámetro. Vesícula redonda u oval de 20 x 18 micras con métulas y fiálides que cubren completamente la superficie. Conidias ovales de pared lisa y ligeramente rugosas de 2 – 4 micras.

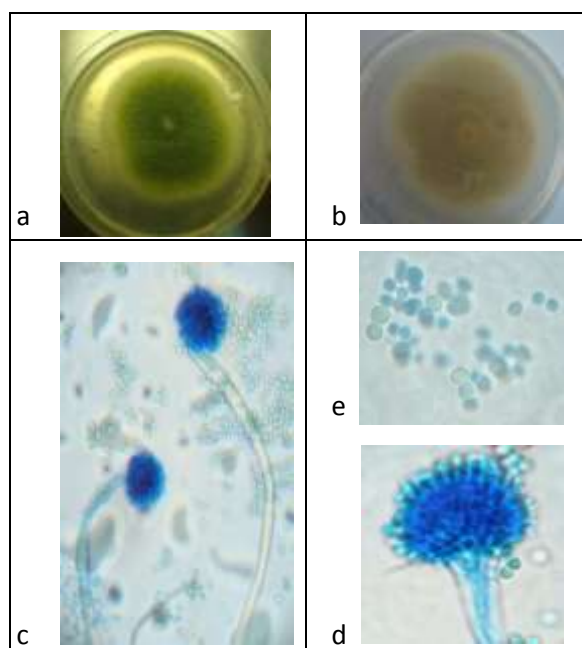


Figura 20. *Aspergillus flavus*. Colonia con 6 días de crecimiento a 26 ± 1 °C en medio: a) ADP cubre tres cuartas partes de la placa con diámetro de 6.5 cm con abundante material conidial b) reverso de colonia, color amarillo paja; c) y d) Cabezas conidiales X400; e. conidia, X1000. Preparaciones realizadas con azul de lactofenol.

Ficha No.5

Especie	<i>Penicillium chrysogenum</i>
Clasificación	Fungi, Fungi anamorfo, <i>Penicillium</i>
Sinónimo(s)	<i>Penicillium baculatum</i>, <i>Penicillium notatum</i>, <i>Penicillium rubens</i>

Características de la colonia.- Colonias de 12 días de 5.5 cm de diámetro ocupando casi la totalidad de la placa en ADP. Inicia crecimiento con micelio blanco a amarillento, velutinoso a flucoso, conidiogénesis moderada, de color verde turquesa, exudados amarillo brillante que se difunde en el medio, reverso amarillo brillante o verde olivo pálido en ausencia de pigmentos. Colonia en medio EMA de 12 días presenta diámetro de 2 cm, crecimiento lento velutinoso conidiogénesis lenta sin exudado (Figura 21).

Microscopía. Los conidióforos se desarrollan de la base de hifas, estípites de 55 – 70 micras de longitud, penicilli tervicilados, generalmente con 1 ò 2 ramas terminales o subterminales, con hifas septadas de 5 micras de ancho, fiálides ampuliformes de 5-8 micras de longitud x 3 micras de ancho, conidias elipsoides a subesféricas de pared lisa, semirugosas de 2 – 3 micras, verdes, con nacimiento en cadena.

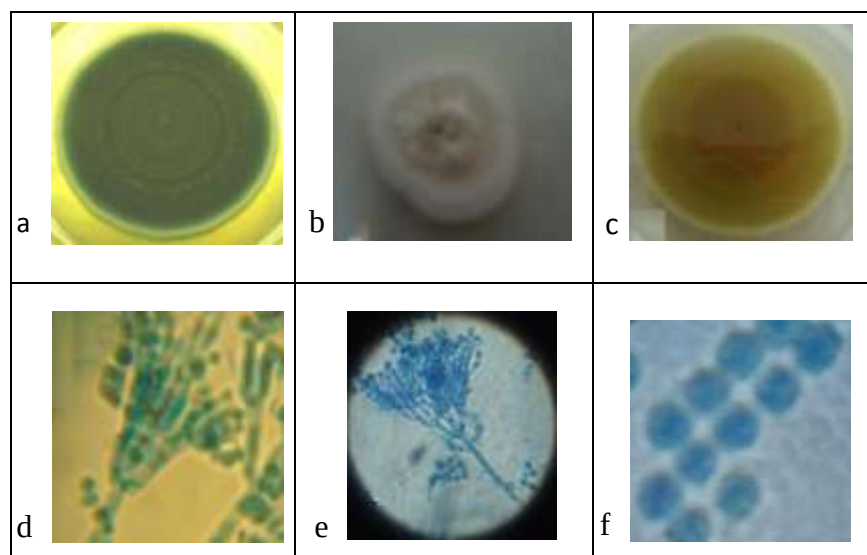


Figura 21. *Penicillium chrysogenum*. Colonia con 12 días de crecimiento incubado a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ en: a) ADP ocupando tres cuartos del área de la placa; b) EMA con diámetro de 15 mm; c) reverso de colonia en ADP, se observa coloración amarilla del exudado al medio; d, e) cabezas conidiales X400; f) conidia, X1000. Preparaciones realizadas con azul de lactofenol.

Ficha No.6

Especie	<i>Penicillium sp.</i>
Clasificación	Fungi, Fungi anamorfo, <i>Penicillium</i>
Sinónimo(s)	ninguno

Características de la colonia.- Colonia de crecimiento lento en Agar Dextrosa Papa incubado a 25 ± 1 °C), 4.5 cm de diámetro en 12 días. Colonia velutinosa a flucosa, color verde brillante con bordes globosos color blanco y exudado amarillo brillante hacia el medio, reverso amarillo (Figura 22).

Microscopía. El conidióforo más esbelto se bifurca con longitudes de 70-100 micras, usualmente tervercilado con hifas septadas de 2-3.5 micras de ancho. Fiálides de 5-10 micras de longitud x 2 micras de ancho en forma de botella. Conidias ovoides rugosas de 4x3 micras, verdes.

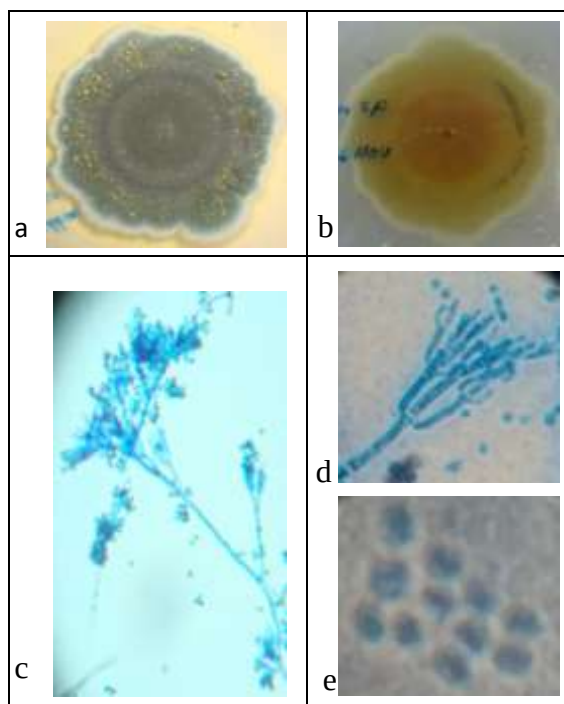


Figura 22. *Penicillium sp.* Colonia con 12 días de crecimiento a 25 ± 1 °C en medio: a) ADP, ocupando la mitad de la placa; b) reverso de colonia, observándose coloración amarilla por exudado; c) estructuras miceliales X100; d. cabeza conidial X400; e. Conidias, X1000. Preparaciones realizadas con azul de lactofenol.

Ficha No. 7

Especie	<i>Trichoderma harzianum</i>
Clasificación	Fungi, Fungi anamorfo, Trichoderma
Sinónimo(s)	ninguno

Inicia esporulación a las 72 h en medios expuestos a luz, color blanquecino y ligeramente verde oscuro olivo. No presenta tinción del medio de cultivo. Esporulación blanquecina verde turquesa en medio PDA y EMA en oscuridad, con micelio floculoso a las orillas, mayor esporulación de cepas sembradas en PDA.

En observación al microscopio óptico se distinguen fiálides muy ramificadas, ampuliformes hialinas. Conidióforos hialinos, de paredes lisas, rectas de 6,0-7,75 μm de largo por 4 μm de ancho en la base. Se presentan esporas globosas y elipsoides de 3,0-3,55 μm de diámetro (Figura 23).

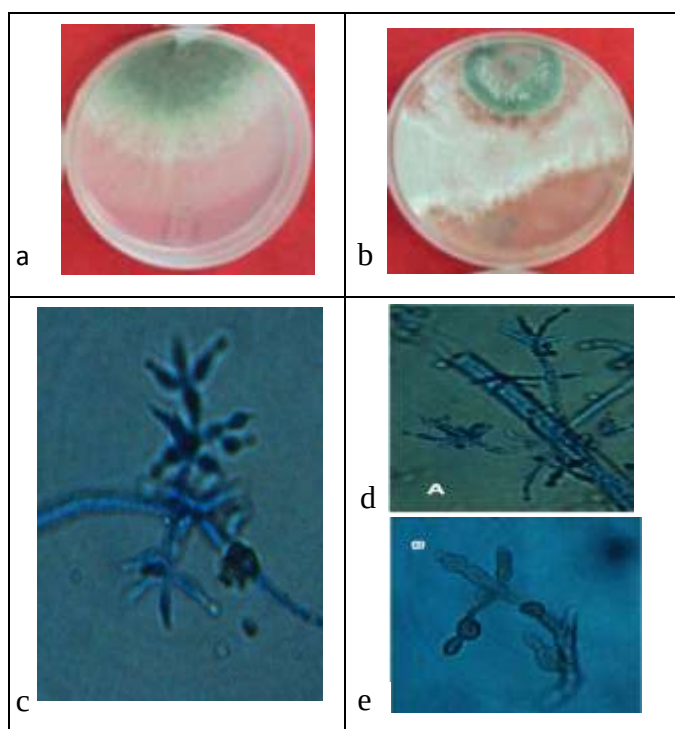


Figura 23. *Trichoderma harzianum*. Colonia con 72 horas de crecimiento a 25 ± 1 °C en medio: a) EMA, presenta crecimiento rápido, ocupando la mitad de la placa; b) ADP, presenta el mismo crecimiento que en medio EMA; c, d y e) estructuras miceliales observándose conidióforos, esporas y fiálides muy ramificadas X400 y X1000. Preparaciones realizadas con azul de lactofenol.

5.8 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Las cepas estudiadas presentaron un crecimiento restringido en el medio Agar Extracto de Malta y un mejor crecimiento en Agar Dextrosa Papa. Durante el aislamiento de cepas puras no se observó la presencia de las especies *Trichoderma reesei* ni *Trichoderma sp.* Se desarrollaron pruebas de antagonismo entre las especies de *Trichoderma* con *Aspergillus* y *Penicillium* observándose que la especie *Trichoderma* fue más invasivo que las otras especies, cubriendo casi la totalidad del medio y limitando el crecimiento de las otras.

CAPÍTULO 6

PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LIPASA EXTRACELULAR A PARTIR DE UNA CEPA LOCAL DE *TRICHODERMA HARZIANUM*

6.1 RESUMEN

El creciente interés en la producción de lipasa está relacionado con el potencial en las aplicaciones biotecnológicas que presentan estas enzimas. Estudios actuales en la producción de la lipasa por fermentación en estado sólido (SSF) involucra el uso de residuos agro-industriales con la finalidad de incrementar su atractivo económico. Basados en estos aspectos, el objetivo de este trabajo fue investigar la producción de lipasa por una cepa local de *Trichoderma harzianum* en SSF usando salvado de trigo como sustrato sólido y comparar esta producción de la lipasa con la obtenida por fermentación sumergida (SmF) en medio mineral. La máxima actividad lipolítica obtenida por SmF fue 1.82 ± 0.01 U/ml, en un medio conteniendo sucrosa y aceite de olivo al 2 %. Sin embargo, se alcanzó una actividad de 14.3 U/ml de actividad lipolítica cuando se produjo la lipasa por SSF con un medio que contenía 0.74 % de sulfato de amonio y 0.34 % de urea, 2 % de aceite de olivo y salvado de trigo como sustrato sólido. El pH y temperatura óptimos para la lipasa fueron 8.0 y 40°C, respectivamente. La constante de Michaelis ($K_m = 6.6$ mM) se obtuvo de dos diferentes gráficas, Lineweaver-Burk y Hanes-Woolf. La V_{max} de la enzima se encontró que fue de 7.5 U/ml.

6.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La velocidad de crecimiento de la producción de la enzima por microorganismos es muy importante para el entendimiento del patrón de fermentación. La Figura 29 muestra la velocidad de producción de la biomasa y el cambio de pH durante la fermentación sumergida (SmF) por el *T. harzianum* a $29 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 144 h de incubación. La máxima velocidad de crecimiento se observó entre las 24 y 72 h de crecimiento. A las 120 h, se encontraba presente 9.6 g/L de masa fungal en base seca. Después de este tiempo se observó una ligera disminución en la masa micelial en peso seco. La Figura 25 muestra que la fase retardada de 24 horas es seguida de un crecimiento exponencial (24-72 h) durante el cual se presenta una velocidad de crecimiento específica constante (μ) de 0.04 h^{-1} .

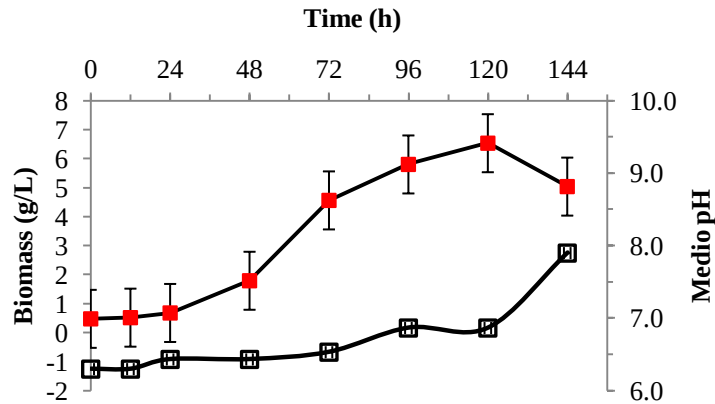


Figura 25. ■ Velocidad de producción de biomasa fungal y □ perfil de pH del medio por SmF.

Después de las 72 h, la velocidad específica de crecimiento disminuye (pendiente de la curva en la Figura 26). Esto se debe a que después de las 72 h en lugar de tener un crecimiento homogéneo celular se observa la formación de agregados miceliales en todo el medio de cultivo en el cual el suplemento de oxígeno y nutrientes se convierten en una limitante del crecimiento.

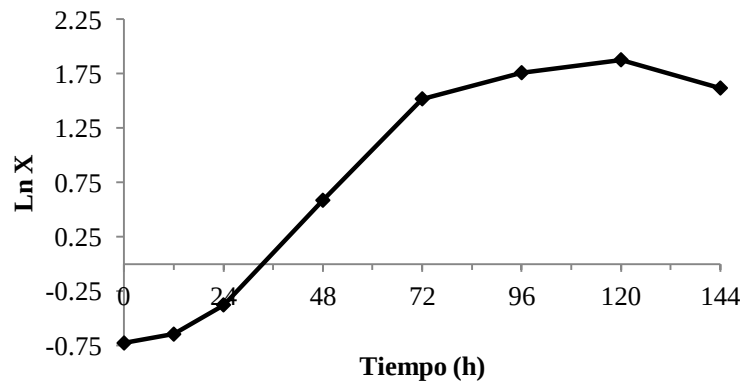


Figura 26. Velocidad específica de crecimiento de biomasa fungal, (μ) 0.04 h^{-1} en el período de 24-72 h.

La Figura 26 muestra la actividad de la lipasa extracelular durante la SmF. La velocidad de secreción de la lipasa al medio de fermentación fue la más alta entre las 24 y 48 h, después la velocidad decrece gradualmente. La máxima actividad observada fue 1.8 U cm^{-3} a las 72 horas después de alcanzar la fase logarítmica de crecimiento. Esto sugiere que la producción de lipasa por la cepa *T. harzianum* está parcialmente asociada con el

crecimiento. Entonces su actividad decrece ligeramente debido a la desnaturalización de la enzima formada. Resultados similares fueron obtenidos por Rajesh et al. [118].

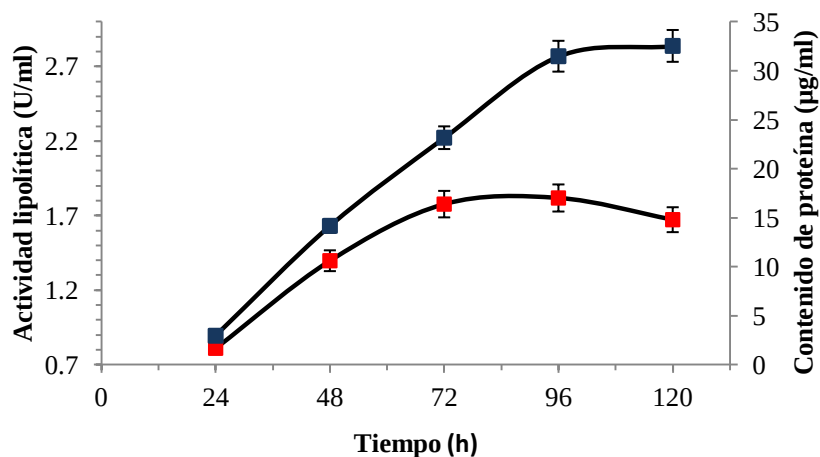


Figura 27. —■— Producción de lipasa y —■— contenido total de proteína del extracto fungal a diferentes tiempos de fermentación

La actividad de la lipasa obtenida por SSF usando como sustrato sólido salvado de trigo se muestra en la Figura 27. Las condiciones de fermentación fueron 60% de contenido en humedad y 1.27×10^7 esporas.g⁻¹ como inóculo. La producción de la lipasa inicia a las 24 h seguida de una curva exponencial alcanzando el máximo a las 120 h (71.3 ± 1.48 U.g⁻¹).

