

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

E.A.P DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Aislamiento y selección de hongos lipolíticos a partir de
aceites vegetales de desecho (proveniente de frituras)
utilizados en la elaboración de biodiesel**

TESIS

para optar al título profesional de Biólogo con Mención en Microbiología y
Parasitología

AUTOR

Luis Ignacio Mendoza Canales

Lima – Perú

2010

A papá y mamá...

A mi abuela Sara (1915-2007)

A mi tío Alfonso (1941-2009)

AGRADECIMIENTOS.

Al Ph.D. Pedro Luis Castellanos Sánchez por la orientación de este trabajo, por su tolerancia y paciencia, mi gratitud completa.

A los profesores Mg. Fernando Merino Rafael y al Dr. Pablo Ramírez Roca por la gentileza del uso de equipos en sus ambientes para la preparación de materiales y medios de cultivo empleados en la presente investigación.

A la profesora Mg. Elena Quillama Polo por su amistad y consejos.

A los miembros del jurado: Mg. Mario Alcarraz Curi, Mg. Susana Gutierrez Moreno y Mg. Fernando Merino Rafael por las sugerencias hechas para mejorar el contenido del presente trabajo. A la Profesora Susana, mi agradecimiento por su comprensión en mis momentos adversos.

A la Ing. Ana Celina Lancho Ruiz por sus gestos de amabilidad que recuerdo con gratitud.

Al Bach. Américo Torres Humpire por su amistad y ayuda.

A los alumnos con los que compartí el laboratorio S-20 de la Facultad de Biología: Edy, Elvis, Henry, Jesy, Lisi, Margot, Paty, Gaby por su amistad y por reflejar cada uno de ellos el interés por la investigación.

A quien en vida fue el Sr. Jaime Ccora Tuya (1955-2009), guardián de la Facultad de Biología, por su amistad, paciencia y auxilio; quien muchas veces fue la última persona que veía al acabar mis labores.

A mis amigos y amigas: Miguel, Gandhi, Fabian, Jorge, Alejandra, Nadia y los integrantes de la organización universitaria FRATERNIDAD CIENTIFICA – VIDA cuya amistad fue siempre un estímulo para la culminación de este trabajo.

Al personal administrativo de la facultad de Biología-UNMSM a los Srs: Ulloa, Luna, Mendoza, César, Armando, Andrés, Galindo y Sras: Gladys, Diana, Cristina, Clavel.

Finalmente, mi agradecimiento hacia todas las personas con las que compartí este tiempo a través de quienes aprendí a reconocer mis fortalezas y mis defectos en este camino interminable que conduce a nuestra propia evolución.

*Existen muchas formas de energía que el hombre emplea,
pero existe una única que nace con cada ser humano,
que es inalienable y solo la muerte la agota.....*

LA VOLUNTAD.

Anónimo

ÍNDICE

	Pág.
AGRADECIMIENTOS.....	iii
I.- RESUMEN.....	viii
II.- INTRODUCCIÓN	1
III.- ANTECEDENTES.....	6
3.1.- Definición de Aceites de desecho.....	6
3.2.- Generación de Aceites de desecho	6
3.3.- Gestión de los Aceites de desecho	7
3.4.- Aceites y Grasas	8
3.5.- Microorganismos lipolíticos.....	8
3.6.- Métodos de aislamiento.....	9
3.7.- Uso de Tweens.....	10
3.8.- Lipasas.....	12
3.8.1- Especificidad de Lipasas	15
3.9.- Esterasas.....	16
3.10.- Fosfolipasas.....	17
3.11.- Diferencias entre Lipasas y Esterasas	17
3.12.- Tecnología de Catálisis Enzimática.....	18
3.13.- Uso comercial de Enzimas.....	19
3.14.- Uso comercial de Lipasas.....	19
3.15.- Lipasas y Biodiesel.....	21
3.16.- Perspectivas de las lipasas	22
V.- MATERIALES Y METODOS.....	24
4.1.- Recolección y naturaleza de las Muestras.....	24
4.2.- Substrato de lípidos.....	24
4.3.- Método APHA modificado.....	25
4.4.- Método Czapek.....	25
4.5.- Uso de Diluyentes.....	26

