



Vigilada Mineducación

EVALUACIÓN DE PRODUCCIÓN DE LIPASAS FÚNGICAS

Evaluation of Fungal Lipase Production

MAURICIO HENAO MARTINEZ

ANA MARIA OLARTE FERNANDEZ

Proyecto de Grado

Asesor, docente

Luz Deisy Marin Palacio

UNIVERSIDAD EAFIT

ESCUELA DE INGENIERÍAS

INGENIERÍA DE PROCESOS

MEDELLÍN

Evaluación de la producción de lipasas fúngicas

Mauricio Henao Martínez^a, Ana María Olarte Fernández^a

Luz Deisy Marín Palacio^b

^a Estudiante de Ingeniería de Procesos, Universidad EAFIT, Medellín Colombia

^b Profesor, Asesor del Proyecto de Grado, Departamento de Ingeniería de Procesos, Universidad EAFIT, Medellín, Colombia

Resumen

Las lipasas son enzimas que catalizan la hidrólisis y la síntesis de ésteres formados a partir de glicerol y ácidos grasos, están presentes en diferentes organismos, sin embargo, las lipasas microbianas son de mayor interés comercial. Estas son altamente usadas en industrias como la alimenticia, papelera y farmacéutica, aplicabilidad que se limita por la poca evaluación de microorganismos productores de lipasas para procesos específicos, el alto costo de producción y problemas asociados al uso sistémico de las enzimas. El fundamento de este estudio es seleccionar a partir de un grupo de microorganismos de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Trichoderma* y *Botrytis*, un microorganismo capaz de producir enzimas lipídicas en un medio complejo con un sustrato de bajo costo, como un residuo agroindustrial.

Para ello se evaluó el crecimiento radial de los microorganismos en un medio sólido definido con aceite de oliva como única fuente de carbono y energía, se seleccionaron aquellos con mayor crecimiento para determinar los parámetros cinéticos y actividad lipídica en un cultivo sumergido con un medio graso definido, y evaluar el crecimiento y producción de enzimas lipídicas en un medio complejo cuyo sustrato graso fue la pulpa residual de la industria del aceite de palma.

Entre los microorganismos evaluados, se encontró que los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* produjeron lipasas permitiendo su crecimiento en medios definidos con lípidos como única fuente de carbono y energía, adicionalmente, las lipasas producidas por *Aspergillus flavus* presentan mayor actividad en comparación con las producidas por *Penicillium*, sin embargo, este microorganismo presentó una baja actividad lipídica por microgramo de proteína que tuvo, en el cultivo en medio complejo que fue de $5,12 \times 10^{-3}$ U/mg respecto a la obtenida en medio definido de $1,94 \times 10^{-2}$ U/mg.

1. Introducción

El interés biotecnológico en las enzimas lipídicas (triacilglicerol acilhidrolasas, EC 3.1.1.3) ha incrementado por su aplicabilidad en biotransformaciones de importancia industrial, como la modificación de azúcares, síntesis de ésteres aromáticos, resolución de mezclas racémicas, esto las hace de utilidad en diferentes industrias como la alimenticia, papelera y farmacéutica entre otras. Entre las propiedades de las lipasas resalta su acción como catalizadores en la hidrólisis de ésteres de ácidos grasos, alcoholes, y triglicéridos, así como en reacciones de esterificación, interesterificación, esto debido a que las lipasas poseen una característica de gran interés: activación interfacial, se trata de moléculas que actúan en la interfaz de medios acuosos con lípidos o viceversa, es decir son catalizadores solubles en agua que actúan sobre compuestos no solubles en agua, como ácidos grasos, alcoholes, y triglicéridos, etc..

En términos económicos, el mercado global de enzimas se estimó en US\$10.4 billones en 2020 con una tasa de crecimiento anual compuesta de 5,5% para el periodo 2020-2027. Dada su amplia aplicabilidad, las lipasas se encuentran entre los tipos de enzimas más empleadas a nivel industrial [4]. El mercado global de lipasas microbianas se estimó en US\$440.7 millones para 2020 y se espera que alcance US\$645.6 millones para 2027, con una tasa de crecimiento anual compuesta de 5,6% [5].

Desde el punto de vista industrial, los hongos son fuentes más interesantes de lipasas, en comparación con los animales o las plantas, debido a su disponibilidad, afinidad con diversos sustratos y la alta estabilidad de sus

enzimas [6], además, producen principalmente lipasas extracelulares, lo cual simplifica los procesos de extracción y purificación [7], sin embargo, es importante continuar investigando sobre posibles microorganismos productores y las diversas condiciones necesarias para la producción de lipasas [7] ya que los principales inconvenientes para la aplicabilidad de estas, son: la necesidad de un sustrato específico para su producción, que puede tener altos costos, lo que limita el uso industrial de la enzima al incrementar sus costos de producción [8] [9], por otro lado las condiciones del medio que estabilizan las enzimas varían según el microorganismo productor [7], y estas son de gran interés ya que limitan la aplicabilidad de la enzima [10].