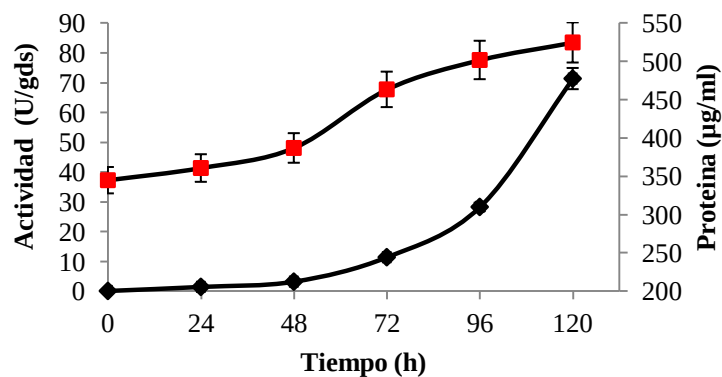


Figura 28. —■— Producción de enzima y —■— contenido total de proteína por SSF a diferentes tiempo de fermentación.

Comparando los mejores resultados de la actividad de la lipasa por ambos tipos de fermentaciones y expresando estos en términos de volumen de medio de cultivo, se puede observar que la lipasa producida por SSF (14.3 U.cm⁻³) es superior al valor reportado por SmF (1.82 U.cm⁻³). Por esta razón se demuestra que la fermentación SSF es un método

atractivo de producción de lipasa desde el punto de vista económico. Un criterio similar es compartido por Edwinoliver et al. [119] en su trabajo sobre producción de lipasa por *Aspergillus niger* usando SSF.

La lipasa del *T. harzianum* fue caracterizada para obtener su temperatura y pH óptimos. En la Figura 28 se muestra el comportamiento de la actividad con respecto a la temperatura de hidrólisis, dando como resultados un rango óptimo de temperatura de 40 a 45 °C. Similares resultados fueron reportados [118, 120].

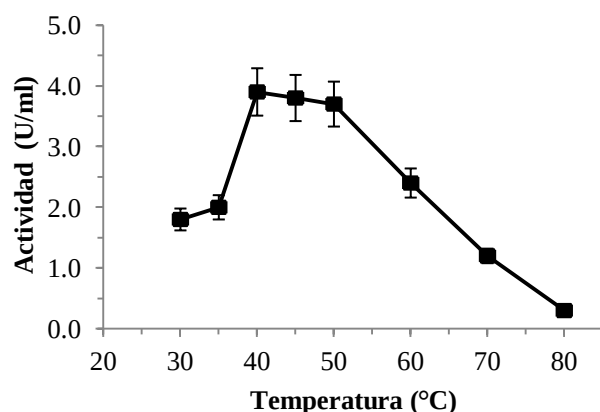


Figura 28. Optimum temperature of *T. harzianum*

El pH óptimo de actividad de la lipasa se observó en un valor de 8.03 (Figura 29).

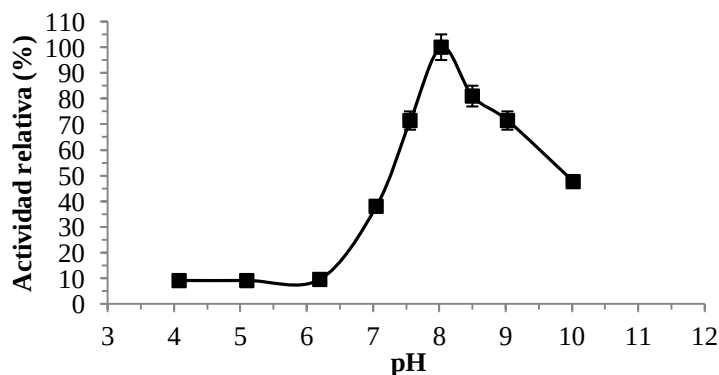


Figura 29. Efecto del pH en la actividad de la lipasa de *T. harzianum*. The 100% de actividad relativa fue $2.1 \pm 0.1 \text{ U.cm}^{-3}$.

El valor aquí determinado se encuentra en acuerdo con los datos presentados por otros autores [120-121]. Respecto a la estabilidad de la lipasa al pH se observó que a temperatura

ambiente la lipasa de *T. harzianum* era inestable cuando se incubó a pH ácidos (por debajo de pH 7) pero fue estable por 24 h a pH 7-8.5, reteniendo el 100% de su actividad a pH 8. La constante de Michaelis K_m y la Velocidad máxima V_{max} para la lipasa fueron determinadas usando *p*-Nitrofenilbutirato (*p*-NFB) como sustrato. El valor de la K_m para la enzima libre fue estimada por las gráficas de Lineweaver-Burk (Figura 30) y Hanes-Woolf (Figura 31) siendo 6.59 y 6.67 mM respectivamente. Los valores de la V_{max} obtenidos de las dos gráficas fueron 7.62 y 7.44 U.cm⁻³ respectivamente.

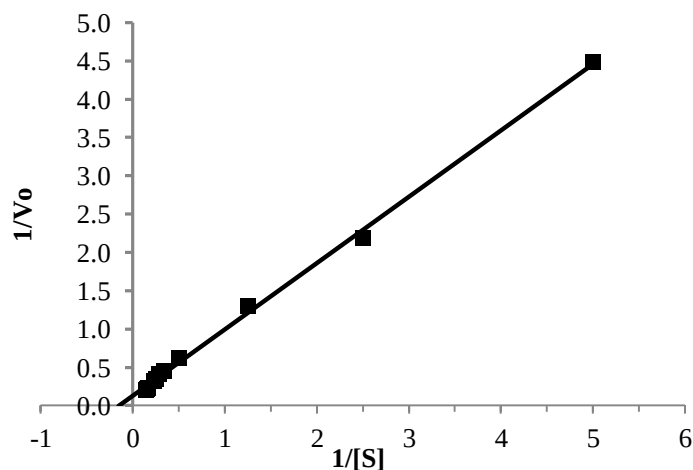


Figura 30. Lineweaver-Burk gráfico para lipasa de *T. harzianum*. La determinación se condujo a varias concentraciones de sustrato a las condiciones estandar, K_m 6.59 mM y V_{max} 7.62 U.cm⁻³.

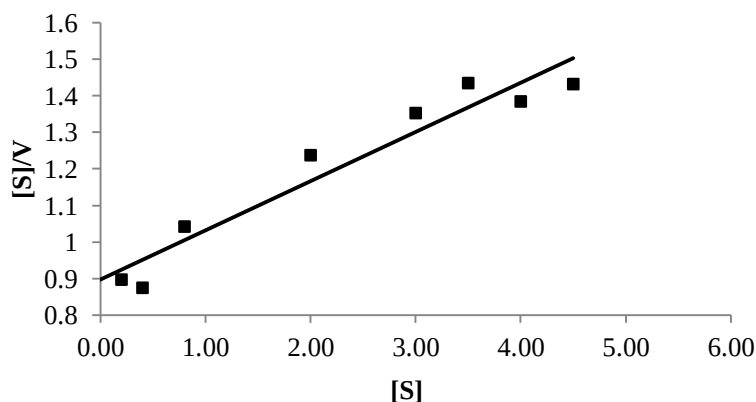


Figura 31. Hanes-Woolf gráfico para lipasa de *T. harzianum* . La determinación se condujo a varias concentraciones de sustrato a condiciones estandar, K_m 6.67 mM y V_{max} 7.44 U.cm⁻³.

6.3 CONCLUSIONES

En conclusión, una lipasa extracelular producida y aislada de una cepa local de *Trichoderma harzianum* exhibió niveles elevados de enzima (71.3 U/gss) por fermentación en estado sólido (SSF) utilizando salvado de trigo, este estudio ha sido el primer estudio reportado sobre lipasa de *Trichoderma harzianum* por SSF. Esta lipasa tiene propiedades en común con lipasas de otras cepas de *Trichoderma harzianum* y exhibe cinética favorable para su uso en desarrollo biotecnológico. Estos resultados sumados al hecho de que este hongo es generalmente reconocido como un microorganismo seguro, hacen que este estudio sea valioso para futuras investigaciones.

CAPÍTULO 7

MEJORAMIENTO DE LA PRODUCCIÓN DE LIPASA POR FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO

7.1 RESUMEN

En el presente estudio, la producción de lipasa extracelular se realizó a partir de cepas de *Penicillium chrysogenum*, *Trichoderma harzianum* y *Aspergillus flavus* por fermentación en estado sólido (SSF). La temperatura de incubación para las tres cepas fue $29 \pm 1^\circ\text{C}$ y un contenido de humedad de 65% (g/gss). Se estudiaron los efectos de tres factores en la velocidad de producción de la lipasa. Los factores seleccionados incluyeron pH inicial (6 y 7), tiempo de fermentación (72, 96 y 120 h) y dos diferentes tipos de mezcla de sustrato, salvado de trigo-aceite de olivo (WBO) y salvado de trigo-bagazo de higuierilla (WBC). Estos factores y sus niveles óptimos se analizaron usando un diseño factorial mixto. Se encontró que el tiempo de fermentación y el pH presentaron efectos positivos en la producción y velocidad de secreción de la lipasa. Sin embargo el tiempo de fermentación presentó mayor efecto que el pH inicial. El tipo de sustrato mostró un efecto de menor importancia comparado con los otros dos factores. Los resultados indicaron que las tres cepas fueron capaces de crecer y producir lipasa en ambos medios de cultivo. La máxima actividad de lipasa obtenida fue 121.35 U/gss producida por *Aspergillus flavus*, el cual produjo cinco y nueve veces la lipasa producida por *T.harzianum* y *P. chrysogenum* respectivamente a las mismas condiciones. Un pH inicial neutro y 96 h de tiempo de fermentación fueron las óptimas condiciones para la producción de lipasa por *Aspergillus flavus*.

7.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se realizó la producción de lipasa extracelular a partir de *Penicillium chrysogenum*, *Trichoderma harzianum* y *Aspergillus flavus* por fermentación en estado sólido utilizando como soporte sólido mezclas de salvado de trigo-aceite de olivo (WBO) y salvado de trigo-bagazo de higuierilla (WBC). La fermentación en estado sólido usando residuos agrícolas y alimenticios es bien aceptada para la producción de enzimas [120]. Se investigaron los efectos de tres factores en la velocidad de producción de lipasa, Tipo de mezcla de sustrato,

pH Inicial (6.0 y 7.0) y tiempo de fermentación (72, 96 y 120 horas). El aceite de olivo es comúnmente utilizado en la producción de lipasas a partir de hongos filamentosos. Se utiliza no solo como inductor de la generación de lipasa, sino también como fuente de carbono para el crecimiento de microorganismos [40]. Los resultados obtenidos a partir del trabajo experimental se analizaron usando un diseño factorial mixto (Tabla 11). Este diseño es un modelo empírico usado para evaluar la relación entre un set de factores experimentales controlables y sus resultados observados.

Como se observa en la Tabla 11, la adición de aceite de olivo y bagazo de higuera al salvado de trigo como sustrato, influyó considerablemente la producción enzimática. Se observó que ambas mezclas de sustratos: WBO y WBC son adecuados para la obtención de lipasa. Sin embargo la mezcla WBO, por ser de fácil disponibilidad comparada con la mezcla WBC, parece ser la mejor opción para la producción de lipasa extracelular a partir de *Penicillium chrysogenum* y *Trichoderma harzianum*. En contraste con la fermentación de *Aspergillus flavus* indicó que el uso del sustrato WBC provee una respuesta óptima: ~ 121 U/gss a un pH inicial de 7 y 96 horas de tiempo de fermentación. Se sugiere que este efecto fue causado por los ácidos grasos liberados a partir del metabolismo del aceite presente y la mejor producción de lipasa parece estar correlacionada con el contenido de ácidos grasos [122].

Cabe mencionar que no se encontraron reportes acerca de la producción de lipasa a partir de *Trichoderma harzianum* por SSF utilizando bagazo de higuera como sustrato. Sin embargo, otros residuos agro-industriales han sido explotados, tales son: pasta de babassu, pasta de sésamo, pasta de jatropha y pasta de higuera han sido reportados en la producción de lipasa por SSF. 26.4 U/gss [30], 630 U/gss [123], 384 U/gss [124], 976 U/gss [125] y 44.8 U/gss [126], a partir de *Penicillium simplicissimum*, *Aspergillus niger* NCIM 1207, *Aspergillus niger* MTCC 2594, *Pseudomonas aeruginosa* y *P. simplicissimum* respectivamente. Algunos de ellos presentan actividades más bajas comparadas con las reportadas aquí por el uso de *T. harzianum*. Por lo tanto esta cepa puede ser de importancia para una alta producción de lipasa.

El pH del medio de cultivo es un factor importante, el cual afecta el crecimiento microbiano y la producción enzimática durante la SSF. Cada microorganismo posee un único pH

óptimo al igual que un rango de pH para su crecimiento y actividad. Los hongos filamentosos se supone sobreviven en un amplio rango de pH bajo las condiciones de cultivo en estado sólido debido a que el sustrato sólido presenta una mejor capacidad reguladora de pH (buffer) [127].

Los resultados obtenidos en este estudio demostraron que la producción de lipasa a partir de *T. harzianum* y *Aspergillus flavus* se vió afectada por el cambio de pH en el rango de pH investigado (Tabla 12) y pH inicial neutro es el más favorable para la producción de lipasa. El cambio de pH inicial en el rango de 6 a 7 no mostró efecto significativo en la producción de lipasa por *P. chrysogenum*.

Otro factor que afecta drásticamente la producción es el tiempo de fermentación. El incremento del tiempo de 72 a 120 h dio como resultado general un significativo aumento en la actividad de la lipasa de todos los microorganismos. Aparentemente la máxima actividad de lipasa se alcanza a las 120 h de fermentación (Tabla 11). En periodos de incubación mayores al rango manejado puede ocurrir una disminución en la actividad enzimática lo cual se relaciona a la disminución de nutrientes o desnaturalización de la enzima causada por la interacción con otros componentes en el medio o debido a cambios de pH [120]. Por ejemplo, *Aspergillus flavus* mostró una disminución en la velocidad de producción de lipasa en 1.2 veces después de 96 h.

La comparación de los datos presentados en la Tabla 13 demuestra que el mejor productor de lipasa es la cepa *Aspergillus flavus* seguido de *Trichoderma harzianum* y *Penicillium chrysogenum* a las condiciones de experimentación.

Tabla 13: Factores y resultados de la creación de un diseño factorial (Respuesta; Actividad U/gss)

	<i>Penicillium chrysogenum</i>				<i>Trichoderma harzianum</i>				<i>Aspergillus sp.</i>			
	pH 6		pH 7		pH 6		pH 7		pH 6		pH 7	
	WBO	WBC	WBO	WBC	WBO	WBC	WBO	WBC	WBO	WBC	WBO	WBC
72 h	14.77	13.38	14.14	10.8	11.32	11.35	12.87	17.56	78.02	92.04	70.36	99.22
96 h	17.22	12.67	17.29	13.59	29.7	25.9	41.53	24.06	84.9	95.72	90.34	106.35
120 h	18.39	14.97	19.97	15.44	60.81	45.17	77.2	47.29	89.02	89.9	107.78	103.13

La significancia de varios efectos y de su interacción en la producción de lipasa se evaluó aplicando el análisis de varianza (ANOVA). Los datos obtenidos se enlistan en la Tabla 14.

Tabla 14. Análisis de varianza para actividad de lipasa

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F	valor-p	Significancia
Fungi	2	77567.3	38783.7	2262.03	0.000	Significante
Tiempo	2	4937.7	2468.9	143.99	0.000	Significante
Sustrato	1	16.3	16.3	0.95	0.335	Insignificante
pH Inicial	1	388.7	388.7	22.67	0.000	Significante
Fungi*Tiempo	4	3811.8	952.9	55.58	0.000	Significante
Fungi*Sustrato	2	1424.3	712.2	41.54	0.000	Significante
Fungi*pH Inicial	2	207.6	103.8	6.05	0.004	Significante
Tiempo*Sustrato	2	837.9	418.9	24.43	0.000	Significante
Tiempo*pH Inicial	2	196.0	98.0	5.72	0.006	Significante
Sustrato*pH Inicial	1	6.7	6.7	0.39	0.534	Insignificante

Como se demuestra en la Tabla 14, ocho efectos tienen valore-p menores a 0.05, por lo tanto estos afectan la producción de lipasa. Para una mejor comprensión del análisis se construyó un diagrama de Pareto ilustrando las magnitudes de los efectos (Figura 32). El efecto de los factores más importantes decrecen en el rango: Fungi > Tiempo de fermentación > Fungi*Tiempo de fermentación> Fungi*Sustrato > Tiempo*Sustrato > pH >> Sustrato.