4.6.- Preparación del inóculo.....	26
4.6.1.- En el Método APHA modificado.....	26
4.6.2.- En el Método Czapek	26
4.7.- Procedimiento para Método APHA modificado.....	27
4.7.1.- Preparación de la muestra de aceite de desecho	27
4.8.- Procedimiento para Método Czapek.....	28
4.8.1.- Uso de sólo caldo Czapek.....	28
4.8.2.- Elección del éter de petróleo como diluyente adicional.....	28
4.8.3.- Prueba para determinar el volumen óptimo de éter a usarse.....	28
4.8.4.- Uso del Éter de petróleo.....	30
4.9.- Prueba de Lipólisis.....	30
4.9.1.- Determinación de Actividad Lipolítica.....	31
4.10.-Identificación de hongos.....	31
4.11.-Análisis Estadístico del número de hongos lipolíticos aislados.....	31
V.- RESULTADOS.....	33
5.1.- Microorganismos lipolíticos y no lipolíticos.....	33
5.2.- Número de hongos lipolíticos aislados con el Método APHA modificado.....	34
5.3.-. Número de hongos lipolíticos aislados con el Método Czapek.....	35
5.4.- Número de hongos lipolíticos aislados por ambos métodos para cada muestra.....	36
5.5.- Número de hongos lipolíticos aislados según el tipo de inóculo empleado.....	37
5.6.- Días de inicio de aparición de halos de degradación de cepas aisladas por el Método APHA modificado.....	37
5.7.- Días de inicio de aparición de halos de degradación de cepas aisladas por el Método Czapek.....	38
5.8.- Comparación de los días de inicio de actividad lipolítica de las cepas aisladas por ambos métodos (P.L.: Prueba de Lipólisis).....	39
5.9.- Análisis Estadístico	40
5.9.1.- Prueba de T-Students.....	40
5.9.2.- Prueba de Mann Whitney.....	40

5.9.3.-Análisis de Varianza (ANOVA) y Prueba de Comparaciones Múltiples de Tukey..	41
5.10.- Hongos lipolíticos con mayor y menor capacidad de lipólisis	42
5.10.1.- Identificación del Género de los hongos con mayor actividad de lipólisis.....	43
VI. DISCUSIÓN.....	45
6.1.- Aislamiento de hongos lipolíticos a partir de las muestras de aceites vegetales de desecho proveniente de frituras.....	45
6.2.- Días de inicio de aparición de halos de degradación.....	47
6.3.- Análisis de Varianza (ANOVA) y Prueba de Comparaciones Múltiples de Tukey.....	47
VII.- CONCLUSIONES	49
VIII.- RECOMENDACIONES.....	50
IX.- ILUSTRACIONES.....	51
X.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
XI.- ANEXOS.....	63

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 : Cantidad, género y código de los 10 hongos aislados con mayor capacidad de lipólisis y su correspondiente muestra origen.....	44
Tabla 2: Número de microorganismos lipolíticos (m.o.l.) y No lipolíticos (NO m.o.l.) que crecieron por el Método APHA modificado y Método Czapek.....	69
Tabla 3: Número de hongos lipolíticos aislados por muestra (M) con el Método APHA modificado empleando los diluyentes: Éter de petróleo (E), Buffer fosfato (B) y de la muestra pura sin diluyente (P1)	69
Tabla 4: Número de hongos lipolíticos aislados por muestra (M) con el Método Czapek empleando Caldo Czapek (C) , Éter de petróleo (E) como diluyente adicional y de la muestra pura sin diluyente (P2)	70
Tabla 5: Días de inicio de actividad degradativa de los hongos aislados por muestra correspondiente al Método APHA modificado y Método Czapek, según el medio sólido empleado.....	70
Tabla 6: Prueba de T-Students: Análisis de medias del número total de hongos lipolíticos aislados según métodos.....	71
Tabla 7: Prueba de Mann Whitney : Análisis de medias del número de hongos lipolíticos según muestras individuales por métodos.....	71
Tabla 8: Análisis de Varianza (ANOVA) y Prueba de Comparaciones Múltiples de Tukey: Comparación de medias del número de hongos lipolíticos entre los tipos de inóculos empleados.....	72