Por lo antes mencionado, es necesario determinar microorganismos productores de lipasas y las condiciones de cultivo para la producción de estas, aplicables a procesos específicos, además de realizar estudios para evaluar la viabilidad del uso de residuos agroindustriales como sustrato en la producción de lipasas, con el objetivo de reducir los costos de producción, incrementando así su aplicabilidad y viabilidad de su uso.

Los residuos agroindustriales resultantes de los procesos de manejo de los productos principales pueden ser de poco interés para las industrias que los producen, como en el caso del proceso de producción de aceite de palma, por lo que los procesos para el manejo de éstos no están bien estandarizados o varían entre las empresas productoras, [11], en ocasiones estos residuos representan una problemática ambiental y un reto económico para las empresas que deben destinar recursos para su disposición. El uso de estos residuos como sustrato de cultivos microbiológicos a diferentes escalas se ha presentado como una posible solución a dicha problemática [12], ya que además de la degradación biológica de los residuos y/o biorremediación de problemáticas ambientales representadas por los residuos, se puede añadir a ellos un valor agregado que proviene del metabolito de interés producido por el microorganismo en cuestión.

En la producción de aceite de palma se procesa el mesocarpio, que consiste en toda la pulpa externa de cada fruto, sin embargo, la parte interna o endospermo, es descartado, a pesar de ser un material con un contenido graso de hasta 49%, lo cual lo convierte en un sustrato interesante para el objetivo de este estudio, debido a que se ha demostrado según Coca et al [7] que la presencia de lípidos en el medio de cultivo tiene un efecto inductor en la producción de enzimas lipídicas.

Por lo que, en este estudio, se empleó como sustrato sólido para el medio complejo una mezcla de la fibra residual del mesocarpio y la pulpa del endospermo o coquito triturado, para enriquecer el contenido de lípidos del medio. En el caso de la fibra residual o torta de palmiste, representa el 12% de los residuos de la industria, por otro lado, el endospermo o coquito representa hasta 23% de los residuos. Hasta ahora ambos subproductos se han empleado principalmente para la producción de alimento para animales o como compostaje, sin embargo, estos y otros usos comunes, no representan un valor agregado como podría serlo su uso como sustrato en la producción microbiológica de compuestos químicos de interés como lo son las enzimas lipasas, con sus aplicaciones en múltiples industrias.

En este estudio se llevó a cabo un screening de actividad lipasa en medio sólido de 5 microorganismos fúngicos, eligiendo dos microorganismos según la evaluación cualitativa de su crecimiento micelar. Se evaluó posteriormente en un cultivo sumergido definido la cinética de crecimiento, producción de la enzima de interés, proteínas producidas y variaciones de pH. y con base en esto se eligió un único microorganismo para evaluar crecimiento y producción de lipasas en un medio sólido complejo con sustrato de bajo costo, determinando la viabilidad del uso de este residuo agroindustrial y microorganismo para su uso en la producción de enzimas lipídicas.

2. Materiales y métodos

En este estudio se llevaron a cabo tres experimentos que sirvieron como filtro o clasificación de los microorganismos evaluados, según su asimilación del sustrato graso empleado en los medios definidos, asumiendo que la producción de biomasa está directamente relacionada con la producción de enzimas lipolíticas para la degradación del sustrato graso que representa la única fuente de carbono y energía.

En primera instancia, se llevó a cabo un cultivo en medio sólido definido, con 5 microorganismos de los géneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Trichoderma* y *Botrytis* que se encuentran en el banco del laboratorio de Bioprocesos de la Universidad EAFIT. Se agregaron sales inorgánicas como fuentes de nitrógeno y elementos menores, en las siguientes concentraciones (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 0,25, además se adicionó 1% m/v de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ [13], adicionalmente, se variaron las fuentes de carbono obteniendo así tres medios diferentes en los que fueron evaluados los microorganismos. El primero y segundo medio contaban únicamente con aceite de oliva como fuente de carbono y energía con unas concentraciones de 2 y 5%, respectivamente. El tercer medio contenía 2% de aceite de oliva y adicionalmente 0.1% de glucosa para evaluar su acción en la adaptabilidad de los microorganismos al medio experimental. El cultivo se llevó a cabo en cajas Petri por 14 días en incubadora a 30°C.

Se empleó el medio reportado por Falony et al. [13] para estado sólido agregando agar como soporte en lugar del medio sólido mineral, se empleó específicamente bactoagar para obtener un medio sólido que no interfiriera en el consumo de los nutrientes por los microorganismos y que permitiera observar un crecimiento micelar adecuado para determinar de manera cualitativa que microorganismos se adaptaron mejor al medio empleado en el experimento, según su producción de enzimas lipídicas y consecuente asimilación del sustrato graso. Se seleccionaron los dos microorganismos que presentaron mayor crecimiento para continuar la etapa de crecimiento en estado sumergido definido, descrito a continuación.