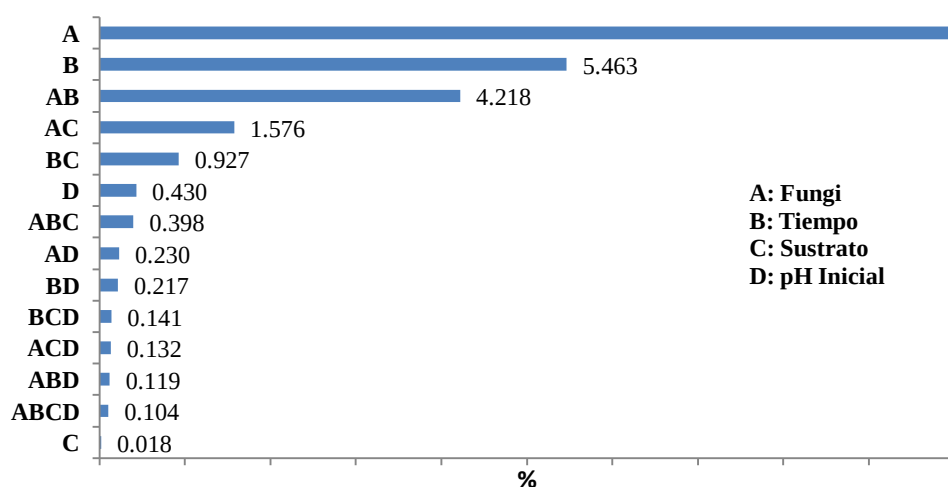


Figura 32. El gráfico de Pareto de los efectos arroja el perfil de los factores efectivos. Fungi > Tiempo Ferm. > Fungi x Tiempo Ferm. > Fungi x Sustrato > Tiempo Ferm. x Sustrato > pH

Las condiciones óptimas para la producción de lipasa a partir de *Penicillium chrysogenum*, *Trichoderma harzianum* and *Aspergillus flavus* se identificaron aplicando un diseño

factorial de nivel mixto y se encontró que fueron: pH 7 y un tiempo de fermentación de 96 horas. El sustrato óptimo para *Penicillium chrysogenum* y *Trichoderma harzianum* es WBO. Sin embargo, la máxima actividad lipolítica se obtuvo utilizando el residuo agro-industrial salvado de trigo-bagazo de higuera (WBC) y *Aspergillus flavus* como productor de lipasa en las condiciones óptimas mencionadas arriba.

7.3 CONCLUSIONES

En este estudio se investigaron los efectos de las condiciones experimentales en la producción de lipasa extracelular a partir de *Penicillium chrysogenum*, *Trichoderma harzianum*, and *Aspergillus flavus* por fermentación en estado sólido usando residuos agro-industriales como sustratos. Los principales factores que afectaron la producción enzimática se identificaron como: Tiempo de fermentación seguido de las interacciones entre fungi y tiempo de fermentación y por último fungi y tipo de mezcla de sustrato. El cambio de pH tuvo un efecto menor. La investigación mostró que la SSF es una técnica adecuada para la producción de lipasa para la utilización de *Aspergillus flavus*. Es más, un tiempo corto de fermentación (96 h) y el uso de residuos agro-industriales como el bagazo de higuera hace de la SSF un proceso prometedor de importancia comercial.

CAPÍTULO 8

INMOVILIZACIÓN DE LIPASA USANDO POLÍMEROS HIDROFÍLICOS EN FORMA DE ESFERAS DE HIDROGEL

8.1 RESUMEN

El propósito de este estudio fue inmovilizar lipasa (triacilglicerol éster hidrolasa, E.C. 3.1.1.3) producida y aislada a partir de cepas de *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus flavus* y *Trichoderma harzianum* las cuales fueron tipificadas en trabajos anteriores. Para la inmovilización de la lipasa se usaron los polímeros de alginato de sodio, chitosán y alcohol polivinílico (PVA); se prepararon esferas por encapsulamiento de la lipasa en chitosán, alginato y mezcla PVA/alginato en relación 12:1. También se prepararon esferas de alginato recubiertas de chitosán para evaluar su carga enzimática, actividad y caracterizar las esferas. Las esferas de alginato y Chitosán fueron preparadas por gelificación iónica usando cloruro de calcio para el alginato e hidróxido de sodio para el chitosán como agentes de entrecruzamiento. En el caso de la mezcla alginato-PVA se preparó una solución saturada de ácido bórico con el 2% de cloruro de calcio y para las esferas de alginato recubiertas de chitosán se utilizó una solución de cloruro de calcio al 2% y solución de chitosán al 3% como agente de entrecruzamiento y recubrimiento de chitosán. Las esferas producidas se preservaron en forma húmeda a 4°C. Los resultados muestran que las esferas de alginato recubiertas de chitosán presentaron una eficiencia de atrapamiento alta (79.8 %) con una actividad residual de 64% la cual fue la mayor actividad observada en este estudio. El efecto del pH en la actividad de la lipasa no fue muy diferente entre la lipasa libre y la inmovilizada, observándose el valor óptimo al pH 8.0. La temperatura óptima observada para la lipasa inmóvil en chitosán, y alginato/PVA fue 45°C, similar a la temperatura óptima de la enzima libre. En el caso de la lipasa inmóvil en alginato y alginato/chitosán la temperatura óptima se observó a 50°C, probablemente debido al ambiente protector que ejerce el alginato a estas concentraciones sobre la estructura de la lipasa. Se determinó la estabilidad al pH y la estabilidad a la temperatura, observándose una mayor estabilidad al pH 5, tanto en el caso de la lipasa libre como en el caso de los inmovilizados. En el caso de la estabilidad a la temperatura, se observó que a los 60°C la lipasa libre sufre desnaturalización a los 40 min de exposición. A los 120 min de exposición

la lipasa libre presenta el 85, 57, 32, y 43 % de la velocidad de hidrólisis presentada por la lipasa inmovilizada en chitosán, alginato, mezcla alginato/chitosán y alginato/PVA respectivamente. La estabilidad al almacenamiento de la lipasa inmóvil se determinó en un periodo de 30 días, presentándose la mayor estabilidad de la lipasa inmóvil en las esferas de alginato recubiertas de chitosán, presentando una actividad relativa del 89% al término del período.

8.2 INTRODUCCIÓN

Grandes esfuerzos se han realizado en las últimas décadas para desarrollar la actividad catalítica y estabilidad operacional de las enzimas industriales a través del uso de la ingeniería genética, inmovilización y/o alteración de los procesos. La inmovilización de las enzimas no solo realza su estabilidad, también ofrece otras ventajas tales como el reúso, la fácil separación del producto y un mayor control sobre la catálisis y el proceso. Las lipasas son ampliamente usadas en la industria debido al gran número de reacciones que catalizan. Es una enzima importante en el sistema biológico, donde cataliza la hidrólisis de triacilgliceroles a glicerol y ácidos grasos [128]. Además de sus sustratos naturales, las lipasas tienen características únicas, como catalizar reacciones que involucran compuestos orgánicos insolubles en fase acuosa y son capaces de preservar su actividad catalítica en solventes orgánicos, sistemas bifásicos y en soluciones micelares [129]. La versatilidad de las lipasas en la catálisis de reacciones las hace un singular catalizador heterogéneo para reacciones de transesterificación. El propósito de este estudio fue inmovilizar la lipasa por atrapamiento en esferas de polímeros y estudiar el efecto de estos soportes en la carga de la enzima, su actividad residual con respecto al tiempo de almacenamiento y la morfología de las esferas producidas, así como evaluar la influencia de la incorporación de dos polímeros. Los polímeros utilizados para la formación de esferas de hidrogel fueron alginato, chitosán y alcohol polivinílico (PVA). El alginato está disponible como sales de sodio del ácido poliurónico, conteniendo proporciones variadas ácido 1→4 β-D-manurónico y ácido α-L-gulurónico. En presencia de Ca^{+2} o de otras formas de cationes multivalentes forma geles. El chitosán es β-(1→4)-2-amino-2-deoxy-D-glucosa, el cual es un polímero natural obtenido del chitín por *N*-deacetilación. El alcohol polivinílico (PVA) es un polímero sintético, no tóxico y que ha sido utilizado extensivamente en biotecnología en la

inmovilización de enzimas y microorganismos debido a sus propiedades que favorecen la estabilización de proteínas y la preservación de la actividad biológica.

8.3 MATERIALES Y MÉTODOS

Lipasa liofilizada y producida por fermentación en estado sólido a partir de *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus flavus* y *Trichoderma harzianum* (EC 3.1.1.3). Alginato de sodio, chitosán, alcohol polivinílico (PVA), hidróxido de sodio, CaCl_2 , ácido bórico y todos los demás reactivos utilizados fueron calidad grado reactivo.

8.3.1 Preparación de esferas

Esferas de chitosán

Se preparó una solución de chitosán al 4% (w/v), disolviendo chitosán polvo en ácido acético al 1%. Los agregados de chitosán se formaron de variadas formas y tamaños (3x5 mm promedio) cargando 10 ml de la solución de polímero en una jeringa con orificio de 1mm de diámetro y agregando por goteo en 50 ml de un baño coagulante compuesto de NaOH 1M y 26% (v/v) de etanol con agitación suave. Se dejó permanecer por toda la noche, se separaron los agregados por decantación y se lavaron con agua desionizada hasta pH 8.0. La lipasa se inmovilizó en los agregados de chitosán por absorción física, de acuerdo a la metodología desarrollada por [130]. Los agregados de chitosán (7 gr) se sumergieron previamente en hexano con agitación (120 rpm) por 1 h. La lipasa estuvo en contacto con el soporte bajo agitación. Posteriormente, se removió el exceso de hexano y se agregaron 10 mg de lipasa disuelta en 40 ml de agua bi-destilada y se aplicó agitación magnética por 3 h, seguido de un período adicional de 24 h bajo condiciones estáticas a 4°C. El derivado de esto fue decantado y enjuagado con hexano. Las soluciones decantadas y los filtrados se colectaron para mediciones de pérdidas de lipasa. Un método similar se utilizó para preparación de esferas de chitosán placebo (sin lipasa atrapada).

Esferas de alginato

Los agregados se prepararon con solución de alginato al 1.5%. Las soluciones de alginato, CaCl_2 y lipasa se prepararon en buffer Tris-HCl 0.05 M a pH 8.02. Una alícuota de 8 ml de la solución de alginato se mezcló con 11.2 mg de lipasa en 2 ml de buffer agitándose por 30 min. La mezcla se cargó en una jeringa de plástico de 12 ml con punta de 1 mm de diámetro y se agregó por goteo en 30 ml de solución de CaCl_2 con agitación magnética

suave, dejándose en agitación por 40 min, después de lo cual la mezcla se decantó. Los agregados se lavaron dos veces con alícuotas de 3 ml de buffer Tris-HCl y las esferas se almacenaron húmedas a 4°C para posteriores estudios. Un método similar se siguió para la preparación de agregados de alginato placebo. Las soluciones se colectaron para determinar eficiencia de inmovilización.

Esferas de alginato/PVA

Los agregados se prepararon mezclando 10 ml de solución de alginato (2% p/v) con 20 ml de solución de PVA (12% P/V) para obtener una mezcla de PVA/Alg en relación 11:1 p/p. A esta mezcla se agregaron 2 ml de solución concentrada de lipasa en solución de buffer Tris-HCl 0.1 M pH 8.0 y se agitó magnéticamente por 30 min. Esta solución se cargó en una jeringa y se agregó por goteo a una solución saturada de ácido bórico y CaCl₂ al 2% p/v con agitación magnética suave dejando solidificar por 45 min. Se preparó un placebo también. Las soluciones se separaron por filtración en un cedazo. Las esferas se lavaron con agua bidestilada y se filtraron para almacenarse húmedas a 4°C. Los filtrados y los lavados se colectaron para analizar proteína y actividad lipolítica.

8.3.2 Enzima inmovilizada

La cantidad de enzima (proteína) se determinó de acuerdo al método Bradford [131], usando Albúmina de Suero Bovino (ASB) como estándar. La cantidad de proteína inmovilizada (PI) se determina indirectamente de la diferencia entre la Cantidad de Proteína Introducida (CPI) y la Cantidad de Proteína Remanente (CPR) en la solución preparada como se muestra en la Ec.1

$$PI = CPI - CPR \quad (1)$$

La eficiencia de encapsulamiento de la enzima en los agregados se calculó por la fórmula mostrada en la Ec. 2

$$E_e(\%) = (PI/CPI) \times 100 \quad (2)$$

8.3.3 Actividad enzimática

La actividad de la lipasa se determinó por el método espectrofotométrico [132] usando p-nitrofenilbutirato (p-NFB) como sustrato. La actividad de la enzima se midió en la enzima libre y en la inmovilizada en cantidades equivalentes, considerándose la actividad de la

lipasa libre el 100% de actividad recuperada. En ambas muestras se agregaron 3,900 μL de solución buffer Tris-HCl 0.1M pH 8.2 y 100 μL de sustrato. La reacción se realizó con agitación (120 rpm) a 40°C por 25 min, tomando alícuotas de 100 μL y diluyendo a 4,000 μL con lecturas de absorbancia a 410 nm cada 5 min en un Spectronic 21D. Una unidad de actividad de lipasa se definió como la cantidad de enzima que libera un μmol of *p*-nitrofenol por minuto, bajo las condiciones de prueba. El porcentaje de enzima recuperado o actividad residual se determinó de acuerdo a la Ec. 3.

$$A_r = (AI/AL) \times 100 \quad (3)$$

donde A_r es la actividad residual en la lipasa inmovilizada, AI es la actividad medida en la lipasa inmovilizada y AL es la actividad medida en la enzima libre equivalente.

8.3.4 Determinación de la estabilidad de la lipasa inmovilizada

La estabilidad de la lipasa (libre e inmovilizada) fue evaluada midiendo la actividad enzimática antes y después del tratamiento. La actividad antes del tratamiento fue asignada con el 100% y la actividad después del tratamiento se expresó como actividad relativa. La estabilidad a la temperatura fue evaluada incubando la enzima en una estufa por 2 h a la temperatura de 60°C y midiendo la actividad enzimática periódicamente. La estabilidad de la lipasa al pH se investigó incubando la enzima en soluciones buffer de pH 5, 6 y 7 por 1 h. La lipasa inmovilizada se almacenó en estado húmedo a 4°C. Se evaluó su estabilidad determinando la actividad de la enzima por el método arriba mencionado a intervalos de 10 días durante 30 días.

8.3.5 Caracterización de las esferas

Se contó el número de esferas obtenido en cada prueba. Se realizaron mediciones del diámetro de las esferas usando un microscopio óptico (4X). Se tomaron las lecturas de 25 esferas de un total de 250 esferas aproximadamente y se determinó una distribución de tamaño. La morfología de las esferas se estudió usando un microscopio óptico. La integridad de los polímeros en las esferas se determinó por espectrofotometría de IR.

8.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.4.1 Inmovilización de lipasa de consorcio de hongos en diferentes hidrogeles

Después de que las mezclas polímero-enzima fueron agregadas por goteo en los diferentes medios gelificantes, se formaron agregados de gel los cuales no presentaron aglomeración. Sin embargo, solo los hidrogeles de alginato, Alg/chitosán y Alg/PVA formaron agregados esféricos presentando estructura elástica tipo ahulada. Los agregados de chitosán presentaron formas irregulares (ovoides) y de consistencia débil. La esfera de hidrogel del PVA no solidificó en el medio de ácido bórico, por lo tanto se mantenía dispersa sin llegar a gelificar (Tabla 15).

Tabla 15. Relación entre los diferentes hidrogeles y la formación y fuerza relativa de las esferas

Polímero	Aglomeración	Formación de esferas	Fuerza
Chitosán (4% p/v)	No	No buena	débil
Alginato (2% p/v)	No	Buena	Fuerte
PVA (12% p/v)	No	No buena	No formación de gel
Alg/Chitosán	No	Buena	Fuerte
Alg/PVA	No	Buena	Fuerte

El inmovilizado con alginato formó agregados esféricos con superficies ligeramente rugosas con estructuras compactas si se compara con el inmovilizado de chitosán. Los agregados de chitosán presentaron agregados no esféricos y de textura blanda, fácilmente deformable al tacto. La Figura 33 muestra el aspecto de las esferas formadas.

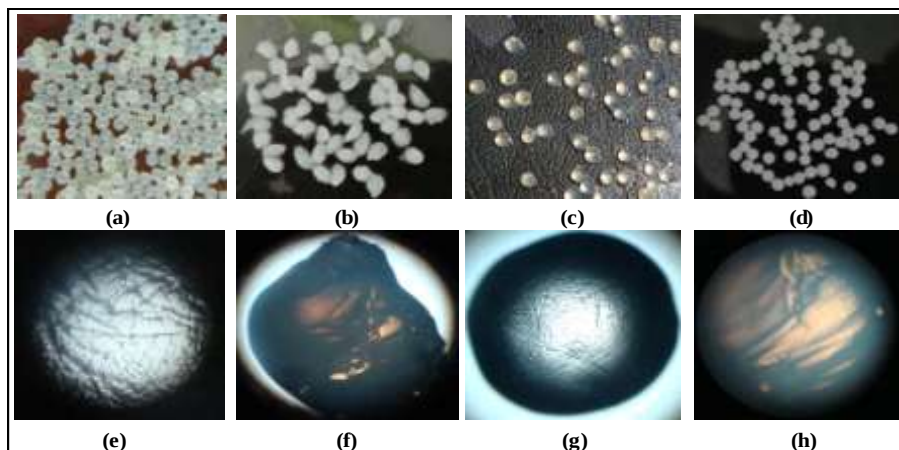


Figura 33. Morfología de esferas de hidrogel. Apariencia de esferas (a), (b), (c),(d) Alginato, quitosán, mezcla Alginato/chitosán y mezcla Alginato/PVA respectivamente. Superficie de esferas al microscopio (10X) (e), (f), (g), (h) de sus respectivos hidrogeles hidrogeles.

La Figura 34 muestra la distribución de tamaño de partícula de las esferas de los diferentes hidrogeles. Las medias del tamaño de partícula fueron para alginato, quitosán, Alg/chitosán y Alg/PVA de 2.35, 4.35, 2.75 y 2.45 mm respectivamente.