I.- RESUMEN

La mayor parte de los aceites vegetales empleados para freír alimentos se convierten luego en aceites de desecho (aceites usados). Este producto residual no tratado es descargado generalmente sobre ríos, canales o el mar provocando su contaminación.

El tratamiento de los aceites de desecho usando microorganismos lipolíticos capaces de bioconvertir estos aceites en productos de interés como Biodiesel es reciente y poco estudiada. Por ello, en el presente trabajo se aislaron hongos lipolíticos a partir de 6 muestras de aceites vegetales de desecho proveniente de frituras.

Se emplearon dos métodos: uno de ellos corresponde a la metodología estandarizada por el American Public Health Association (APHA), pero modificada para los objetivos de la presente investigación y que se denominó: Método APHA modificado; y el otro empleando el medio mínimo de sales Czapek Dox (3% substrato de lípidos) que se denominó: Método Czapek. La capacidad de producir lipasas de las cepas aisladas fue comprobada "in vitro" al sembrarse en Agar Czapek (pH 6.3) con 3% de substrato de lípidos como única fuente de carbono: Prueba de Lipólisis (P.L.).

Se aisló en total 123 cepas, de los cuales 105 fueron hongos lipolíticos: 55 obtenidos con Método APHA modificado y 50 con Método Czapek. De éstos, sólo el 9.52% (10 cepas) logró la degradación completa del substrato de lípidos en Agar Czapek (3%). Perteneciendo 8 al género *Penicillium*, 1 a *Aspergillus* y 1 a *Geotrichum*. El resto tuvo halos de degradación menores a 1 mm y diámetros de las colonias menores a 0.5 cm.

En el Método APHA modificado el uso del éter de petróleo como diluyente alternativo influyó para aislar menor número de cepas con respecto al uso del buffer fosfato. Sin embargo, con el éter se aisló dos de los tres géneros de hongos con mayor capacidad de lipólisis (*Penicillium* y *Geotrichum*).

En cambio, no hubo diferencias significativas al emplearse éter como diluyente adicional en el Método Czapek, aislándose sólo el género *Penicillium* dentro del grupo de los más lipolíticos reportados en la presente investigación.

Palabras Claves: hongos lipolíticos, lipasa, aceites de desecho, Método APHA modificado, Método Czapek, éter de petróleo.

ABSTRACT

Most vegetable oils used for frying foods then become waste oils (used edible oils). This waste product untreated is discharged usually on rivers, canals or the sea causing contamination.

The treatment of waste oils with lipolytic microorganisms capable of the bioconversion these oils in products of interest such Biodiesel, is recent and little studied. Therefore, in this work were isolated lipolytic fungi from 6 samples of waste vegetable oil from frying.

Two methods were used: one of them corresponds to the methodology standardized by the American Public Health Association (APHA), but modified for the purposes of this research and was called: modified APHA Method, and the other one using the minimum salt Czapek Dox (3% lipid substrate) that is called: Czapek Method. The ability to produce lipases was tested "in vitro" when cultivated on Czapek Agar (pH 6.3) with 3% lipid substrate as sole carbon source: Test of Lipolysis (PL).