Para la caracterización de la cinética de los microorganismos elegidos, se llevó a cabo un cultivo sumergido con la composición descrita por Coca et al. [7], agregando sales inorgánicas como fuentes de nitrógeno y elementos menores, en las siguientes concentraciones (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 0,25, además se adicionó 1% m/v de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ [13] y variando la fuente de carbono, en este caso se empleó aceite de oliva a 2% y 5% para el *Aspergillus* y *Penicillium* respectivamente. Este medio se inoculó con esporas ($10^6/ml$), con un tiempo de cultivo de 10 días a 30°C a 150 rpm [14] y dos muestras adicionales (con sus réplicas) en los días 12 y 14 de cultivo.

Nuevamente se añadió 0.1% de glucosa a una de las muestras y su réplica, que fueron procesadas en el día 10 del cultivo. Esto con el fin de evaluar su acción como inductor en la producción de enzimas lipídicas, ya que tal como lo presenta Pal et al [15], algunos carbohidratos como la sucrosa, actúan como inductores en la producción de lipasas. Esto se llevó a cabo en ambos experimentos con medio definido, con el fin de comparar estas réplicas con aquellas con aceite de oliva como única fuente de carbono y energía.

La caracterización de la cinética de los microorganismos incluyó la cuantificación de biomasa, cuantificación de proteínas totales, cuantificación de actividad lipolítica y mediciones de pH, todo esto para evaluar y describir el desarrollo de ambos microorganismos a lo largo del tiempo de cultivo, estableciendo su cinética de crecimiento y de producción del metabolito de interés, en este caso enzimas lipídicas.

Se realizó una réplica para cada día de cultivo y cada muestra, es decir, para el tiempo de cultivo de 10 días, las dos muestras adicionales para los días 12 y 14, y finalmente, la muestra con glucosa añadida, es decir, un total de 26 matraces para cada microorganismo y un total de 52 muestras. Se evaluó una muestra y su réplica cada uno de los días de cultivo, adicionalmente en los días 12 y 14 a fin de definir la cinética de crecimiento del microorganismo y confirmar el tiempo de la fase estacionaria. Finalmente, la muestra a la que se le añadió glucosa fue evaluada en el día 10 de cultivo y comparada con la muestra con aceite de oliva evaluada ese mismo día.

La cuantificación de biomasa se llevó a cabo mediante peso seco según lo reporta Coca et al. [7], cambiando la temperatura a 56°C y empleando una bomba de vacío de 550 mmHg y un papel filtro Whatman de 90 mm de Diámetro, grado 40.

El sobrenadante de cultivo obtenido tras la filtración se definió como el crudo enzimático [7] [13] [16]. A este se le realizaron mediciones de pH, actividad lipolítica, mediante el método descrito por Marseno et al [16] y las proteínas totales mediante el método de Lowry modificado tomado del laboratorio de bioprocesos de la universidad EAFIT.

El método de Marseno empleado para la medición de la actividad enzimática, consiste en la realización de una curva de calibración de ácidos grasos mediante colorimetría tras la formación de un complejo cúprico de color azul formado entre los ácidos grasos presentes en la muestra y el acetato de cobre piridina presente en el buffer empleado en la cuantificación [16]. Las mediciones en espectrofotómetro se realizaron en celdas de cuarzo, cuya estructura y superficie no se ve afectada por el isooctano.

Para la tercera y última etapa del proyecto, se empleó como medio de cultivo la mezcla de la torta de palmiste con el endospermo, teniendo en cuenta su contenido de aceites, que han sido demostrados como inductores en la producción de lipasas [7] y que además se trata de un residuo agroindustrial que se puede obtener del departamento de Antioquia, específicamente de las plantas productoras de aceite de palma ubicadas en el municipio de Carepa, Antioquia.

Este residuo fue triturado en molino de mono husillo de cocina, hasta obtener una pasta uniforme que fue añadida en iguales cantidades de 10 gramos, a cada matraz de 250 ml. Adicionalmente se preparó la solución de sales como fuentes de nitrógeno y elementos menores, en las siguientes concentraciones (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 0,25, además se adicionó 1% m/v de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ [13], se añadieron 10 mililitros como lo describe Kamini et al [17] con una relación 1:1 peso/volumen entre el sustrato y la solución. Una vez añadidos a cada matraz, se esterilizó en autoclave a 120°C y 20 psi. Este cultivo fue inoculado con esporas ($10^6/ml$), con un tiempo de cultivo de 8 días a 30°C.