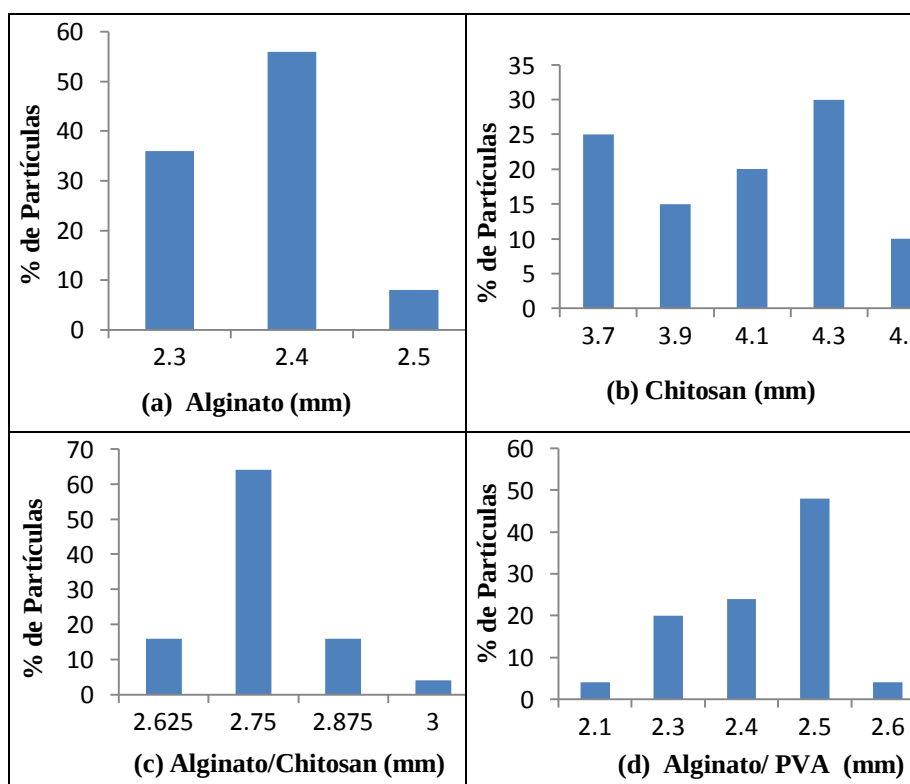


Figura 34. Distribución de tamaño de partículas de esferas de diferentes hidrogeles.

Los espectros de Infrarrojo por Transformadas de Fourier (FTIR) de los inmovilizados de alginato/chitosán y alginato/PVA se muestran en las Figuras 35 y 36. En la Figura 35 se observa en el espectro del Alginato los picos característicos en las regiones de 1640 cm^{-1} y

1050 cm^{-1} de los grupos funcionales $-\text{COO}-$ y $-\text{C-O-C}-$ respectivamente. El espectro de chitosán puro (Figura 35) muestra picos de absorción característicos a 1633 y 1028 cm^{-1} para los grupos N-H y C=O .

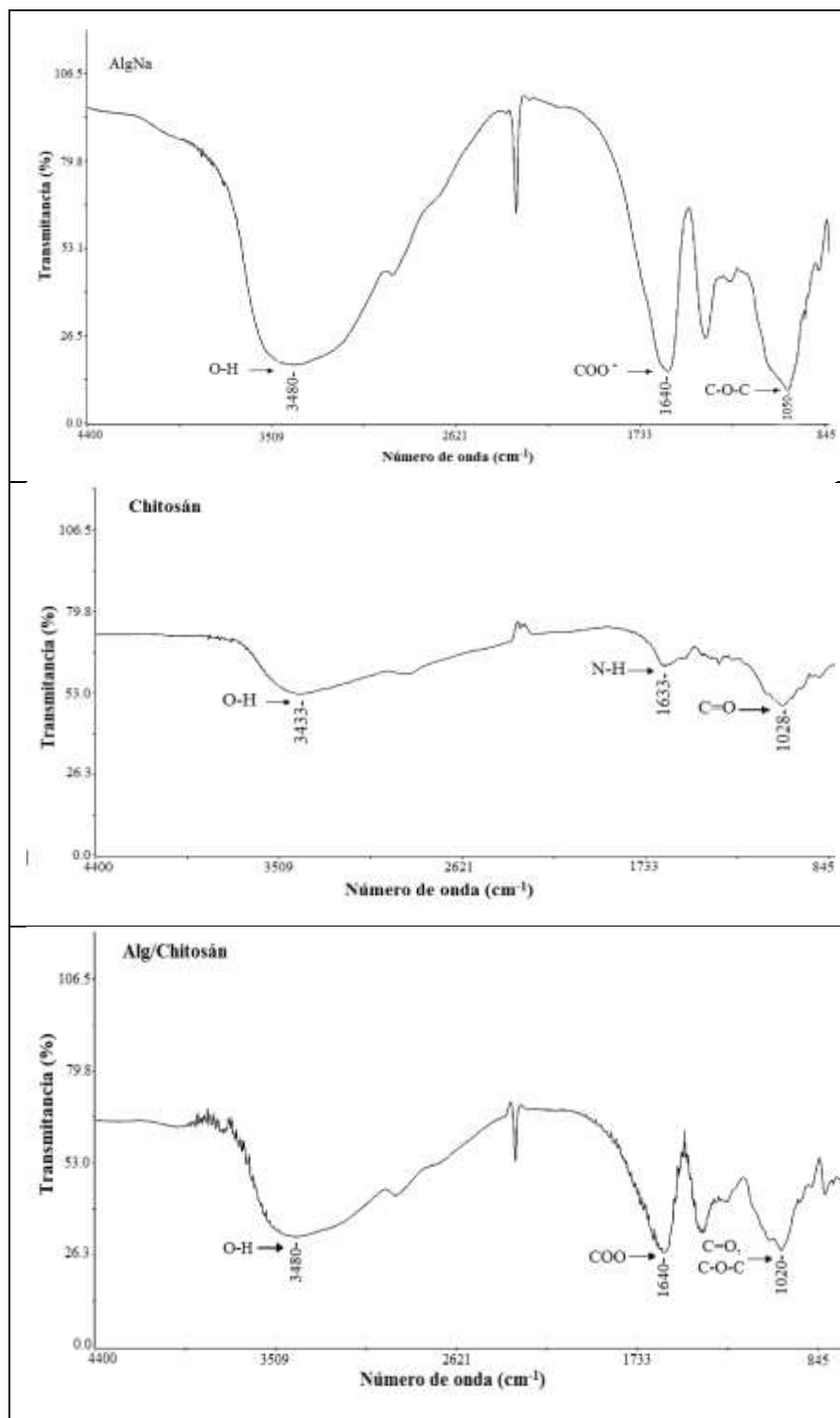


Figura 35. Espectros de FTIR de AlgNa, Chitosán, y mezcla AlgNa/Chitosán.

La Figura 36 muestra el espectro del PVA puro y se observan los picos de absorción a 1086 y 1423 cm^{-1} para el grupo -C-O .

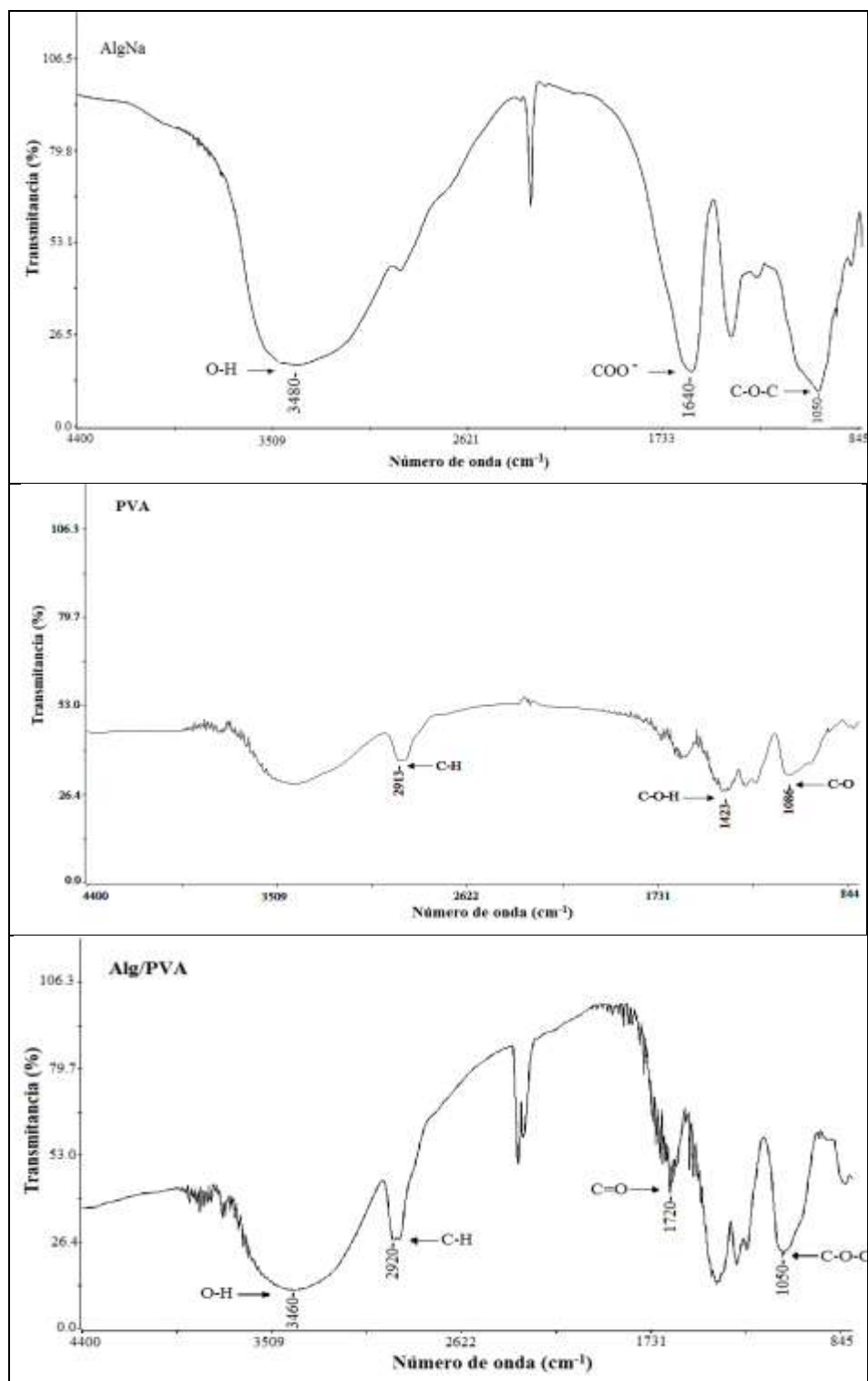


Figura 36. Espectros de FTIR de AlgNa, PVA, y mezcla AlgNa/PVA.

A partir de los espectros de FTIR se infiere que en las mezclas de los polímeros no se presentan otros picos de absorción que no correspondan a los espectros de sus componentes individuales y por lo tanto el análisis por FTIR no muestra evidencia de cambios fuertes de interacción química que cambie la naturaleza de los grupos funcionales de las esferas.

8.4.2 Eficiencia de encapsulamiento

El propósito del estudio de la eficiencia de encapsulamiento fue examinar la habilidad de los polímeros para encapsular la enzima y evaluar la influencia de la incorporación de dos polímeros. A partir de la tabla 16 se puede observar que las eficiencias de encapsulamiento para las esferas de mezclas de polímeros no son marcadamente diferentes. Contrario a la diferencia en la eficiencia de encapsulamiento entre los polímeros puros de alginato y chitosán. En el encapsulamiento de la lipasa por alginato puro se observa una diferencia de 30% del valor mostrado por el encapsulamiento con chitosán, esto es probablemente debido a la estructura más cerrada del alginato [133], lo cual le infiere una menor transferencia de masa con respecto al chitosán. En lo que respecta a la actividad residual mostrada por los diferentes tratamientos de encapsulamiento (Tabla 16), se observó que las mezclas de polímeros mostraron mayores actividades residuales que los encapsulados individuales.

La mezcla Alg/chitosán presentó una actividad residual 5.04×10^{-5} la cual es 1.4 veces la actividad residual de la mezcla Alg/PVA. Esto es debido a la baja transferencia de masa que presenta el PVA [134].

Tabla 16. Eficiencia de encapsulamiento y actividad residual

Sistema	Eficiencia de encapsulación (%)	Actividad residual (mmol p-NF/min)	Actividad residual (%)
Lipasa libre	-	7.88×10^{-5}	100.00
Alginato	87.0	3.48×10^{-5}	44.16
Chitosán	60.7	1.87×10^{-5}	23.73
Alg/Chitosán	79.8	5.04×10^{-5}	63.96
Alg/PVA	81.3	3.67×10^{-5}	46.57

8.4.3 Efecto del pH en la velocidad inicial de hidrólisis de p-NFB

El efecto del pH en la velocidad inicial de hidrólisis de *p*-NFB para la lipasa libre y los diferentes inmovilizados fue determinado realizando la hidrólisis del sustrato con soluciones buffer de diferentes pH (4-10) por 10 min a 40°C y midiendo las mmoles de *p*-NF liberado con respecto el tiempo. Los resultados se presentan en la Figura 37.

Tanto la lipasa libre como los inmovilizados presentaron un pH óptimo de 8.0. A pH 10 la lipasa libre retuvo solo el 34% de su actividad original, mientras que la lipasa encapsulada en los polímeros mostró una mayor retención de su actividad original fluctuando de 45%-48%.

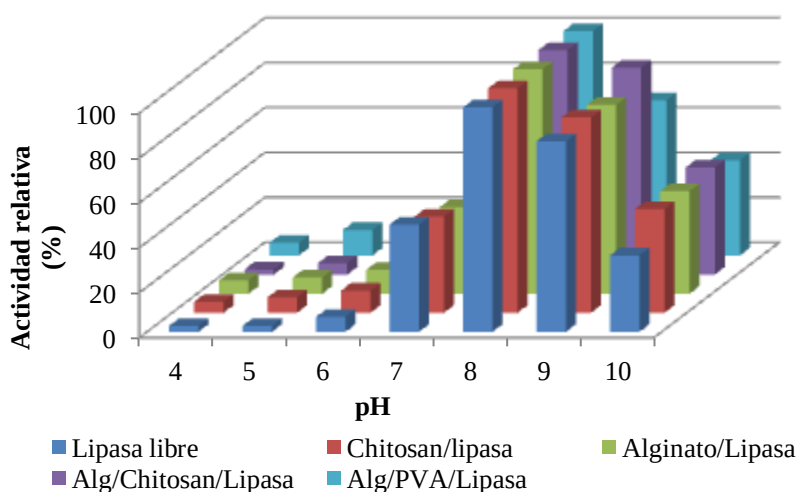


Figura 37. Efecto de pH en la velocidad inicial de la hidrólisis de *p*-NFB por lipasa libre, y lipasa inmovilizada en Alginato, Chitosán, Alg/Chitosán y Alg/PVA.

8.4.4 Efecto de la temperatura en la velocidad inicial de hidrólisis de p-NFB

El efecto de la temperatura en la velocidad inicial de hidrólisis de *p*-NFB por la enzima libre e inmovilizada se realizó a las condiciones óptimas de pH, utilizando buffer Tris-HCl 0.1 M pH 8.0 por 10 min a las temperaturas indicadas, (Figura 38).

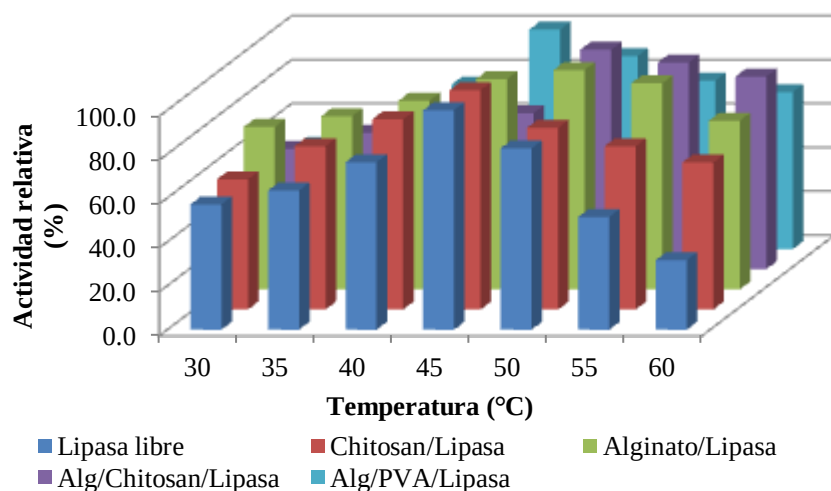


Figura 38. Efecto de la temperatura en la velocidad de hidrólisis de p-NFB de la lipasa libre e inmovilizada en los diferentes polímeros en solución de buffer Tris-HCl 0.1M pH 8.0 por 10 min a las temperaturas indicadas. La prueba se realizó con 20 mg/mL de lipasa libre o lipasa inmovilizada en las esferas y 0.05M de p-NFB.

La máxima actividad de la enzima libre se observó a los 45°C al igual que en la lipasa inmovilizada en chitosán y Alg/PVA. A la temperatura de 60°C se observó deformación de las esferas Alg/PVA y disolución de las esferas en el buffer. Temperatura óptima de 50 °C se presentó en la lipasa inmovilizada en alginato y en la mezcla alginato/chitosán.