123 strains were isolated, of these 105 were lipolytic fungi: 55 got with the modified APHA Method and 50 with Czapek Method. Of these, only 9.52% (10 strains) were able to complete degradation of the lipid substrate Czapek Agar (3%). 8 belonging to the genus *Penicillium*, 1 to *Aspergillus* and 1 to *Geotrichum*. The remaining showed degradation halo low to 1 mm and diameter of colonies less than 0.5 cm.

In the modified APHA Method using petroleum ether as diluent alternative influenced to isolate smaller number strains than with the use of phosphate buffer. However, with the ether was isolated from two of the three genera of fungi with greater capacity for lipolysis (*Penicillium* and *Geotrichum*).

There weren't significant differences when used ether as an additional diluent in Czapek Method, only the genus *Penicillium* isolated within the group of the most lipolytic reported in this investigation.

Key words: lipolytic fungi, lipase, waste oil, modified APHA Method, Czapek Method, petroleum ether.

II.- INTRODUCCION

Los aceites de desecho (o aceites usados) son cualquier aceite derivado del petróleo sean sintéticos, de origen vegetal o animal y que ya hayan sido empleados (Fiedler, 2005).

Según su origen los aceites usados pueden clasificarse en dos grandes fuentes: aceites industriales de desecho y aceites de origen vegetal o animal. Se pueden identificar tres tipos principales de aceites industriales de desecho: aceite industrial (aceite hidráulico, lubricante de motores, aceite de corte), aceite de garaje o taller mecánico y aceite de transformador (Fiedler, 2005). En cambio, los aceites vegetales son oriundos de plantas y procesados por la industria oleaginosa para su consumo doméstico e industrial. Estos aceites luego de ser utilizados se convierten en aceites usados o de desecho

En algunos países, el aceite usado es definido como aquel aceite que ya fue utilizado y por consiguiente ya no puede ser empleado para el uso que se le asignó inicialmente, convirtiéndose en un tipo de desecho del que no se aprovecha su valor energético como combustible. Mas bien su disposición resulta un problema para el medio ambiente y la salud pública.

La mala disposición de cualquier tipo de desecho ocasiona un impacto ambiental sobre el agua, aire y/o tierra. En particular, la contaminación del recurso agua (problema de creciente actualidad) es producido por el vertido de contaminantes en forma de químicos inorgánicos (ácidos, sales, fertilizantes, metales pesados, etc.) y orgánicos (petróleo, gasolina, aceites, grasas, solventes orgánicos, etc.). Los aceites son una gran fuente de contaminación de las aguas y provienen generalmente de vertidos industriales, escorrentía urbana y rural así como de desagües domésticos (Nazario, 2005)

Las aguas que se desechan ingresan al sistema de alcantarillado, provocando atoros, corrosión de tuberías y contaminando los cauces de agua donde se descargan.

En particular, los aceites y grasas son inmiscibles con el agua y al mezclarse forman una película superficial impermeable sobre los cuerpos de agua (lagos, ríos, mares, etc) donde son vertidos. Ello genera condiciones anaeróbicas que evitan el ingreso y disolución del oxígeno provocando así que la vida aeróbica presente desaparezca (Winkler, 1999)

El Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI), de Argentina, sostiene que en todos los hogares se generan cada día restos de aceite vegetal usado. Normalmente, estos residuos una vez que han perdido su utilidad culinaria se vierten por los desagües domiciliarios y terminan en cauce público. Algunos expertos sostienen que un solo litro de aceite doméstico contamina 1.000 litros de agua, llegándose a producir 4 litros de restos de aceite vegetal por persona al año (INTI, 2004).

Sobre el tema de salud pública se conoce que los aceites comestibles alterados por recalentamiento contienen hidrocarburos aromáticos policíclicos como: benzo(a)pireno, benzo(a) antraceno, dibenzo(a,h) antraceno, fluoranteno y pireno; todos éstos están incluidos dentro del grupo de hidrocarburos aromáticos policíclicos de gran potencia carcinogénica (De La Cruz y Huamán, 2002), por lo que su reutilización constituye un factor de riesgo para el consumidor final.