Para la medición de la actividad lipídica se realizó un lavado del medio sólido, para lo cual se añadió el medio sólido con el microorganismo a un mortero para ser macerado con agua destilada en una relación 1:10 medio sólido/volumen de agua. El sobrenadante de dicha maceración fue filtrado al vacío con una bomba de 500mmHg, y el filtrado resultante fue llevado a tubos falcón de 50ml y centrifugado a 2000 rpm por dos minutos para separar completamente las impurezas. Una vez centrifugado, se tomaron 15 ml de la fase acuosa, sin impurezas y se reservaron en tubos falcón de 15 ml, siendo este el crudo enzimático a evaluar.

3. Resultados y análisis

Etapa 1: Selección de microorganismos en estado sólido definido.

En la fermentación en estado sólido (SSF por sus siglas en inglés) con medio definido se encontró que los microorganismos de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Trichoderma* se adaptaron al medio de manera satisfactoria al presentar crecimiento micelar (ver ilustración 1), lo cual, teniendo en cuenta que el aceite de oliva era la única fuente de carbono y energía, indica producción de lipasas que permitieron metabolizar el sustrato.

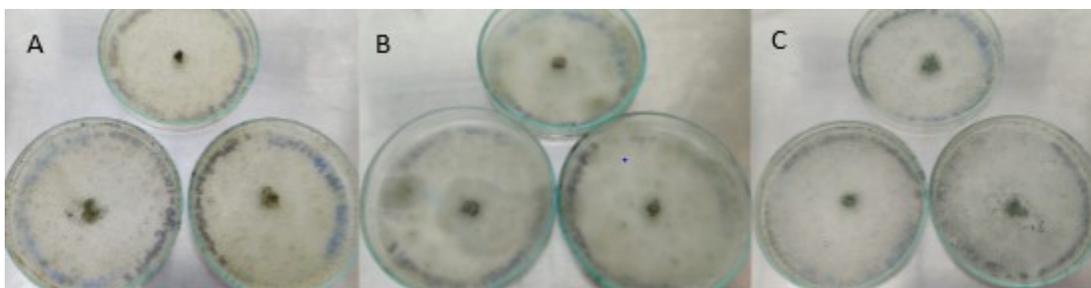


Ilustración 1. Crecimiento micelar en medio sólido definido de *Aspergillus* (A), *Penicillium* (B) y *Trichoderma* (C)

Los microorganismos de los géneros *Botrytis* y *Fusarium*, no presentaron crecimiento micelar apreciable, a pesar de que una muestra de *Botrytis* se observa crecimiento, esta es descartada debido a que sus réplicas no presentan crecimiento, además de la posible contaminación cruzada con otros microorganismos que se deduce debido a la morfología del microorganismo observado. Estos resultados no concuerdan con los obtenidos por Comménil et al, quienes evaluaron la actividad lipídica del microorganismo *Botrytis* cinérea y determinaron que tiene la habilidad de producir y liberar lipasas al hidrolizar los ésteres de ácidos grasos insaturados de cadena larga [18]. Además del estudio realizado por Jalloili et al, los cuales prueban la capacidad de crecimiento del microorganismo *Fusarium solani* en aguas residuales de almazara de oliva [19]. Estas diferencias puede ser causadas debido al medio empleado, ya que en el estudio de Comménil et al, emplearon ácido aspártico y en este estudio se empleó ácido oleico, palmítico y linoleico [20], en el caso de Jalloili et al se enriqueció el medio con extracto de levadura, adición que no se realizó en este estudio ya que el principal objetivo era observar la degradación del sustrato graso por parte de los microorganismos gracias a las lipasas producidas, que les permitieron degradar el sustrato. Esto puede indicar que los microorganismos fueron incapaces de obtener carbono o energía de su única fuente disponible, es decir, que no hubo producción de lipasas, por lo que fueron descartados en el primer experimento. Es importante añadir que para los géneros *Botrytis* y *Fusarium* no hubo crecimiento micelar apreciable en ningún caso, incluyendo las muestras sembradas en medio con 0.1% de glucosa, por lo que se infiere que el efecto de esta en la adaptabilidad de los microorganismos al medio experimental es insuficiente para que se dé un crecimiento micelar apreciable y significativo para este estudio (ver ilustración 2).

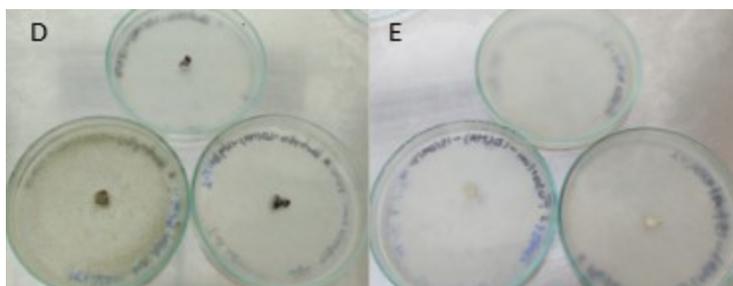


Ilustración 2. Cultivos en medio sólido definido de *Botrytis* (D) y *Fusarium* (E).