8.4.5 Estabilidad de la lipasa

Estabilidad al pH

La estabilidad al pH de la lipasa inmovilizada se determinó incubando las esferas en soluciones buffer de diferentes pH (5, 6 y 7); buffers de acetato y tris-HCl 50 mM) por 1 h a 25°C, separando y determinando la velocidad inicial de hidrólisis a las condiciones óptimas de pH y temperatura. La determinación de la velocidad inicial de hidrólisis a pH más altos no se realizó debido a las dificultades en la mediciones causadas por la hidrólisis espontánea del p-NFB. Los resultados se muestran en la Figura 39. La mayoría de las lipasas reportadas en la literatura tienen pH óptimos a valores de pH neutro o ligeramente básico [135].

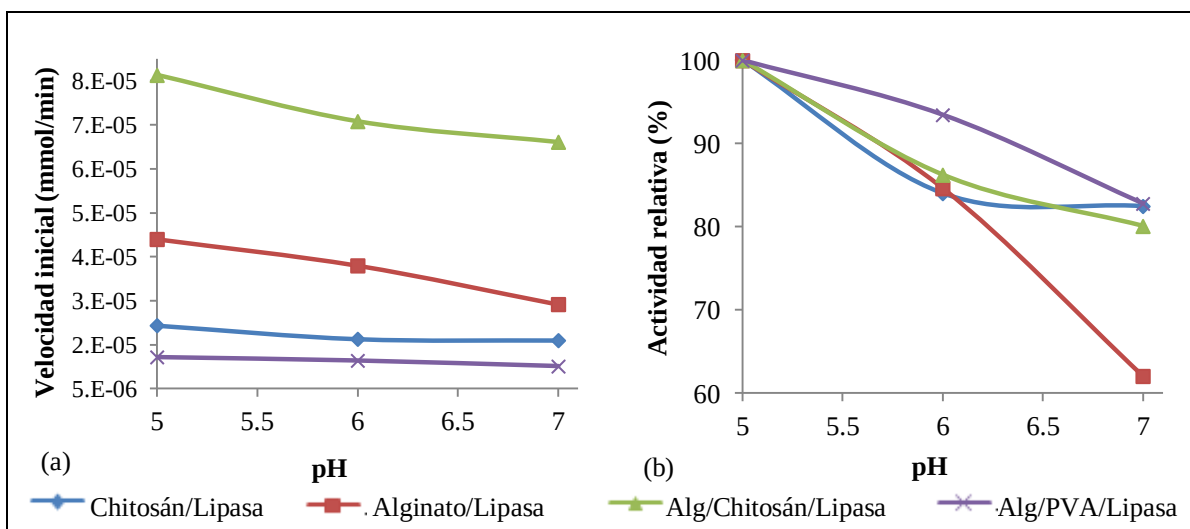


Figura 39. Estabilidad al pH de lipasa inmovilizada en Chitosán, Alginato y mezclas de Alg/Chitosán y Alg/PVA. (a) En términos de Velocidad inicial de hidrólisis de p-NFB, (b) En términos de Actividad relativa. La determinación se realizó en buffer tris-HCl 0.1M pH 8.0, como sustrato p-NFB 0.05M. a 40°C y 120 rpm.

De los resultados mostrados en la Figura 39, se observa que la lipasa inmovilizada es de forma general estable a pH 5 y menos estable a los pH 6 y 7. Habiendo retenido su actividad en un rango de 65-85%, cuando se mantuvo a un pH 7.0. Sin embargo, se observó que las esferas de Alg/PVA se tornaron transparentes después del tratamiento, probablemente se debió a la solubilidad del PVA en los buffers utilizados, mostrando velocidades iniciales de hidrólisis muy bajas comparadas con las mostradas por el resto de los inmovilizados. La lipasa inmovilizada en Alg/chitosán presentó mejor comportamiento en su estabilidad al pH tanto en las velocidades iniciales de hidrólisis como en el porcentaje de retención de actividad. El complejo co-acervado formado por estos dos polímeros infieren a la esfera una mayor retención de la actividad de la lipasa, cuando los poros en la estructura del alginato son cubiertos por el chitosán.

Estabilidad a la temperatura

Para determinar la estabilidad térmica de la lipasa inmovilizada, se midió la velocidad inicial de hidrólisis del p-NFB en buffer Tris-HCl 0.1M pH 8.0 a 60°C por 120 min a diferentes períodos. La estabilidad térmica de la lipasa encapsulada en matrices de hidrogel fue mucho mejor que la de la enzima libre (Figura 40).

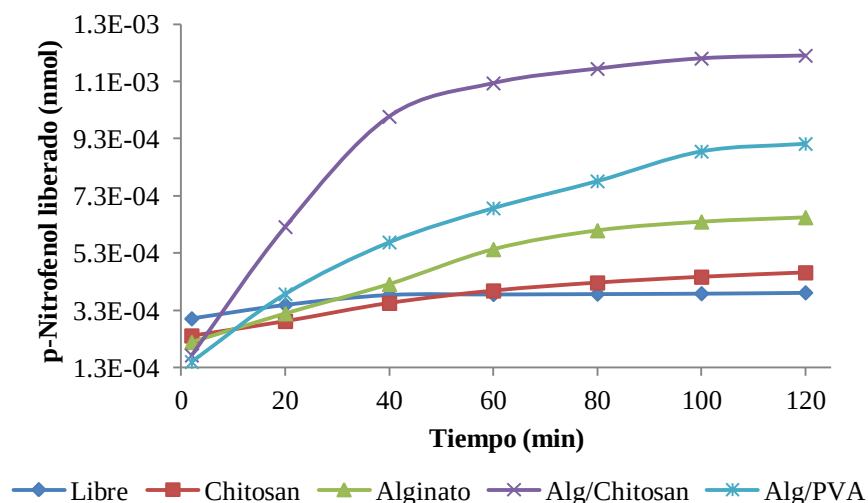


Figura 40. Estabilidad térmica de lipasa inmovilizada en polímeros de Chitosán, Alginato, y mezclas Alginato/Chitosán y Alginato/PVA. Tanto la enzima libre como la inmovilizada fueron incubadas 120 min a 60°C y se midió la velocidad inicial de hidrólisis del p-NFB por el método descrito.

La forma inmovilizada de la enzima fue más estable comparada con la forma libre. A 60°C la actividad relativa de la lipasa libre a las 2 h de reacción fue el 85, 57, 32, y 43 % de la velocidad de hidrólisis presentada por la lipasa inmovilizada en chitosán, alginato, mezcla alginato/chitosán y alginato/PVA respectivamente. Una posible explicación para la estabilidad térmica presentada por la lipasa inmovilizada a elevadas temperaturas es la fijación de la lipasa vía enlaces covalentes, los cuales le dan rigidez a la estructura tridimensional de la enzima y prevenir la distorsión de la estructura por el efecto térmico. Sin embargo, una enzima menos flexible puede ser catalíticamente menos eficiente, dando como resultado una disminución en la actividad enzimática. En la Figura 40 se observa al inicio de la reacción, una mayor velocidad de hidrólisis en la lipasa libre, comparada con las velocidades que presentan los inmovilizados. Un efecto similar fue reportado para la lipasa de *Pseudomonas cepacia* [136].

Estabilidad al almacenamiento

La estabilidad al almacenamiento de las esferas de la lipasa inmovilizada es un parámetro importante, debido a que la enzima libre en solución no es estable durante el almacenamiento y la actividad se reduce gradualmente.

Para determinar el impacto por almacenamiento en la actividad de la lipasa, las esferas se almacenaron por 30 días después de ser lavadas con agua bidestilada durante su

preparación en estado húmedo a 4°C. Cada 10 días se tomaba una muestra fresca de esferas para ser caracterizada de acuerdo al procedimiento previamente descrito. La Figura 41 muestra que bajo las mismas condiciones de almacenamiento, la actividad de la lipasa inmovilizada decrece más lentamente que la actividad de la lipasa libre. La lipasa libre pierde el 60% de su actividad a los 10 días de almacenamiento y perdió casi toda su actividad a las 4 semanas. La lipasa inmovilizada preservó más del 80% de su actividad dentro de los primeros 10 días de almacenamiento.

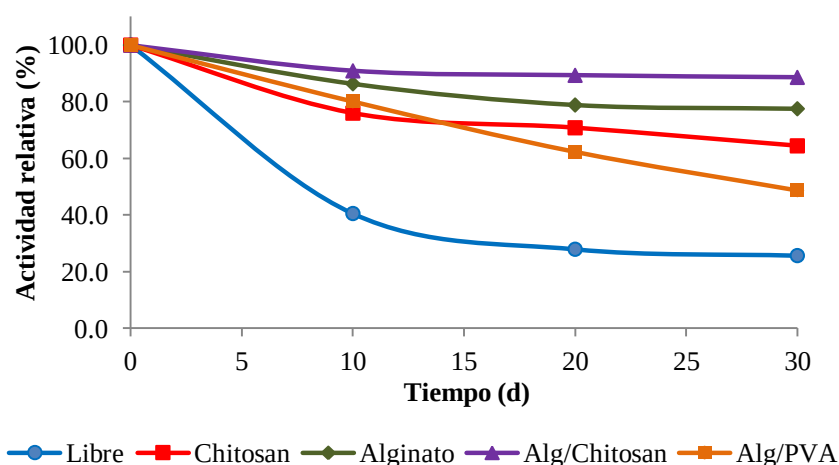


Figura 41. Estabilidad al almacenamiento: Lipasa libre e inmovilizada en esferas de chitosán, alginato, mezclas alginato/chitosán y alginato/PVA en estado húmedo a 4°C.

Es notable la preservación de la actividad de la lipasa inmovilizada en la mezcla Alg/chitosán después de 30 días de almacenamiento presentando una actividad relativa del 89%. La alta estabilidad de la lipasa inmóvil puede atribuirse al ambiente protector que la mezcla coacervada del alginato y el chitosán proveen para la estructura terciaria de la lipasa. Sin embargo la mezcla alginato/PVA presentó una rápida disminución de la actividad de la lipasa, lo cual se puede deber a la pérdida de PVA por disolución.

8.5 CONCLUSIONES

La lipasa puede ser inmovilizada por encapsulamiento en chitosán, alginato y en la mezcla de alginato/chitosán. La lipasa inmovilizada en la mezcla alginato/alcohol polivinílico mostró ser susceptible a dilatarse y desintegrarse en el medio de prueba. La eficiencia de encapsulamiento en alginato y chitosán fueron 87 y 61% mostrando una mayor actividad residual en la lipasa inmovilizada en alginato. Los resultados mostraron que la actividad

residual de lipasa en las esferas de alginato recubiertas de quitosán fue mayor que la mostrada por sus polímeros individuales con una eficiencia de encapsulamiento de 79.85%, valor que se encuentra en el rango de las eficiencias de sus componentes. Estas esferas mostraron una mayor estabilidad térmica cuando se expusieron a 60°C lo cual puede ser una ventaja en el proceso debido a la menor energía requerida en la agitación al disminuir la viscosidad del medio. También mostraron la mayor actividad relativa al almacenamiento reteniendo el 89% de su actividad a los 30 días de almacenamiento en estado húmedo a 4°C. Estudios complementarios sobre la reutilización de la lipasa inmovilizada en esferas de alginato recubiertas de quitosán pueden ser de un valor potencial para la producción de ésteres en reacciones de transesterificación.

CAPÍTULO 9

REACCIONES DE HIDRÓLISIS Y METANÓLISIS DE ACEITE DE OLIVO POR CATÁLISIS ENZIMÁTICA

9.1 RESUMEN

El biodiesel es considerado un combustible biodegradable y no contaminante. La reacción de transesterificación enzimática para la producción de biodiesel a partir de aceites vegetales con alcoholes es una alternativa atractiva. Sin embargo, el costo de las enzimas representa una barrera para su implementación industrial. El objetivo de este estudio fue hacer un acercamiento exploratorio de la potencial producción de ácidos grasos libres y metil ésteres del aceite de olivo utilizando como catalizador lipasa producida a partir de hongos filamentosos. El estudio se realizó utilizando lipasa de consorcio de *Aspergillus flavus*, *Penicillium chrysogenum* y *Trichoderma harzianum*. La hidrólisis del aceite de olivo se realizó a la temperatura de 35-40°C con una relación aceite-agua 1:1 v/v. Se utilizó lipasa de actividad 2.9 U/mg con una concentración de lipasa de 20 mg/g de aceite. Se obtuvo 1.4% de ácidos grasos libres en 3 horas de reacción a pH 8.0. La reacción de transesterificación se realizó con un mínimo contenido de agua en medio de isooctano a temperatura de 35-40°C a pH de 8.0, obteniendo un producto con el 8.0% de metil ésteres después de 96 horas de reacción.

9.2 INTRODUCCIÓN

La transesterificación de los aceites vegetales ha recibido considerable atención hace solo unos cuantos años, debido a la obtención de ácidos grasos y alquil ésteres, los cuales son compuestos intermedios valiosos en la química de los aceites y los metil y etil ésteres como sustitutos del diesel de petróleo [58].

El proceso de metanólisis química catalizada por álcalis da altos grados de conversión de los triglicéridos a sus correspondientes metil ésteres en cortos tiempos de reacción, con varios inconvenientes: presenta una alta demanda de energía, la recuperación del glicerol es difícil, el catalizador alcalino tiene que removerse del producto y la presencia de ácidos grasos libres y agua interfieren con la reacción. La metanólisis enzimática no presenta los inconvenientes mencionados, en particular se debe de mencionar que el glicerol producido

puede ser fácilmente recuperado y que los ácidos grasos libres contenidos en los aceites y grasas residuales pueden ser convertidos completamente a metil ésteres [13].

Reacciones de metanólisis efectivas han sido desarrolladas utilizando diferentes lipasas a partir de especies de *Candida*, *Pseudomonas* y *Rhizopus* por varios investigadores. Las enzimas realizan reacciones de transesterificación muy específicas (bio-transformaciones) [137], por lo cual son de gran interés en la industria, en donde procesos menos específicos producen subproductos no-deseables.

La desventaja asociada con la transesterificación enzimática es el costo de la preparación de la enzima. La inmovilización generalmente incrementa el reuso de las enzimas [137] y por lo tanto disminuye el costo, también ayuda al biocatalizador a ser más eficiente en medios reactivos no acuosos [92].

El presente estudio reporta el uso de lipasa extracelular extraída de hongos filamentosos en reacciones de hidrólisis y transesterificación de aceite de olivo para la producción de ácidos grasos y metil ésteres.

9.3 MATERIALES Y MÉTODOS

9.3.1 Materiales

El aceite de olivo extra virgen utilizado fue comprado comercialmente del mercado local y se almacenó a 4°C para evitar rancidez y fue utilizado durante la experimentación. Lipasa de cerdo, actividad 24 U/mg marca USB, Lipasa liofilizada extraída de hongos filamentosos (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum* y *Trichoderma harzianum*), actividad 0.904 U/g bajo condiciones estándar de análisis. El resto de los reactivos utilizados fueron grado analítico.

9.3.2 Análisis de FAMES por cromatografía de gases

Los metil ésteres se analizaron en un Cromatógrafo de Gases Hewlett Packard Series 6890 equipado con un detector de ionización de flama (FID). Se utilizó una columna (0.25 mm de diámetro interno, 60 m de longitud y 0.25 µm de espesor de película) marca J. & W. Scientific DB-23 utilizando gas helio como gas de arrastre. La temperatura de la columna se estableció de 170-220°C, para un tiempo total de análisis de 14 min. Las temperaturas

del inyector y del detector fueron de 250 y 275°C respectivamente. Todos los análisis fueron realizados por duplicado. Los solventes y reactivos utilizados en la preparación de las muestras fueron grado HPLC.

9.3.3 Hidrólisis de aceite de olivo

La reacción hidrolítica se realiza en la interfase aceite-agua, por lo tanto, la mezcla reactiva consistió de aceite de olivo y buffer Tris-HCl 0.1M pH 8.0 en relación volumétrica 1:1, isooctano como co-solvente y 1% Tritón X100 como emulsificante [138]. Se utilizaron 20 mg de lipasa por gramo de aceite. La mezcla se incubó a 40°C y se agitó a 200 rpm, dejando la reacción proceder por 48 h. Se centrifugó la mezcla y se analizó la fase aceitosa para determinación de ácidos grasos libres. Se compararon los resultados con la hidrólisis de aceite de olivo utilizando lipasa de cerdo. Los ácidos grasos liberados fueron titulados con NaOH 5 mM usando fenolftaleína como indicador [139].

9.3.4 Metanólisis de aceite de olivo

Las reacciones de metanólisis se condujeron en relación estequiométrica de aceite/metanol; el aceite y el metanol se agregaron a un matraz de reacción y se calentó a la temperatura de reacción (40°C) con agitación magnética constante (200 rpm). Se agregó la lipasa pretratada en buffer de Tris-HCl 0.1M pH 8.0 para llevar la concentración de agua a valores específicos. Se utilizó un volumen constante de isooctano como co-solvente por diferentes tiempos de reacción. El matraz de reacción se conectó a una columna de reflujo para condensar el alcohol que pudiera evaporar.

El efecto de la carga enzimática, relación molar metanol:aceite, concentración de agua, concentración de buffer y tiempo de reacción en el proceso de transesterificación se estudió variando cada vez una variable en el rango escogido (Tabla 16) y el resto de las condiciones se mantuvieron fijas según el caso: relación molar metanol a aceite 5:1, carga enzimática 3% p/p con base a peso de aceite de olivo extra virgen, relación volumétrica isooctano a aceite 1:1, concentración de agua 5% v/v en base a aceite, concentración de buffer 4% p/p en base a aceite, temperatura 40°C, agitación 200 rpm y tiempo de reacción 48 h.