En general, la problemática ambiental se ve agudizada además por el parque automotor, el cual es uno de los mayores generadores de gases contaminantes debido al uso de combustibles de origen fósil, especialmente el diesel de petróleo, ya que durante la combustión de este carburante los gases que se originan y que contaminan el aire son: monóxido de carbono (CO), 2%; óxidos de azufre (SOx), 4%; partículas totales suspendidas (PTS), 19%; óxidos de nitrógeno (NOx), 31% y material particulado (MP), 71%; elementos que contribuyen a los fenómenos del efecto invernadero y lluvia ácida (Nazario, 2005).

Ante este panorama de fuerte impacto ambiental, surge la preocupación por el desarrollo sustentable basado en fuentes de energía renovables que sean menos

poluentes al medio ambiente, y dentro de esta biomasa se encuentran paradójicamente también los aceites vegetales obtenidos de “cultivos energéticos”

Los cultivos energéticos consisten en la producción de biomasa mediante cultivos específicos (monocultivo) y la transformación de ésta en productos energéticos de fácil utilización en los sistemas convencionales, en sustitución de los combustibles tradicionales (Fernández, 1993).

Actualmente, existe la posibilidad de usar aceites vírgenes para producir biocombustible (con creciente valor socio-ambiental). Sin embargo, esta tendencia podría afectar la seguridad alimentaría al competir los terrenos para cultivo energético (palma, cocotero, higuera, palta, jatropha, colza, soya caña de azúcar, remolacha, maíz, etc) con aquellos destinados al cultivo de alimentos de consumo masivo humano y/o animal, además de afectar la ecología de la zona al privilegiarse los terrenos para monocultivos de valor energético.

En cambio, se toma poca atención a los residuos generados luego de cumplir su función alimentaría, como son los aceites vegetales de desechos provenientes de frituras, para la producción de biocombustible. El óptimo aprovechamiento energético de estos aceites no atentaría de manera alguna contra la seguridad alimentaría de la población. Por ello, una alternativa de solución tecnológica para la correcta gestión de estos aceites de desecho y su utilidad energética es su bioconversión utilizando microorganismos con capacidad de lipólisis a través de la enzima lipasa.

Actualmente, muchos microorganismos son conocidos como buenos productores de lipasas que catalizan la hidrólisis de aceites y grasas. Estas enzimas son producidas intra-y extracelularmente en diversos microorganismos como hongos, bacterias y levaduras. Algunos géneros de bacterias particularmente conocidos por producir lipasas son: *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Moraxella* y *Staphylococcus*; entre los hongos tenemos a *Rhizopus*, *Geotricum*, *Aspergillus*, *Mucor* y *Penicillium*; y entre las levaduras resaltan *Candida*, *Rhodotorula* y *Hansenula*. Sin embargo, la propiedad

de lipólisis esta extendida en la naturaleza y no limitada a estos microorganismos (APHA, 2001).

La lipólisis es la hidrólisis de enlaces de esteres de tri-, di-, y monoglicéridos usualmente catalizada por enzimas, generalmente por el grupo de enzimas conocidas como lipasas (APHA, 2001).

Gandhi (1997), Sharma *et al.* (2001), Leal *et al.* (2002) y Pastore *et al.* (2003) han reportado que las lipasas tienen un vasto campo de aplicación en las industria, como en el procesamiento de aceites y grasas; en la formulación de detergentes, en el procesamiento de alimentos, en procesos de síntesis usados para la industria de química fina y farmacéutica, en la manufactura del papel, producción de cosméticos, en la industria de combustibles (biodiesel) para la modificación de ésteres, en el procesamiento de pieles, como biosensores para la industria médica, en la determinación de lípidos en sangre, y en el tratamiento de efluentes.