Entre los tres microorganismos que presentaron crecimiento se observó que el *Aspergillus* y *Penicillium* en medios con fuente de carbón de aceite de oliva a 2% y 5% respectivamente, presentaron un mayor crecimiento radial, por lo que se concluyó que su capacidad de metabolizar los lípidos les permitió un desarrollo micelar mejor al de los demás microorganismos, según el análisis cualitativo realizado.

Estos resultados concuerdan con lo reportado por Coca et al [7] quienes, al evaluar un grupo de bacterias, levaduras y hongos filamentosos, encontraron que los hongos del género *Aspergillus* presentaron mayor actividad lipídica que todos los demás microorganismos con aceite de oliva como fuente de carbono y energía [7]. Además, en el estudio realizado por Yadav et al [8], el cual caracteriza 29 cepas de *Aspergillus* y 26 cepas de *Penicillium*, demuestra que la producción de lipasas por los microorganismos de estos géneros es mejor que la de la mayoría de los organismos y que son adaptables a medios complejos con residuos como sustrato [8].

Finalmente, Falony et al [2] y Kemka et al [13] encontraron que microorganismos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* presentan actividad en sus lipasas producidas en medios complejos con residuos como sustratos.

Finalmente fueron elegidos los microorganismos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, ya que presentaron mayor crecimiento y adicionalmente, se encuentran altamente estudiados y se ha confirmado su eficacia en la producción de lipasas, no solo en medio definidos [7], sino también en medios complejos con residuos como sustrato [8] [13] [2].

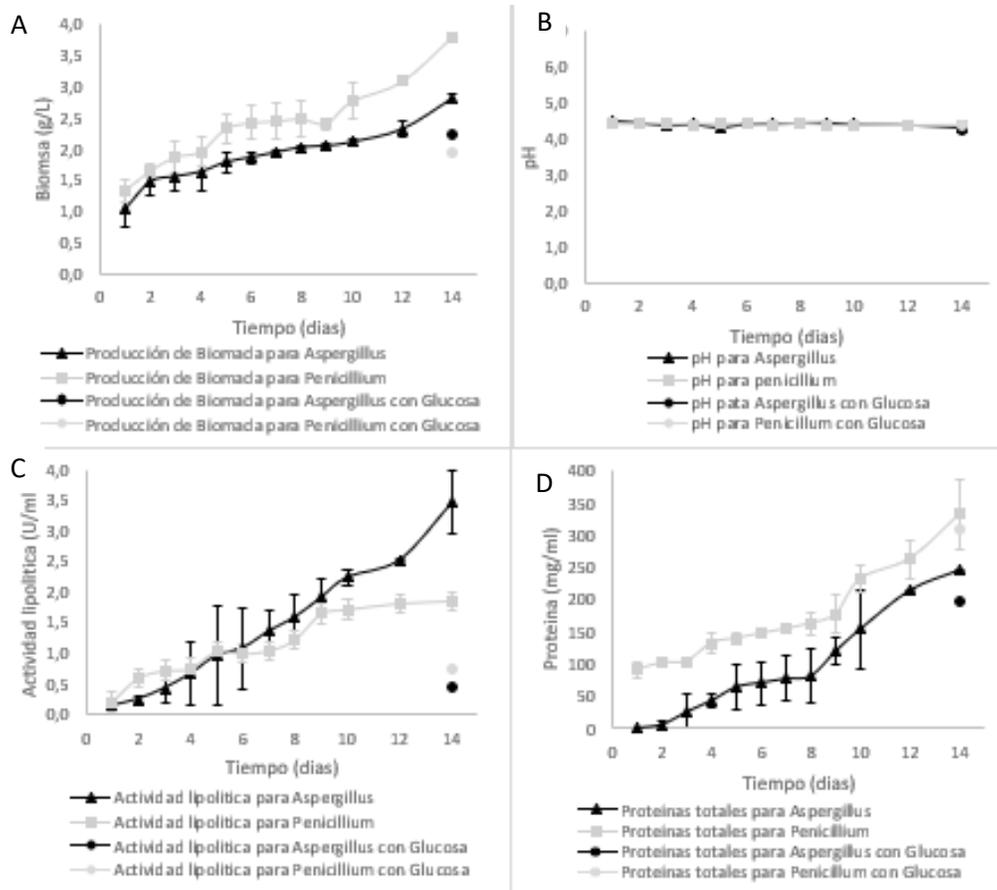
Etapa 2: Selección de microorganismos en estado sumergido definido.