Tabla 17. Intervalo de estudio de las variables

Variable	Rango
Concentración de enzima (% p/p)	1-5
Relación molar Metanol:aceite	3:1-9:1
Concentración de agua (% v/v)	0-15
Concentración buffer (% p/p)	4-8
Tiempo de reacción (h)	24-96

Al término, la mezcla reactiva se centrifugó a 4,000 rpm por 40 min y se recuperó la fase aceitosa. Se llevó a una estufa a 60°C por 20 min para evaporar todo el solvente. Se analizaron los ésteres de metilo por cromatografía de gases.

9.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.4.1 Hidrólisis de aceite de olivo

El grado de hidrólisis obtenido en el aceite de olivo por la reacción catalizada por la lipasa obtenida a partir de los hongos filamentosos se comparó con la hidrólisis catalizada con lipasa de páncreas de cerdo. Byun *et al.* [140] reportaron el alto grado de hidrólisis en emulsión por la acción de lipasa de páncreas de cerdo. Rathod *et al.* [138] reportaron 32% de grado de hidrólisis del aceite de ricino catalizada con lipasa de una cepa genéticamente modificada de *Aspergillus oryzae*. La Figura 42 muestra el grado de hidrólisis del aceite de olivo catalizada por lipasas de consorcio de hongos filamentosos, obteniendo como máximo el 3% de rendimiento. Si se compara con el grado de hidrólisis catalizada con lipasa de cerdo bajo las mismas condiciones, observamos hasta un 41% de hidrólisis.

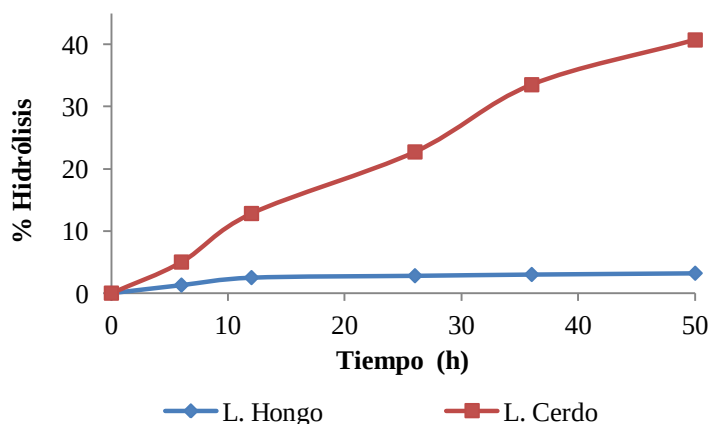


Figura 42. Avance de reacción de hidrólisis de aceite de olivo en medio acuoso a temperatura de 40°C y 200 rpm de agitación.

9.4.2 Metanólisis de aceite de olivo

Efecto de concentración de lipasa

La Figura 43 muestra el efecto de la concentración de la enzima en el porcentaje de metil ésteres obtenidos. Para la lipasa de consorcio de hongos que encontró que un incremento de la enzima mayor del 1% disminuye la formación de los metil ésteres. Es muy probable que a más altas concentraciones de lipasa, la solución interfase enzima-aceite formada bajo condiciones experimentales se sature de enzima y por el contrario se formen aglomerados de enzima que restringen el área de contacto entre sustrato-enzima [141].

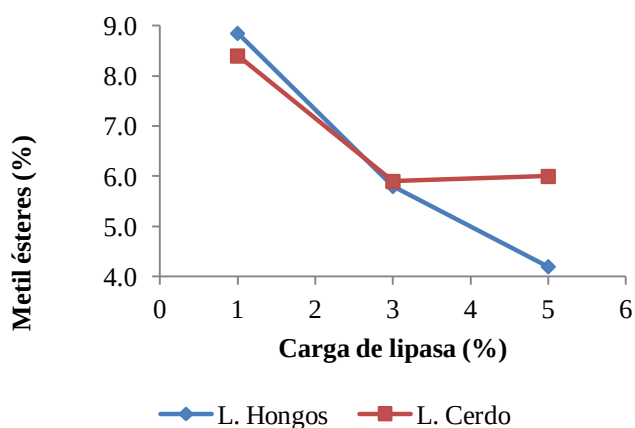


Figura 43. Efecto de la carga de lipasa en el rendimiento de formación de FAME. Carga: 1-3 % p/p en base a aceite de olivo utilizado. Se compara el rendimiento con lipasa de páncreas de cerdo.

Efecto de la relación aceite/metanol

Un factor importante que afecta el rendimiento de la formación de los metil ésteres es la relación molar de aceite-metanol. Debido al avance de la reacción de transesterificación hacia productos, es necesario, ya sea el uso de exceso de alcohol o la remoción de alguno de los productos de la mezcla reactiva. El efecto de la relación molar aceite-alcohol en la producción de FAME a partir de aceite de olivo usando lipasa libre de consorcio de hongos filamentosos se analizó realizando experimentaciones con diferentes relaciones; 1:3, 1:5, 1:7 y 1:9 (aceite de olivo a metanol). A partir de la Figura 44 se observa que con el incremento de la relación molar se incrementa el rendimiento de los metil ésteres hasta un 13% con la relación molar 1:9. Paralelamente, se realizó la metanólisis del aceite de olivo con lipasa de páncreas de cerdo a las mismas condiciones de reacción para comparar resultados.

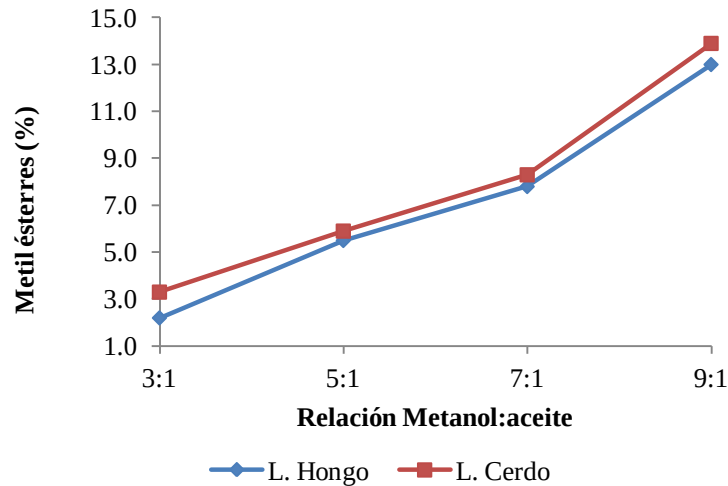


Figura 44. Efecto de la relación molar aceite/alcohol en el rendimiento de metil ésteres durante la metanólisis del aceite de olivo usando lipasa libre de consorcio de hongos y lipasa de páncreas de cerdo.

Efecto del tiempo de reacción

El efecto de tiempo en la producción de metil ésteres por la reacción de metanólisis del aceite de olivo usando lipasa libre de consorcio de hongos filamentosos se estudió conduciendo experimentos con diferentes períodos de reacción; 24, 48, 72 y 96 h. Los experimentos se realizaron a la temperatura óptima de 40°C y pH de 8.0, usando isooctano como co-solvente. La Figura 45 muestra que con el incremento del tiempo de reacción se incrementa el porcentaje del rendimiento de FAME hasta un 8% en 96 h. Este resultado se comparó con la metanólisis del aceite de olivo catalizada con lipasa de cerdo.

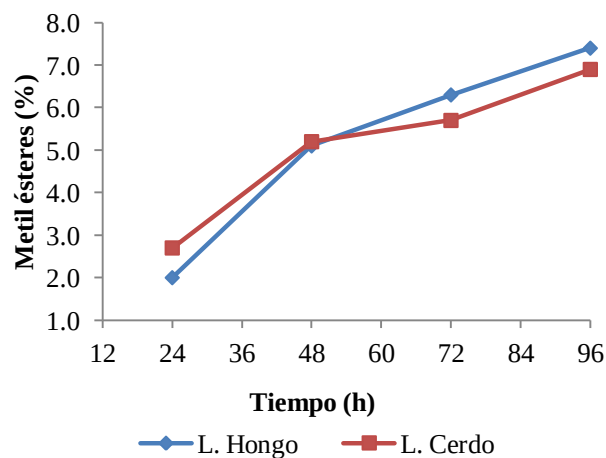


Figura 45. Efecto de tiempo de reacción en el rendimiento de metil ésteres durante la metanólisis del aceite de olivo catalizada por lipasa de consorcio de hongos y lipasa de páncreas.

Efecto del contenido de agua

El efecto del contenido de agua en el rendimiento de los metil ésteres en la reacción de metanólisis del aceite de olivo usando lipasa de consorcio de hongos fue estudiado mediante experimentación para diferentes porcentajes de agua en base a aceite (0, 5, 10 y 15 %). Aunque el agua no está relacionada como reactivo o producto en la reacción de transesterificación, su contenido es importante debido a que favorece a la expresión de la actividad enzimática. El agua actúa como lubricante de las cadenas polipéptidas en las proteínas, por lo tanto le confiere a la enzima la movilidad suficiente para desarrollar su acción catalítica [142]. Debido a que el sistema de reacción está compuesto de diferentes fases; los sustratos (triglicéridos y metanol), las enzimas y el soporte, el agua se reparte en diferente proporción entre los componentes. Para estudiar el efecto del contenido del agua en la actividad enzimática, específicas cantidades de agua se agregaron al sistema y se analizó la cantidad de metil ésteres producidos. La Figura 47 muestra que la lipasa a partir de consorcio de hongos es inactiva cuando el medio de reacción se mantiene anhidro, pero se incrementa cuando se agrega un 5% de agua y se sostiene activa hasta un 10% de agua en base al aceite. Un contenido de agua mayor del 10% mostró un descenso en el rendimiento de los metil ésteres producidos hasta un rendimiento nulo al 15% de contenido de agua. Por otro lado, la lipasa de páncreas de cerdo mostró siempre incremento del rendimiento de los metil ésteres a medida que se incrementó el contenido de agua.

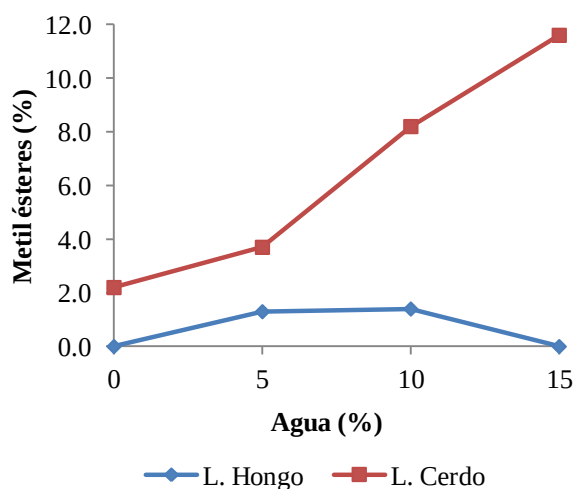


Figura 46. Efecto del contenido de agua en la reacción de transesterificación para la formación de metil ésteres a partir de aceite de olivo catalizada por lipasa de consorcio de hongos filamentosos y comparado con el efecto del contenido de agua para la reacción catalizada por lipasa de páncreas de cerdo.

9.5 CONCLUSIONES

El máximo grado de hidrólisis del aceite de olivo catalizada con lipasa de hongos filamentosos obtenido fue de 3%. Este valor es muy bajo si se compara con el grado de hidrólisis obtenido a partir de la lipasa de páncreas de cerdo. Es necesario considerar como factor importante de la reacción de hidrólisis la adición de co-factores que incrementen la actividad lipolítica de la enzima en estudio.

La reacción de metanólisis se realizó utilizando aceite de olivo extra-virgen y un alcohol de cadena corta (metanol en isooctano). Se usó como biocatalizador lipasa de consorcio de hongos filamentosos (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum* y *Trichoderma harzianum*). Los resultados se compararon con los obtenidos de la reacción catalizada por lipasa de páncreas de cerdo comercial. Se estudiaron los factores que se cree afectan el rendimiento de la producción de los metil ésteres, entre estos concentración de enzima utilizada, relación molar aceite-metanol, tiempo de reacción y contenido de agua. El máximo rendimiento obtenido de metil ésteres por catálisis con lipasa libre de consorcio de hongos fue 13%. Se obtuvieron los valores óptimos de reacción: 1% de carga enzimática, relación molar aceite-metanol de 1:9, tiempo de reacción de 96 h y un contenido de agua de 5-10 % en base a aceite de olivo cuando la temperatura de reacción fue 40°C a un pH de 8.0 y agitación de 200 rpm. Se recomienda hacer un estudio profundo en los factores que afectan el grado metanólisis.

CONCLUSIONES GENERALES

- De la evaluación cualitativa de la actividad lipolítica en las especies de hongos filamentosos de este estudio, se seleccionaron cuatro especies con actividad destacada: *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium chrysogenum* y *Trichoderma harzianum*.
- El uso del ensayo del *p*-NFB fue adecuado para realizar la evaluación cuantitativa de la actividad de lipasa una vez estandarizado el ensayo. La mayor actividad obtenida por dicho ensayo se obtuvo a condiciones estándar y fue de 12.5 U/mL de extracto a partir de *Aspergillus flavus* por fermentación en estado sólido.
- Se determinaron los rangos óptimos de actividad de la enzima soluble debido a que la estabilidad de la lipasa a partir de hongos filamentosos provee información clave para las condiciones de reacciones de hidrólisis y transesterificación de la lipasa. El pH óptimo presentado por la enzima fue en el rango de 8.0-9.0. La temperatura óptima de la actividad de la lipasa se observó en el rango de los 40-45°C.
- Lipasa inmovilizada en la mezcla de los polímeros Chitosán/Alginato por recubrimiento de las esferas de alginato con chitosán, presentó características óptimas de actividad y estabilidad. Los rangos de estabilidad de la lipasa provee información clave para la selección de las condiciones de los procesos de inmovilización y almacenamiento. La estabilidad al pH de la lipasa inmóvil se presentó a un pH de 5 en buffer de acetato cuando se incubó por 1 h a temperatura ambiente. A la temperatura de 60°C la lipasa soluble en buffer Tris-HCl 0.1M pH 8.0 mantuvo una actividad relativa del 32% de la actividad presentada por la lipasa inmovilizada en Alg/Chitosán. Esto se observa como una ventaja debido a la desnaturalización que sufre la enzima soluble a altas temperaturas. La lipasa inmovilizada preservó el 89% de su actividad a los 30 días de almacenamiento en estado húmedo a 4°C.
- Un bajo grado de hidrólisis (3%) se presentó por acción de la enzima libre usando como sustrato aceite de olivo extra-virgen a las condiciones de reacción establecidas. Estudios posteriores se requieren para optimizar los valores de grado de hidrólisis obtenidos en este estudio. Factores como la presencia de co-factores,

aditivos y concentraciones óptimas de contenido de humedad pueden ser variables clave.

- El máximo rendimiento obtenido de metil ésteres por catálisis con lipasa libre de consorcio de hongos fue 13%. Se obtuvieron los valores óptimos de reacción: 1% de carga enzimática, relación molar aceite-metanol de 1:9, tiempo de reacción de 96 h y un contenido de agua de 5-10 % en base a aceite de olivo cuando la temperatura de reacción fue 40°C a un pH de 8.0 y agitación de 200 rpm. Se recomienda hacer un estudio profundo en los factores que afectan el grado metanólisis y optimizar el grado de conversión del aceite a metil ésteres.

REFERENCIAS

1. Food and Agriculture Organization of the United Nations, OECD-FAO *Agricultural Outlook*, 2012, New York, NY, USA.
2. U.S. Energy Information Administration, EIA, *Annual Energy Review*, 2011, U.S. Department of Energy, Washington, DC, USA.
3. Sims, B. (2007) *Biodiesel: A global Perspective*. Biodiesel Magazine.
4. Knothe, G., Gerpen, J.V., Krahl, J., *The Biodiesel Handbook*. AOCS Press. 2005, Champaign, Ill, USA.
5. Pandey, A., *Handbook of Plant-Based Biofuels*. 2009, CRC Press: Boca Raton, Fla, USA.
6. Ma, F., Hanna, M.A., *Biodiesel production: a review*. Bioresource Technology, 1999. **70**: p. 1-15.
7. Meher, L.C., Sagar D. V., Naik, S. N., *Technical aspects of biodiesel production by transesterification: A review*. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2006. **10**(3): p. 248-268.
8. Kaieda, M., Samukawa, T., Matsumoto, T., Ban, K., Kondo, A., et al., *Biodiesel fuel production from plant oil catalyzed by Rhizopus oryzae lipase in a water-containing system without an organic solvent*. J. Biosci. Bioeng., 1999. **88**(6): p. 627-631.
9. Suehara, K., Kawamoto, Y., Fujii, E., Kohda, J., Nakano, Y., Yano, T., *Biological treatment of wastewater discharged from biodiesel fuel production plant with alkali-catalyzed transesterification*. J. Biosci. Bioeng., 2005. **100**(4): p. 437-442.
10. Lai, C., Zullaikah, S., Vali, S.R., Ju, Y.H., *Lipase-catalyzed production of biodiesel from rice bran oil*. J. Chem. Technol. Biotechnol, 2005. **80**(3): p. 331-337.
11. Kumari, A., Mahapatra, P., Garlapati, V.K., Banerjee, R., *Enzymatic transesterification of Jatropha oil*. Biotechnology for Biofuels, 2009. **2**(1): p. 1-7.
12. Naik, S.N., Vaibhav, V.G., Prasant, K.R., Ajay, K.D., *Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review*. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2010. **14**: p. 578-597.