El Biodiesel es el biocombustible alternativo al diesel de petróleo, que se obtiene a partir de aceite vegetal virgen y/o usado, su importancia esta siendo relevante considerando el crecimiento de la utilización de este biocombustible en el ámbito mundial, no solo por el aspecto de menor impacto ambiental en comparación a los combustibles de origen fósil, sino también por ser una fuente de energía renovable.

Los aceites de desecho provenientes de frituras constituyen un producto residual los que mediante un proceso conocido como transesterificación química (catálisis química) se transforman como producto final en Biodiesel. Este mismo producto puede ser obtenido usando microorganismos lipolíticos a través del proceso denominado catálisis enzimática.

Entre los rasgos distintivos del combustible Biodiesel son :

- a) Es un derivado de planta-no de petróleo-, y como tal su combustión no incrementa los niveles atmosféricos netos de CO₂, un gas “invernadero”
- b) Puede ser producido domésticamente (mediante proceso químico), ofreciendo la posibilidad de reducir la importación de petróleo.

- c) Es biodegradable.
- d) Relativo al combustible diesel convencional, sus productos de combustión han reducido niveles de particulados, monóxido de carbono, y bajo algunas condiciones, óxidos de nitrógeno. Esta bien establecido que el Biodiesel proporciona una reducción substancial en emisiones de SOx y reducción considerable en CO, hidrocarburos, hollín, y materia particulada. (Fukuda et al., 2001).

Es así que los aceites de desecho luego de ser transesterificados pueden ser usados como una alternativa de combustible limpio sea como aditivo o sustituyente al diesel de petróleo, sin reducir significativamente su rendimiento, ni afectar las propiedades mecánicas del motor (Zingg, 2004).

Por lo tanto ante la problemática de la disposición de los aceites de desecho y la posibilidad de su aprovechamiento energético a través de su bioconversión en Biodiesel, hemos visto la necesidad de investigar acerca del aislamiento y selección de hongos lipolíticos como paso inicial para una alternativa biotecnológica de producción de biodiesel, el cual ya es empleado actualmente como aditivo al diesel de petróleo. Incluso, en el Perú existe un marco legal que promueve el uso de biocombustibles como sustituto parcial o total al diesel de petróleo (ver Anexo).

El trabajo realizado tuvo como objetivo aislar hongos lipolíticos a partir aceites vegetales de desecho proveniente de frituras. Para ello se emplearon dos metodologías con la finalidad de obtener hongos con capacidad de producir "in vitro" la enzima lipasa: hongos lipolíticos. Además se probó el efecto del éter de petróleo como solvente de las muestras de aceite analizadas, sea como diluyente alternativo al buffer fosfato o como diluyente adicional junto al medio mínimo de sales Czapek Dox.

III.- ANTECEDENTES

3.1.- Definición de Aceites de desecho

Según el Grupo Técnico de Trabajo de la Convención de Basel del Programa Ambiental de Naciones Unidas (UNEP), identifica a los residuos de aceites y grasas comestibles de origen vegetal o animal (ejm aceites de freír) como aquel desperdicio que es generado por fritura de alimentos, principalmente en servicios proveedores de éstos, pero además en casas de familia y la industria de alimentos. Siendo su constitución física: líquida, semisólida o sólida. Los mayores constituyentes de estos desechos son: triglicéridos y ácidos grasos libres (de aceites y grasas domésticos de ambos orígenes vegetal y animal), agua y residuos de alimentos (1,5%) (UNEP, 2001).

3.2.- Generación de Aceites de desecho

El aceite al ser empleado en frituras cumple una doble función, pues actúa como medio de transmisión de calor y como ingrediente del producto frito al ser absorbido por éste (De La Cruz y Huamán, 2002).