Los microorganismos que presentaron mayores crecimientos radiales se evaluaron en medio sumergido definido utilizando como única fuente de carbono y energía el aceite de oliva. Los resultados de estos experimentos son presentados en la gráfica 1. Como se observa en la gráfica 1A, el mayor crecimiento celular se da para el *Penicillium*, con una producción de biomasa total formada en 14 días de crecimiento de 3,8 g/L, la cual es mayor que la biomasa producida por *Aspergillus* en el mismo tiempo de cultivo de 2,8 g/L. Las velocidades específicas (μ_x) de crecimiento fueron de $0.0021h^{-1}$ y $0.0018h^{-1}$ para *Aspergillus* y *Penicillium* respectivamente. Esto indica una correcta asimilación de la fuente de carbono por los microorganismos en cultivo sumergido, a pesar de que se observa una diferencia entre los experimentos realizados por Coca et al [7], el cual obtiene una biomasa de aproximadamente 6 g/L en un tiempo de cultivo de 8 días, esto puede deberse principalmente a la diferencia entre las cepas empleadas, la adición de sulfato de amonio como fuente de carbono y nitrógeno en el caso de Coca et al, y las diferencias en las condiciones. El pH es relativamente estable alrededor de 4.40 para ambos microorganismos como se observa en la gráfica 1B, teniendo una desviación estándar de 0.0671 para *Aspergillus* y de 0.0107 para *Penicillium*, esto concuerda con los rangos del pH para el crecimiento fúngico reportado por Beuchat [21].

La gráfica 1C presenta la actividad lipolítica definida como: “la cantidad de enzima que produce 1 umol de ácidos grasos por minuto” [16]. Los resultados obtenidos muestran que a medida que transcurre el tiempo de cultivo, se presenta mayor actividad lipolítica para ambos microorganismos, alcanzando los valores más altos de actividad en el último día evaluado correspondiente al día 14 con actividades de 3,46 y 1,85 U/ml para los microorganismos de *Aspergillus* y *Penicillium* respectivamente. Además, se observa el mismo comportamiento en el mismo periodo de tiempo para la producción de proteínas (gráfica 1D), obteniendo una cantidad de proteínas totales de 245,66 y 332,46 mg/ml para *Aspergillus* y *Penicillium* respectivamente. Por lo que se puede observar que *Aspergillus* tuvo una mayor actividad lipolítica, a pesar de tener una menor concentración de proteínas totales en el sobrenadante, indicando que la actividad lipídica por mol de proteína total producida en el tiempo de cultivo para el *Aspergillus* es de 0,0141 U/mg de proteína, lo cual es mayor respecto a la obtenida por *Penicillium*, la cual fue de 0,0056 U/mg de proteína. Por este motivo, se escogió el *Aspergillus* para continuar en la siguiente etapa del estudio, ya que nuestro interés es encontrar entre los microorganismos evaluados, aquel que produzca de manera más eficiente proteínas complejas que ayuden a descomponer y asimilar sustratos grasos, es decir, que produzca lipasas, en este caso, lipasas extracelulares [7] que permitan la degradación de residuo agroindustrial como sustrato en un medio complejo.

Etapa 3: Evaluación de microorganismo en medio sólido complejo.

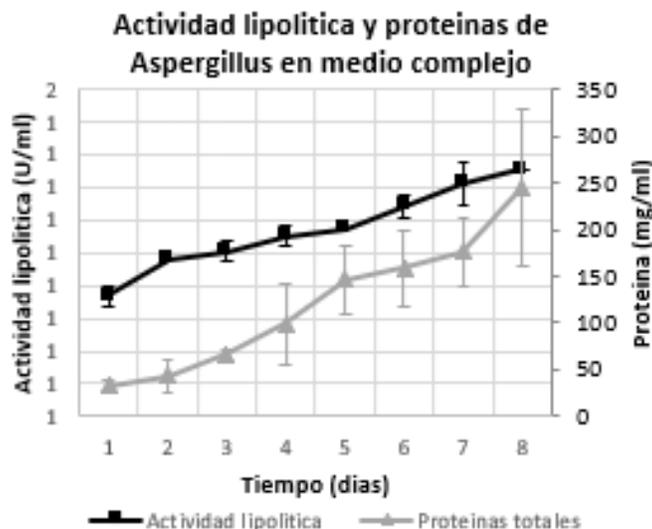
El microorganismo con una mayor actividad lipídica por mol de proteína se evaluó en un medio sólido complejo, usando mesocarpio y endospermo, los cuales son residuos agroindustriales de la producción del aceite de palma. Los resultados son presentados en la gráfica 2, la cual indica un comportamiento directo entre la actividad lipídica y proteínas respecto al tiempo de cultivo, alcanzando una actividad lipolítica de 1,25 U/ml y una producción de proteínas totales de 246,14 mg/ml en un periodo de 8 días. Sin embargo, al comparar estos resultados con los obtenidos en la etapa 2, donde se utilizó un medio sumergido complejo. Se encuentra que el comportamiento en el tiempo es similar. Cabe resaltar que las actividades en el medio complejo son 0,79 veces menores y las proteínas totales son 3,02 veces mayores respecto al medio definido.