13. Fjerbaek, L., Christensen, K., Norddahl, B., *A review of the current state of biodiesel production using enzymatic transesterification*. Biotechnol. Bioeng., 2009. **102**(5): p. 1298-1315.
14. Salas, J.J., Sánchez, J., Ramli, U. S., Manaf, A. M., Williams, M., Harwood, J. L. , *Biochemistry of lipid metabolism in olive and other oil fruits*. Progress in Lipid Research, 2000. **39**(2): p. 151-180.
15. Gunstone, F.D., *Vegetable Oils in Food Technology: Composition, Properties and Uses*. 2002, Oxford, UK: Blackwell Publishing.
16. Food and Agriculture Organization of the United Nations, *OECD-FAO Agricultural Outlook*, 2010, New York, NY, USA.
17. Balat, M., *Potential alternatives to edible oils for biodiesel production - A review of current work*. Energy Conversion and Management, 2011. **52**(2): p. 1479-1492.
18. Montero, G., Stoytcheva, M., García, C., Coronado, M., Toscano, L., Campbell, H., Pérez, A., Vázquez, A., *Current status of biodiesel production in Baja California, México*, in *Biodiesel - Quality, Emissions and By-Products*, G. Montero and M. Stoytcheva, Editors. 2011, Croasia. p. 137-152.
19. Gunstone, F.D., Harwood, J.L., Dijkstra, A. J. , *The Lipid Handbook*. CRC Press. 2007, Boca Raton, Fla, USA.
20. Li, Q., Du, W., Liu, D., *Perspectives of microbial oils for biodiesel production*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2008. **80**(5): p. 749-756.
21. Pratoomyot, J., Srivilas, P., Noiraksar, T., *Fatty acids composition of 10 microalgal species*. Songklanakarin J. Sci, Technol., 2005. **27**(6): p. 1179-1187.
22. Gunstone, F.D., F.B. Padley, eds. *Lipid Technologies and Applications*. 1997, Marcel Dekker: New York, NY, USA.
23. Zuo, Y.B., Zeng, A.W., Yuan, X. G., Yu, K. T., *Extraction of soybean isoflavones from soybean meal with aqueous methanol modified supercritical carbon dioxide*. J. of Food Engineering, 2008. **89**(4): p. 384-389.
24. Ceci, L.N., Constenla, D.T., Crapiste, G. H., *Oil recovery and lecithin production using water degumming sludge of crude soybean oils*. J. of the Science of Food and Agriculture, 2008. **88**(14): p. 2460-2466.
25. Bornscheuer, U.T., *Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis*. FEMS Microbiology Reviews, 2002. **26**(1): p. 73-81.

26. Jaeger, K.E., Dijkstra, B.W., Reetz, M.T. , *Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases*. Annual Review of Microbiology, 1999. **53**: p. 315-351.
27. Sharma, R., Chisti, Y., Banerjee, E. C. , *Production, purification, characterization, and applications of lipases*. Biotechnology Advances, 2001. **19**(8): p. 627-662.
28. Villeneuve, P., *Plant lipases and their applications in oils and fats modification*. European Journal of Lipid Science and Technology, 2003. **105**(6): p. 308-317.
29. Castilho, L.R., Polato, C.M., Baruque, E. A., Sant'Anna G. L. Jr., *Economic analysis of lipase production by Penicillium restrictum in solid-state and submerged fermentations*. Biochemical Engineering Journal, 2000. **4**(3): p. 239-247.
30. Gutarra, M.L., Cvalcanti, E.D., Freire, D. M., Castilho, L. R., Sant'Anna, G. L., *Lipase production by solid-state fermentation: cultivation conditions and operation of tray and packed-bed bioreactors*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2005. **121**(1-3): p. 105-116.
31. Damaso, M.C., Passianoto, M.A., Freitas, S. C., Freire, D. M., Lago, R. C., Couri, S., *Utilization of agroindustrial residues for lipase production by solid-state fermentation*. Brazilian J. of Microbiology, 2008. **39**(4): p. 676-681.
32. Wolski, E., Menusi, E., Mazutti, M., *Responce surface methodology for optimization of lipase production by an immobilized newly isolated Penicillium sp.* Industrial and Engineering Chemistry Research, 2008. **47**(23): p. 9651-9657.
33. Garlapati, V.K., Vundavilli, P.R., Banerjee, R., *Evaluation of lipase production by genetic algoritbm and particle swarm optimization and their comparative study*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2010. **162**(5): p. 1350-1361.
34. Singh, M., Saurav, K., Srivastava, N., Kannabiran, K., *Lipase production by Bacillus subtilis OCR-4 in solid state fermentation using ground nut oil cakes as substrates*. Current Research Journal of Biological Sciences, 2010. **2**(4): p. 241-245.
35. Salum, T.F., Villeneuve, P., Barea, B., *Synthesis of biodiesel in column fixed-bed bioreactor using the fermented solid produced by Burkholderia cepacia LTEB11*. Process Biochemistry, 2011. **43**(2): p. 219-224.

36. Sun, S.Y., Xu, Y., *Whole-cell synthetic lipase production from Rhizopus chinensis and identification of the functional enzyme*. Process Biochemistry, 2009. **43**(2): p. 219-224.
37. Bussamara, R., Fuentesfría, A.M., Oliveira, E.S., *Isolation of a lipase-secreting yeast for enzyme production in a pilot-plant scale batch fermentation*. Bioresource Technology, 2010. **101**(1): p. 268-275.
38. Kumar, S., Katiyar, N., Ingle, P., Negi, S., *Use of evolutionary operation (EVOP) factorial design techniques to develop a bioprocess using grease waste as substrate for lipase production*. Bioresource Technology, 2011. **102**(7): p. 4909-4912.
39. Saxena, R.K., Sheoran, A., Giri, B., Davidson, W. S., *Purification strategies for microbial lipases*. Journal of Microbiological Methods, 2003. **52**(1): p. 1-18.
40. Shu, Z.-Y., Yang, J.-K., Yan, Y.-J., *Purification and characterization of a lipase from Aspergillus niger F044*. Chinese Journal of Biotechnology, 2007. **23**(1): p. 96-101.
41. Isobe, K., Nokihara, K., Yamaguchi, S., Mase, T., Schmid, R.D., *Crystallization and characterization of monoacylglycerol lipase from Penicillium camembertii*. European Journal of Biochemistry, 1992. **203**(1-2): p. 233-237.
42. López, N., Pernas, M.A., Pastrana, L. M., Sánchez, A., Valero, F., Rua, M. L., *Reactivity of pure Candida rugosa lipase isoenzymes (Lip1, Lip2 and Lip3) in aqueous and organic media. Influence of the isoenzymatic profile on the lipase performance in organic media*. Biotechnology Progress, 2004. **20**(1): p. 65-73.
43. Pfeffer, J., Richter, S., Nieveler, J. Jansen, C-E., et al., *High yield expression of lipase A from Candida antartica in the methylotrophic yeast Pichia pastoris and its purification and characterisation* Applied Microbiology and Biotechnology, 2006. **72**(5): p. 931-938.
44. Fernandes, M.L.M., Krieger, N., Baron, A.M., Zamora, P.P., Ramos, L.P., Mitchell, D.A., *Hydrolysis and synthesis reactions catalysed by Thermomyces lanuginosa lipase in the AOT/Isooctane reversed micellar system*. J. Mol. Catal. B: Enzym., 2004. **30**(1): p. 43-49.
45. Ogino, H., Nakagawa, S., Shinya, K., et al., *Purification and characterization of organic solvent-stable lipase from organic solvent-tolerant Pseudomonas aeruginosa LST-03*. J. Biosci. Bioeng., 2000. **89**(5): p. 451-457.

46. Lesuisse, E., Schanck, K., Colson, C., *Purification and preliminary characterization of extracellular lipase of Bacillus subtilis 168, an extremely basic pH-tolerant enzyme*. European Journal of Biochemistry, 1993. **216**(1): p. 155-160.
47. Burkert, J.F.M., Maugeri, F., Rodriguez, M.I., *Optimization of extracellular lipase production by Geotrichum sp. using factorial design*. Bioresource Technology, 2004. **91**(1): p. 77-84.
48. Abrimic, M., Lescic, I., Korica, T., Vitale, L., Saenger, W., Pigac, J., *Purification and properties of extracellular lipase from Streptomyces rimosus*. Enzyme and Microbial Technology, 1999. **25**(6): p. 522-529.
49. Destain, J., Roblain, D., Thonart, P., *“Improvement of lipase production from Yarrowia lipolytica*. Biotechnology Letters, 1997. **19**(2): p. 105-107.
50. Uhling, H., ed. *Industrial Enzymes and Their Applications*, J. 1998, Wiley & Sons: New York, NY, USA.
51. Abbas. H., Hiol, A., Deyris, V., Comeau, L., *Isolation and characterization of an extracellular lipase from Mucor sp. strain isolated from palm fruit*. Enzyme and Microbial Technology, 2002. **31**(7): p. 968-975.
52. Eastmond, P.J., *Cloning and characterization of the acid lipase from castor beans*. J. Biol. Chem., 2004. **279**(44): p. 45540-45545.
53. Sadeghi, M., *Purification of soybean oil with phospholipase A1*. Theoretical and Experimental Chemistry, 2010. **46**(2): p. 132-137.
54. De María L., Vind, J., Oxenboll, K.M., Svendsen, A., Patkar, S., *Phospholipases and their industrial applications*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2007. **74**(2): p. 290-300.
55. Clausen, K., *Enzymatic oil-degumming by a novel microbial phospholipase*. European Journal of Lipid Science and Technology, 2001. **103**(6): p. 333-340.
56. Tan, T., Lu, J., Nie, K., Deng, L., Wang, F., *Biodiesel production with immobilized lipase: a review*. Biotechnology Advances, 2010. **28**(5): p. 628-634.
57. Nielsen, P.M., Brask, J., Fjerbaek, L., *Enzymatic biodiesel production: technical and economical considerations*. European Journal of Lipid Science and Technology, 2008. **110**(8): p. 692-700.

58. Du, W., Li, W., Sun, T., Chen, X., Liu, D. , *Perspectives for biotechnological production of biodiesel and impacts*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2008. **79**(3): p. 331-337.
59. Robles-Medina, A., González-Moreno, P., Esteban-Cerdan, L., Molina-Grima, E., *Biocatalysis: towards ever greener biodiesel production*. Biotechnology Advances, 2009. **27**(4): p. 398-408.
60. Soetaert, W., Vandamme, E.J., *Biofuels*. 2009, Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons.
61. Jurj, A., *Study of biodiesel fuel production through enzymatic methods*, in *Faculty of Chemistry and Chemical Engineering*. 2011, Babes-Bolyai University Cluj-Napoca: Cluj-Napoca. p. 140.
62. Devanesan, M.G., Viruthagiri T., Sugumar, N., *Transesterification of Jatropha oil using immobilized Pseudomonas fluorescens* African J. Biotech., 2007. **6**(21): p. 2497-2501.
63. Brusamarello, C.Z., Rosset, E., Césaro, A. et al., *Kinetics of lipase-catalyzed synthesis of soybean fatty acid ethyl esters in pressurized propane*. J. Biotech., 2010. **147**(2): p. 108-115.
64. Drapcho, C.M., Nhuan, N.P., Walker, T.H., *Biofuels Engineering Process Technology*. 2008, New York, NY, USA: McGraw-Hill.
65. Matassoli, A.L.F., Correa, I.N.S., Portilho, M.F., Veloso, C.O., Langone, M.A.P., *Enzymatic synthesis of biodiesel via alcoholysis of palm oil*. Appl. Biochem. Biotech., 2009. **155**(1-3): p. 347-355.
66. SAGARPA. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, SIAP, *Resumen Nacional de la Producción Pecuaria 2008*. Fecha de consulta: 10/2009. http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view
67. Food and Agricultural Organization, *Manual for the slaughter of small ruminants in developing countries*. 1985, cited Animal Production and Health Paper 49; Available from: <http://www.fao.org/>.
68. Meeker David L. *An Overview of the Rendering Industry*. National Renderers Association 2009; Available from: <http://nationalrenderers.org>.

69. INEGI. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática, *Superficie total por distrito de desarrollo rural y municipio* 2005; Available from: http://www.oeidrus-bc.gob.mx/oeidrus_bca/.
70. *Compilation of Air Pollutant Emission Factors*, in AP 42, Fifth Edition, U.S. EPA, Editor. 1995, U.S. EPA.
71. Bhatti, H.N. and et-al., *Acid and Base Catalyzed Transesterification of Animal Fats to Biodiesel*. J. Chem. Chem. Eng., 2008. **27**(4): p. 41-48.
72. Singh Anoop., Smyth Beatrice M., Murphy Jerry D., *A biofuel strategy for Ireland with an emphasis on production of biomethane and minimization of land-take*. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2009.
73. Molina, M., *Greenhouse gas emissions inventory for the state of Baja California 2005*, in Mario Molina Center for Strategic Studies on Energy and the Environment. 2007, Mario Molina Center.
74. Sweedler A., Ganster P., Bennett P., *Energy and Environment in California-Baja California Border Region*. 1995, Institute for Regional Studies of the Californias.
75. Campbell-Ramirez H., et al., *Planificación Energética de las ciudades de Mexicali y Tijuana Baja California*. 2006, Instituto de Ingeniería de la UABC.
76. INEGI-SNIEG, Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática, *Estadística de vehículos de motor registrados en circulación en 2007*. 2009.
77. NRA. *STATISTICS*. National Renderers Association 2009; Available from: <http://nationalrenderers.org/economic/statistics>.
78. Martinelle M., Hult K., *Kinetics of acyl transfer reactions in organic media catalyzed by Candida antarctica lipase B*. Biochimica Biophysica Acta, 1995. **1251**(2): p. 191-197.
79. Rasor J. P., Voss E., *Enzyme-catalyzed processes in pharmaceutical industry*. Appl Catal A: Gen, 2001. **221**(2001): p. 145-158.
80. Castro H F., Mendez A A., Santos J C., *Modificação de óleos e gorduras por biotransformação*. Quimica Nova, 2004. **27**(1): p. 146-156.
81. Casimir C. Akoh, et al., *Enzymatic Approach to Biodiesel Production*. J. Agric. Food Chem., 2008. **55**(22): p. 8995-9005.
82. Mandell, G.L., Bennett, J.E., Dolin, R., *Enfermedades Infecciosas Principios y Practica*. 6 ed, ed. Elsevier-Espana. 2006.

83. Hall, T. *Biological sequence alignment editor [7.2.0]*. Ibis Biosciences 2013; Available from: <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>.
84. *Basic Local Alignment Search Tool*. NCBI/BLAST 2013; Available from: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.
85. Falony, G., Armas, J.C., Mendoza, J.C.D., Hernández, J.L.M., *Production of Extracellular Lipase from Aspergillus niger by Solid-State Fermentation*. Food Technol. Biotechnol., 2006. **44**(2): p. 235-240.
86. Rajesh, E.M., Arthe, R., Rajendran, R., Balakumar, C., Pradeepa, N., Anitha, S., *Investigation of Lipase Production by Trichoderma reesei and Optimization of Production Parameters*. EJEAFChE, 2010. **9**(7): p. 1177-1189.
87. Lima, V.M.G., Krieger, N., Sarquis, M.I.M., Mitchell, D.A., Ramos, L.P., Fontana, J.D., *Effect of Nitrogen and Carbon Sources on Lipase Production by Penicillium aurantiogriseum*. Food Technol. Biotechnol., 2003. **41**(2): p. 105-110.
88. Adhinarayana, K., Raju, B., Zargar, M.I., Bhavani, R., *Optimization of process parameters for production of lipase in solid-state fermentation by newly isolated Aspergillus species*. Indian J Biotechnol., 2004. **3**: p. 65-69.
89. Beisson, F., Tiss, A., Riviere, C., Verger, R., *Methods for lipase detection and assay: a critical review*. Eur. J. of Lipid Sci. Technol., 2000. **102**(2): p. 133-153.
90. Kashmiri, M.A., Adnan, A., Butt, B.W., *Production, purification and partial characterization of lipase from Trichoderma Viride*. Afr. J. Biotechnol., 2006. **5**(10): p. 878-882.
91. Kamini, N.R., Mala, J.G., Puvanakrishnan, R., *Lipase production from Aspergillus niger, by solid-state fermentation using gingelly oil cake*. Process Biochemistry, 1998. **33**(5): p. 505-511.
92. Shafei, M.S., Allam, R.F., *Production and immobilization of partially purified lipase from Penicillium chrysogenum*. Malaysian Journal of Microbiology, 2010. **6**(2): p. 196-202.
93. Alarcon, A.D., *Evaluación de técnicas de conservación para hongos filamentosos y levaduriformes en el cepario de la Pontificia Universidad Javeriana*, in *Microbiología Industrial*. 2006, Pontificia Universidad Javeriana: Bogotá D.C. Colombia. p. 152.

94. Smith, D., Onions, A.H.S., *Preservation and Maintenance of Living Fungi*. 1983, Kew, UK: Common Wealth Mycological Institute.
95. Castellani A., *Further researchers on the long viability and growth of many pathogenic fungi in sterile distilled water*. Mycopathol. et Mycol. Appl., 1963. **XX**(1): p. 1-6.
96. Douds, D., Schenck, N.C., *Germination and hyphal growth of vam fungi during and after storage in soil al five matric potentials*. Soil Biol. Biochem., 1991. **23**(2): p. 177-183.
97. Borman, M., Szekely A., Campbell K., Johnson M., *Evaluation of the viability of pathogenic filamentous fungi afterr prolonged storage in sterile water and review of recent published studies on storage methods*. Mycopathologia, 2006. **161**(6): p. 361-368.
98. Smith, D., *Long-term preservation of test strains (fungus)*. International Biodeterioration & Biodegradation, 1993. **31**(3): p. 227-230.
99. Smith D., Onions, A. H. S., *Preservation and Maintenance of Living Fungi*. 1983, Kew, UK: Common Wealth Mycological Institute.
100. Rodriguez, EG., Lirio, VS., Lacaz, Cda S., *Preservation of fungi and actinomycetes of medical importance in distilled water*. International Biodeterioration & Biodegradation, 1992. **31**(3): p. 227-230.
101. Borman, AM., Szekely, A., Campbell, CK., Johnson, EM., *Evaluation of the viability of pathogenic filamentous fungi afterr prolonged storage in sterile water and review of recent published studies on storage methods*. Mycopathologia, 2006. **161**(6): p. 361-368.
102. Mendoza, M., Alvarado, P., Díaz de Torres, E., Lucena, L., de Albornoz MC., *Physiological comportment and in vivo sensitivity of Sporothrix schenckii isolates maintained for 18 years by two preservation methods*. Rev Iberoam Micol, 2005. **22**(3): p. 151-156.
103. Centro de Investigación Científica de Yucatán, *Colecciones Biológicas de los Centros de Investigación CONACYT*, German Carnevali Fernandez-Concha, et al., Editors. 2004, México.