Los aceites vegetales residuales provienen en mayor proporción de este proceso de fritura, ya que incluso en el caso de las papas fritas tipo "chips"; que son el alimento que mayor cantidad de aceite absorbe durante su fritura, se desecha alrededor de un 65% de la cantidad inicial de aceite utilizado (Fedeli, 1998)

Más de 400 000 toneladas de aguas residuales conteniendo lípidos es descargado cada año en Japón, y cerca del 75 % de estas aguas residuales provienen de la industria de alimentos y de restaurantes (Yada *et al.*, 2001)

En Perú, el consumo de aceites vegetales se realiza a nivel industrial, comercial y doméstico. En la ciudad de Lima existen diversos establecimientos como pollerías, restaurantes de frituras de carne de cerdos ("chicharronías"), restaurantes de comida china ("chifas"), etc.; en donde se usan aceites vegetales para frituras de alimentos. En la mayoría de estos lugares, dichos aceites son reutilizados una y otra vez hasta

llegar a generar benzopirenos y otros hidrocarburos aromáticos (De La Cruz y Huamán, 2002), reportados como cancerígenos.

3.3 .- Gestión de los Aceites de desecho.

Según la información disponible, algunas opciones para la gestión de aceites de desecho son la reutilización y regeneración, craqueo térmico, incineración o utilización como combustible. Hay que señalar que en muchos países también se practica el vertido y la quema a cielo abierto (Fiedler, 2005)

La recolección de aceites y grasas comestibles es seguida por un proceso de acondicionamiento (separación del agua y residuos) antes que tome lugar la verdadera operación de reciclaje. Durante el proceso de acondicionamiento de 1000 kg de aceite comestible usado, 850 kg de aceite sirven para un nuevo reciclaje, 140 kg de grasa para recuperación de energía y 10 kg de residuos son generados para eliminar. (UNEP, 2001).

En el Perú, existe un estudio acerca de la gestión de los aceites de desecho realizado por el Instituto de Promoción del Desarrollo Sostenible (IPES), el cual reveló que el 25% del aceite usado comestible procedente de restaurantes de comida rápida y procesados de pollo (“pollerías”) del distrito de Villa El Salvador (Lima) vendía los aceites a lugares de crianza informal de cerdos, y el restante 75% lo arrojaban por el desagüe y/o al suelo (IPES, 2002).

Un ejemplo de mala gestión de los aceites de desecho se reportó luego de una evaluación ambiental a una empresa extractora de aceite de palmiste, soya y semillas de algodón localizada en la ciudad ecuatoriana de Manta. Donde se identificó que esta planta descargaba diariamente todo su efluente al mar que contenía más de 3000 litros de aceite vegetal por día (OIKOS, 1998), ocasionando un grave daño al ecosistema marino.

3.4.- Aceites y Grasas

Los triglicéridos son tri-ésteres de glicerol y tres ácidos grasos. Estos están clasificados como aceites (lípidos que son líquidos a temperatura ambiente) o grasas (lípidos que son sólidos a temperatura ambiente) y son componentes comunes de los alimentos. Otros tipos de lípidos en alimentos comprenden los ácidos mono y di-ésteres de glicerol llamados monoglicéridos y diglicéridos, respectivamente; los cuales son generados comúnmente durante la descomposición de las grasas y aceites. Los triglicéridos tienen una muy baja solubilidad, mientras la solubilidad de mono y diglicéridos pueden ser mayores. La hidrólisis de enlaces éster de tri-, di-, y monoglicéridos (lipólisis) libera ácidos grasos libres. En alimentos, tal lipólisis es provocada generalmente por microorganismos lipolíticos productores de las enzimas conocidas como lipasas (APHA, 2001)

3.5.- Microorganismos lipolíticos

Los microorganismos lipolíticos han sido estudiados inicialmente por Huss, H., en 1908, quien aisló como el causante de la rancidez de la leche a una bacteria a la que denominó *Bactridium lipolyticum*.