Gráfica 1. Cinéticas de crecimiento (A), pH (B), actividad lipolítica (C) y proteína total (D) para cultivos llevados a cabo con *Aspergillus* (■) y *Penicillium* (▲)

Obteniendo así actividad lipídica por miligramo de proteína de 0,0051 U/mg, este comportamiento podría explicarse por la presencia de otros componentes en el medio complejo, lo que indujo la producción de diferentes enzimas que permitieran la asimilación de celulosa, hemicelulosa, xilano, glucosa, lignina, entre otras [22]. Teniendo en cuenta que el palmiste integral está compuesto 44% por lípidos crudos, 10.5% por fibra, 0,29% metionina y cistina y 0,28% lisina [23], la baja actividad lipolítica puede deberse a la preferencia del microorganismo por la celulosa presente en la fibra como un sustrato más asimilable, por lo que además de lipasas, el *A. flavus* estudiado podría estar produciendo lipasas, celulasas y otras enzimas.

Además se obtuvo una actividad por masa de sustrato seco de 0,001 U/g, estos resultados no concuerdan con los reportados por Olivera et al, quienes obtienen lipasas con actividades de 127 U/g utilizando torta de aceite de palma con *Aspergillus ibericus* después de 6 días de incubación [24] y el estudio reportado por Prabaningtyas et al, quienes obtienen lipasas con actividad máxima de 80,83 U/g en 11 días empleando *Aspergillus niger* en fermentación sólida compleja usando pastel de palmiste [25]. Estas diferencias se pueden deber principalmente a la diferencia de microorganismos y medios complejos empleados derivados de los residuos de la producción del aceite de palma.



Gráfica 2. Actividad lipolítica (■) y proteínas totales producidas (▲) por *Aspergillus flavus* en medio complejo.

4. Conclusiones

Los microorganismos de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Trichoderma* se adaptaron al medio sólido definido de manera satisfactoria al presentar crecimiento micelar, sin embargo, *Aspergillus* y *Penicillium* presentaron mayor crecimiento radial con concentraciones de aceite de oliva en el medio de 2% y 5%, respectivamente.

El *Aspergillus flavus* tuvo una actividad lipolítica 0,0141 U/mg de proteína, que es 2,5 veces mayor en comparación con *Penicillium* en el mismo experimento, en medio definido y evaluadas a 30°C y condiciones de pH ácido alrededor de 4.40.

La actividad lipolítica de las enzimas producidas por *A. flavus* En el medio complejo fue significativamente más baja que en el medio definido, por ende, puede inferirse el sustrato empleado no es apto para la producción de enzimas lipasas con dicho microorganismo en las condiciones evaluadas.

5. Referencias

- [1] Z.-Y. Shu, H. Jiang, R.-F. Lin, Y.-M. Jiang, . L. Lin And J.-Z. , "Technical Methods To Improve Yield, Activity And Stability In The Development Of Microbial Lipases," *Journal Of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, Vol. 62, No. 1, Pp. 1-8, 2010.
- [2] A. Pinto Kempka, N. Lamb Lipke, T. D. L. Fontoura Pinheiro, S. Menoncin, H. Treichel, D. M. G. Freire, M. Di Luccio And D. De Oliveira, "Response Surface Method To Optimize The Production And Characterization Of Lipase From *Penicillium Verrucosum* In Solid-State Fermentation," *Bioprocess Biosyst Eng* , No. 31, P. 119–125, 2008.