104. Gallo, M.B.C., Guimaraes, D.O., Momesso, L. da S., Pupo, M. T., *Natural Products from Endophytic Fungi*, in *Microbial Biotechnology*, R. Saikia, Editor. 2008, Sumit Pal Jain: New Delhi. p. 139-164.
105. Espinel-Ingroff, A., Montero, D., Martin-Mazuelos, E., *Long-term preservation of fungal isolates in commercially prepared cryogenic microbanks vials*. J Clin Microbiol., 2004. **42**(3): p. 1257-1259.
106. Bunse, T., Steigleder, G. K., *The preservation of fungal cultures by lyophilization*. Mycoses, 1991. **34**(3): p. 173-176.
107. Guarro, J., Gene, J., Stchigel, A., *Developments in fungal taxonomy*. Clinical Microbiology Reviews, 1999. **12**(3): p. 454-500.
108. Zain, M.E., *Secondary metabolites as taxonomic markers in fungal taxonomy*. African J. Mycol. Biotechnol., 2004. **12**: p. 45-54.
109. Bissett, J., *A revision of the genus Trichoderma. 1. Section Longibrachiatum sect. nov.* Can. J. Bot., 1984. **62**: p. 924-931.
110. Frisvad, J.C., Samson, R.A., *Polyphasic taxonomy of Penicillium subgenus Penicillium . A guide to identification of food and air-borne terverticillate mycotoxins*. Studies in Mycology, 2004. **49**: p. 1-52.
111. Guan, H., Yang, L., Guo, J., Ma, X., Wang, H., You, S., *Morphological and molecular identification of Aspergillus versicolor D-1 with selective reduction ability*. Asian Journal of Traditional Medicines, 2007. **2**(1): p. 39-44.
112. Diba, K., Kordbacheh, P., Mirhendi, S.H., Rezaie, S., Mahmoudi, M., *Identification of Aspergillus species using morphological characteristics*. Pak. J. Med. Sci., 2007. **23**(5): p. 867-872.
113. Leuca, I., Dunca, S., Ailiesei, O., *Stabilization of Penicillium chrysogenum strain with pelletized morphological structure by selection, multiplication, and control of variability of pure cultures*. Analele Stiintifice ale Universitatii Alexandru Ioan Cuza, Sectiunea Genetica si Biologie Moleculara, 2008. **IX**(2): p. 101-105.
114. Loustau-Gómez, J. *Clave determinativa de las especies del género Aspergillus*. <http://digitum.um.es/xmlui/bitstream/10201/6483/1/N%203%20Clave%20determinativa%20de%20las%20especies%20del%20genero%20Aspergillus.pdf>.
115. Arraiza, N., Viguria, P.M., Navarro, J., Ainciburu A. *Manual de Microscopia*. Available from: <http://www.auxilab.es/documentos/folletos/mmicroscopio.pdf>.

116. Nakasone, K.K., Peterson, S.W., Jong, S., *Preservation and distribution of fungal cultures*, in *Biodiversity of fungi. Inventory and Monitoring Methods*, G.M. Mueller, G.F. Bills, and M.S. Foster, Editors. 2004, Elsevier Academic Press: Amsterdam. p. 37-47.
117. Karanam, S.K., Medicherla, N.R., *Enhanced lipase production by mutation induced Aspergillus japonicus*. African J. Biotechnol., 2008. **7**(12): p. 2064-2067.
118. Rajesh, E.M., Arthe R., Rajendran, R., Balakumar, C., Pradeepa, N., Anitha, S., *Investigation of lipase production by Trichoderma Reesei and optimization of production parameters*. EJEAFChE, 2010. **9**(7): p. 1177-1189.
119. Edwinoliver, N.G., Thirunavukarasu, K., Naidu, R.B., Gowthaman, M.K., Nakajima Kambe, T., Kamini, N.R., *Scale up of a novel tri-substrate fermentation for enhanced production of Aspergillus niger lipase for tallow hydrolysis*. Bioresource Technoloty, 2010. **101**: p. 6791-6796.
120. Ülker, S., Özel, A., Çolak A., Alpay Karaoğlu Ş., *Isolation, production, and characterization of an extracellular lipase from Trichoderma harzianum isolated from soil*. Turk J Biol., 2011. **35**: p. 543-550.
121. Tan, T., Zhang, M., Xu, J., Zhang J., *Optimization of culture conditions and properties of lipase from Penicillium camembertii Thom PG-3*. Process Biochemistry, 2004. **39**: p. 1495-1502.
122. Wang, D., Xu, Y., Shan, T., *Effects of oils and oil-related substrates on the synthetic activity of membrane-bound lipase from Rhizopus chinensis and optimization of the lipase fermentation media*. Biochem. Eng. J., 2008. **41**(1): p. 30-37.
123. Mahadik, N.D., Puntambekar, U.S., Bastawde, K. B., Khire, J. M. Gokhale, D. V., *Production of acidic lipase by Aspergillus niger in solid state fermentation*. Process Biochemistry, 2002. **38**(5): p. 715-721.
124. Mala, J.G.S., Edwinoliver, N.G., Kamini, N.R., Puvanakrishnan, R., *Mixed substrate state fermentation for production and extraction of lipase from Aspergillus niger MTCC 2594*. J. Gen. Appl. Microbiol., 2007. **53**(4): p. 247-253.

125. Mahanta, N., Gupta, A., Khare, S.K., *Production of protease and lipase by solvent tolerant Pseudomonas aeruginosa PseA in solid-state fermentation using Jatropha curcas seed cake as substrate*. Bioresource Technology, 2008. **99**(6): p. 1729-1735.
126. Godoy, M.G., Gutarra, M.L., Castro, A., Machado, O., Freire D., *Adding value to a toxic residue from the biodiesel industry: production of two distinct pool of lipases from Penicillium simplicissimum in castor bean waste*. J. Ind. Microbiol Biotechnol, 2010. **38**(8): p. 945-953.
127. Shaheen, I., Bhatti, H.N., Ashraf, T., *Production, purification and thermal characterization of invertase from a newly isolated Fusarium sp. under solid-state fermentation*. Int. J. Food Sci. Technol., 2008. **43**(7): p. 1152-1158.
128. Schuch, R., Mukherjee, D., *Lipase-catalized reactions of fatty acids with glycerol and acylglycerols*. Applied Microbiol. Biotechnol., 1989(30): p. 332-336.
129. Hung, T.C., Giridhar, R., Chiou, S.H., Wu, W.T., *Binary immobilization of candida rugosa lipase on chitosán*. J. Mol. Cataly. B: Enz., 1989. **26**(1-2): p. 69-78.
130. Carneiro da Cunha, M.G., Rocha, J.M., García, F.A., Gil, M.H., *Lipase immobilization on to polymeric membranes*. Biotechnology Techniques, 1999. **13**(6): p. 403-409.
131. Bradford, M.M., *A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding*. Analytical Biochemistry, 1976. **72**(1-2): p. 248-254.
132. Fukuda, H., Kondo, A., Noda, H., *Biodiesel Fuel Production by Transesterification of oils*. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2001. **92**(5): p. 405-416.
133. Takka, S., Gürel, A., *Evaluation of Chitosán/Alginate beads using experimental design: Formulation and In vitro characterization*. AAPS Pharma Sci Tech, 2010. **11**(1): p. 460-466.
134. Wu, K.A., Wisecarver, K.D., *Cell immobilization using PVA crosslinked with boric acid*. Biotechnol Bioeng, 1991. **39**(4): p. 447-449.
135. Castro-Ochoa, L., Rodríguez-Gómez, C., Valerio-Alfaro, G., Oliart-Ros, R., *Screening, purification and characterization of the thermoalkalophilic lipase produced by Bacillus thermoleovorans CCR11*. Enzyme Microb Technol., 2005. **37**(1): p. 648-654.

136. Mak, K.H., Yu, C.Y., Kuan, I.C., Lee, S.L., *Immobilization of Pseudomonas cepacia lipase onto magnetic nanoparticles for biodiesel production*. ISESCO Science and Technology Vision, 2009. **5**(7): p. 19-23.
137. Jaeger, K.-E., Eggert, T., *Lipases for biotechnology*. Curr Opin Biotechnol, 2002. **13**(4): p. 390-397.
138. Rathod, V.K., Pandit, A.B., *Effect of various additives on enzymatic hydrolysis of castor oil*. Biochem. Eng. J., 2009. **47**(1): p. 93-99.
139. Puthli, M.S., Rathod, V.K., Pandit, A.B., *Enzymatic hydrolysis of castor oil: process intensification studies*. Biochemical Engineering J., 2006. **31**(1): p. 31-41.
140. Byun, H.G., Eom, T.K., Jung, W.K., Kim, S.K. , *Lipase-catalized hydrolysis of fish oil in optimum emulsion system*. Biotechnol. Bioprocess. Eng., 2007. **12**(5): p. 484-490.
141. Salis, A., Pinna, M., Monduzzi, M., Solinas, V., *Comparison among immobilized lipases on macroporous polypropylene toward biodiesel synthesis*. J. Mol. Catal. B: Enzym., 2008. **54**(1): p. 19-26.
142. Halling, P.J., *Thermodynamic predictions for biocatalysis in nonconventional media: Theory, tests, and recommendations for experimental design and analysis*. Enzyme Microb.Technol., 1994. **16**(3): p. 178-206.

GLOSARIO

Aceite: Producto de origen mineral, animal o vegetal, líquido a 25°C. Constituido en el primer caso por hidrocarburos pesados, y en los otros por mezclas de glicéridos.

Ácidos grasos libres: También conocidos por sus siglas en inglés FFA (*free fatty acids*) son aquellos ácidos grasos que no se encuentran unidos a ningún glicérido. El contenido de este en aceites y grasas se puede determinar mediante el índice de acidez y el pH.

Ácidos grasos: Nombre dado a un grupo de ácidos capaz de neutralizar un solo equivalente básico, por tener solo un hidrógeno sustituible. Entran en la composición de grasas y aceites, los más frecuentes son el oleico, palmítico y esteárico.

Alcohólisis: Es la reacción mediante la cual una molécula es desplazada por un alcohol.

B2: Diesel mezclado con 2% de biodiesel

Cepa: Población celular descendiente de una única célula. Punto de inicio de una serie filogenética.

Colonia: Población de células que puede observarse macroscópicamente, y que crecen en un medio sólido, procedentes de una sola célula.

Crecimiento exponencial: Fase del crecimiento de un microorganismo en la que el número de células se duplica en un período de tiempo fijo.

Cultivo: Cepa particular o tipo de organismo en un medio de cultivo en el laboratorio.

Curva de crecimiento: Representación gráfica del crecimiento de un microorganismo en un medio de cultivo.

Diglicérido: Molécula de glicerol en la cual dos de los tres grupos alcohólicos han sido esterificados, es decir, dos de los grupos alcohólicos han sido sustituidos por dos moléculas de ácidos grasos.

Espora: Término utilizado para designar estructuras resistentes de reposo que forman numerosos procariotas y hongos.

Éster: Compuesto orgánico que se origina cuando se unen un ácido y un alcohol. Corresponde a la fórmula general $R-COO-R'$.

Fase de latencia: Período posterior a la inoculación de un medio de cultivo previo al crecimiento del microorganismo.

Fase estacionaria: Período en el que cesa el crecimiento de una población de microorganismos o cultivo.

Fase exponencial: Período en el que el crecimiento en el número de individuos de una población es constante y máximo.

Género: Grupo taxonómico de especies relacionadas.

Hidrólisis: Descomposición de una sustancia en unidades más pequeñas, generalmente monómeros, por adición de agua.

Inhibición: Que impide el crecimiento o función.

Inóculo: Material usado para iniciar un cultivo microbiano.

Medio de cultivo: Solución de varios nutrientes adecuada para el crecimiento de microorganismos.

Metabolito: Producto excretado por un microorganismo al final de la fase exponencial o durante la fase estacionaria.

Micelio: Cuerpo vegetativo de los hongos, formado por multitud de células.

Mohos: Hongos filamentosos.

Transesterificación: Es el proceso de desplazamiento de un alcohol pesado por un alcohol liviano en un éster.

ANEXOS

PUBLICACIONES

Artículos

Toscano, L., Montero, G., Stoytcheva, M., Campbell, H., and Lambert A. (2010). *Preliminary assessment of biodiesel generation from meat industry in Baja California, México*. J. Biomass & Bioenergy. **35**(1): p. 26-31.

Toscano, L., Gochev, V., Montero, G., and Stoytcheva M. (2011). *Enhanced production of extracellular lipase by novel mutant strain of Aspergillus niger*. J. Biotechnology & Biotechnological Equipment. **25**(1): p. 2243-2247.

Gochev, V., Montero, G., Kostov, G., Toscano, L., Stoytcheva, M., Krastanov, A., and Georgieva, A. (2012). *Nutritive medium engineering enhanced production of extracellular lipase by trichoderma longibrachiatum*. J. Biotechnology & Biotechnological Equipment. **26**(2): p. 2875-2882.

Toscano, L., Montero, G., Cervantes-Díaz, L., Stoytcheva, M., Gochev, V. and Beltrán, M. (2013). *Production and partial characterization of extracellular lipase from Trichoderma harzianum by solid-state fermentation*. J. Biotechnology & Biotechnological Equipment, Publisher: Diagnosis Press LTD. ISSN: 1310-2818

En: <http://www.diagnosisnet.com/bbeq/article/1c513f23-af8d-1fb4-ad67-c92e2947c953>

Toscano, L., Montero, G., Stoytcheva, M., Gochev, V., Cervantes-Díaz, L., Campbell, H., Zlatev, R., Valdez, B., and Gil-Samaniego, M., *Lipase production through solid-state fermentation using agro-industrial residues as substrates and newly isolated fungal strains*. J. Biotechnology & Biotechnological Equipment. En prensa

Capítulos de libro

Stoytcheva M., Montero G., Toscano L., Gochev V. and Valdez B. (2011). *The Immobilized Lipases in Biodiesel Production*. En: Stoytcheva, M., and Montero, G. (Eds),

Biodiesel-Feedstocks and Processing Technologies (p. 397-410). Croacia: Intech. ISBN 978-953-307-713-0

Montero G., Stoytcheva M., García, C., Coronado, M., Toscano L., Campbell, H., Pérez, A., and Vázquez, A. (2011). *Current Status of Biodiesel Production in Baja California, México*. En: Montero, G. and Stoytcheva, M., (Eds), Biodiesel-Quality, Emissions and By-Products (p. 137-152). Croacia: Intech. ISBN 978-953-307-784-0

OTROS PRODUCTOS

Congresos

Toscano-Palomar, L., Montero-Alpírez G., Campbell-Ramírez H.E., (2009). *Evaluación Preliminar de la Obtención de Biodiesel a partir de los Residuos de la Industria de Cárnicos*, En: *Congreso Nacional de Estudiantes de Posgrado del Instituto de Ingeniería, UABC* pp. 11. Mexicali, México: UABC. ISBN: 978-607-7753-33-90

Toscano, L., Montero, G., Stoytcheva, M., Gochev, V., (2010). *Producción de Lipasa Extracelular a partir de diferentes Fungus*, En: *2do. Congreso de Estudiantes de Posgrado del Instituto de Ingeniería de la UABC* pp. 8. Mexicali, México: UABC. ISBN: 978-607-7753-90-2

Toscano, L., Montero, G., Stoytcheva, M., Gochev, V., Amado, M.G. (2011). *Production of Extracellular lipase from different Fungus as catalyst for the enzymatic synthesis of biodiesel*. En: *XI International Hydrogen Congress of the Mexican Hydrogen Society* pp. 9. Cuernavaca, México: SMHAC. ISBN: 978-607-8182-01-5

Toscano-Palomar, L., Cervantes-Díaz, L., Montero-Alpírez, G., Amado-Moreno, M.A. (2012). *Estimación de la Producción de Lipasa Extracelular a partir de Cepas Nativas de Trichoderma harzianum por SmF*. En: *XIV Congreso Internacional y XXXIX Congreso Nacional de Fitopatología*. Nayarit, México.

Toscano-Palomar, L., Montero-Alpírez, G., Stoytcheva-Stilianova, M., Cervantes-Díaz, L., Gochev-Kostadinov, V. (2012). *Inmovilización de lipasa obtenida de hongos filamentosos*

con polímeros hidrofílicos en forma de esferas de hidrogel. En: XV Congreso Internacional de Ciencias Agrícolas. Mexicali, México. ISBN: 978-607-507-119-9.

Estancias de Investigación

Estancia de Investigación. 27 de junio - 26 de julio del 2011, Departamento de Química de la Universidad Autónoma de Guadalajara, México.

Estancia de Investigación 05 de noviembre - 23 de noviembre del 2012, Unidad de Tecnología de Alimentos del CIATEJ, Guadalajara, México.