- [3] L. A. Salazar Carranza, M. M. Hinojoza Guerrero, M. P. Acosta Gaibor, A. F. Escobar Torres And A. J. Scrich Vázquez, "Caracterización, Clasificación Y Usos De Las Enzimas Lipasas En La Producción Industrial," *Revista Cubana De Investigaciones Biomédicas*, Vol. 39, No. 4, 2021.
- [4] B. Sarrouh, T. M. Santos, . A. Miyoshi, R. Dias And V. Azevedo, "Up-To-Date Insight On Industrial Enzymes Applications And Global Market," *Bioproc Biotechniq*, 2012.
- [5] G. I. A. I. Usa, "Industrial Enzymes: Global Market Trajectory & Analytics," *Strategyr.Com*, [Online]. Available: <https://Strategyr.Com/Market-Report-Industrial-Enzymes-Forecasts-Global-Industry-Analysts-Inc.Asp>.
- [6] A. N.Z And . A. E.M., "Extracellular Lipase Of *Aspergillus Niger* Nrrl3; Production, Partial Purification And Properties," *Indian J Microbiol*, Vol. 49, P. 77–83, 2009.
- [7] J. Coca, O. Hernández , R. Berrio, S. Martinez, E. Diaz And J. C. Dustet, "Producción Y Caracterización De Las Lipasas De *Aspergillus Niger* Y *A. Fumigatus*," *Biotecnología Aplicada*, Vol. 18, No. 4, Pp. 216-220, 2001.
- [8] R. P. Yadav, R. K. Saxena, R. Gupta And S. Davidson, "Lipase Production By *Aspergillus* And *Penicillium* Species," *Folia Microbiol*, Vol. 43, No. 4, Pp. 373-378, 1998.
- [9] L. R. Castilho, C. M. Polato, E. A. Baruque, G. L. Santanna Jr And D. M. Freire, "Economic Analysis Of Lipase Production By *Penicillium Restrictum* In Solid-State And Submerged Fermentations," *Biochemical Engineering* , Vol. 4, Pp. 239-247, 2000.
- [10] A. Marini, N. Imelio, S. Marini And D. Roman, "Extraction Of Lipase From *Aspergillus Niger* By Insoluble Complex Formation With Anionic And Cationic Polyelectrolytes," *Process Biochemistry*, Vol. 47, No. 12, Pp. 2234-2239, 2012.
- [11] E. Vargas And M. Zumbado, "Composición De Los Subproductos De La Industrialización De La Palma Africana Utilizados En La Alimentación Animal En Costa Rica," *Agronomía Costarricense*, Vol. 27, No. 1, Pp. 7-18, 2003.
- [12] . A. E. Aceves Diez And L. M. Castañeda Sandoval, "Producción Biotecnológica De Lipasas Microbianas, Una Alternativasostenible Para La Utilización De Residuos Agroindustriales," *Vitae, Revista De La Facultad De Química Farmacéutica*, Vol. 19, No. 3, Pp. 244-247, 2012.
- [13] G. Falony, J. Coca Armas, J. C. Dustet Mendoza And J. L. Martínez Hernández, "Production Of Extracellular Lipase From *Aspergillus Niger* By Solid-State Fermentation," *Food Technology & Biotechnology*, Vol. 44, No. 2, 2006.
- [14] D. C. M. D. J. Serrat-Díaz, M. S. A. Alfonseca-Ladrón De Guevara, L. A. Soutelo-Jiménez And L. C. E. Lavadié-González, "Actividad Lipasa Extracelular En Hongos Filamentosos Aislados De Residuos De La Industria Del Aceite Vegetal Cultivados En Fermentación Sumergida," *Revista Cubana De Química*, Vol. 31, No. 1, Pp. 3-15, 2019.

- [15] N. Pal, S. Das And A. Kundu, "Influence Of Culture And Nutritional Conditions On The Production Of Lipase By Submerged Culture Of *Aspergillus Niger*," *Journal Of Fermentation Technology*, Vol. 56, No. 6, Pp. 593-598, 1978.
- [16] D. W. Marseno, R. Indrati And Y. Ohta, "A Simplified Method For Determination Of Free Fatty Acids For Soluble And Immobilized Lipase Assay," *Indonesian Food And Nutrition Progress*, Vol. 5, No. 2, Pp. 79-83, 1998.
- [17] N. Kamini, J. Mala And R. Puvanakrishnan, "Lipase Production From *Aspergillus Niger* By Solid.State Fermentation Using Gingelly Oil Cake," *Process Biochemistry*, Vol. 33, No. 5, Pp. 505-511, 1998.
- [18] P. Comménil, L. Belingheri, M. Sancholle And B. Dehorter, "Purification And Properties Of An Extracellular Lipase From The Fungus *Botrytis Cinerea*," *Laboratorio De Biologia Y Fisica Vegetal, Universidad De Reims, Francia*, 1995.
- [19] R. Jallouli And S. Bezzine, "Lipase Production By A Tunisian *Fusarium Solani* Strain Cultivated On Olive Oil Wastewater-Based Media And A Biotreatment Assay," *Desalination And Water Treatment*, Vol. 57, No. 43, Pp. 20327-20331, 2016.
- [20] C. Massimo, T. Lucio, J. Martinez And J. Lercker, "Extra Virgin Olive Oil And Oleic Acid," *Nnutricion Clinica Y Dietetica Hospitalaria*, Vol. 29, No. 3, 2009.
- [21] L. R. Beuchat, *Food And Beverage Mycology*, New York: Van Nostrand Reinhold, 1897.
- [22] J. Van Dan, "Subproductos De La Palma De Aceite Como Materias Primas De Biomasa," *Palma*, Vol. 37, No. 2, Pp. 149-156, 2016.
- [23] Z. Mario, S. Madrigal And M. Marin, "Composición Y Valor Nutricional Del Palmiste O Coquito Integral De Palma Africana En Pollos De Engorde," *Agronomfa Costarricense*, Vol. 16, No. 1, Pp. 83-89, 1992.