Muchos microorganismos como hongos filamentosos, bacterias y levaduras son conocidas como buenos productores de lipasas. Dentro de los más investigados destacan: *Fusarium solani* (Maia *et al.*, 2001) *Penicillium restrictum* (Freire *et al.*, 1997; Gombert *et al.*, 1999), *Penicillium citrinum* (Miranda *et al.*, 1999), *Penicillium chrysogenum* (Ferrer *et al.*, 2000), *Rhizopus arrhizus* (Elibol y Ozer, 2002; Mahadik *et al.*, 2002), *Rhizopus oligosporus* (Ul-Haq *et al.*, 2002), *Aspergillus níger* (Kamini *et al.*, 1998; Mahadik *et al.*, 2002), *Candida rugosa* (Rao *et al.*, 1993; Benjamín y Pandey, 2001), *Yarrowia lipolytica* (Corzo y Reva, 1999, Domínguez *et al.*, 2003), *Rhizomucor pusillus* y *Rhizopus rhizopodiformis* (Cordova *et al.*, 1998).

Se ha reportado el aislamiento primario de microorganismos lipolíticos a partir de efluentes de curtiembres (Alcarraz *et al.*, 2005). Pero, en nuestro país el interés por

éstos microorganismos esta limitado al control de la calidad microbiológica en alimentos, sean de naturaleza vegetal o animal, y su relación con los procesos de descomposición de ellos.

Para la Biodegradación de aceites se puede usar biosurfactantes y/o microorganismos biodegradadores. Los biosurfactantes disminuyen la tensión superficial de las interfases aceite / agua, permitiendo su separación en fases distintas y la posterior recuperación de los hidrocarburos. Si se diseña para los microorganismos biodegradadores la correcta combinación de nutrientes y oxígeno permitirá romper las cadenas químicas de hidrocarburo y desactivar sus propiedades (Castro, 2005).

3.6.- Métodos de aislamiento

Los criterios para la detección de microorganismos lipolíticos son dependientes de factores como el crecimiento de los microorganismos, la producción y/o liberación de lipasas, la actividad y especificidad del substrato de la lipasa y sensibilidad de detección de la actividad de lipasa.

Un gran número de substratos han sido usados para la detección de microorganismos lipolíticos, entre estos substratos están las grasas animales y aceites vegetales, también triglicéridos sintéticos como tributirin y trioleina, y otros esterres sintéticos como los Tween (esterres de sorbitan polioxietilenado) y esterres de metilumbeliferil (Shelley *et al.*, 1987)

Existen métodos usando tintes indicadores, siendo los más populares: Victoria Blue, Night Blue y Nile Blue Sulphate. Estos tintes son incorporados al medio, siendo el más usado de los tintes Victoria Blue (Shelley *et al.*, 1987).

Con la liberación de ácidos grasos libres los tintes cambian de color indicando actividad lipolítica; sin embargo se han reportado problemas de toxicidad de estos tintes (Fryer *et al.*, 1967). Para superar estos problemas Rath en 1961, hizo crecer los microorganismos por 3 días a 30°C en Agar Nutritivo, luego se cubrió el agar con

Victoria Blue Grasa de Leche (VBMF). Las placas fueron leídas después de 3 a 6 días de la incubación a 22°C. Aunque este método ha sido ampliamente aceptado, ello tiene dos principales desventajas: fundamentalmente las colonias lipolíticas no pueden ser aisladas para futuros estudios y la actividad lipolítica de los microorganismos no puede ser seguida desde el comienzo de la incubación (Fryer *et al.*, 1967).

También se han desarrollado métodos directos como la observación de zonas claras y turbias alrededor de la colonia, o la formación de cristales dentro de gotitas del substrato sobre la superficie del agar (Shelley *et al.*, 1987).

Tributirin, es el substrato emulsificado más ampliamente usado. Es un substrato conveniente debido a su relativa fácil incorporación en el medio de agar y la claridad de las reacciones de hidrólisis producida. Las lipasas hidrolizan el tributirin a dibutirin, monobutirin, glicerol y ácido butírico, todos ellos solubles en agua, producen una zona clara alrededor de la colonia lipolítica en la emulsión opaca (Shelley *et al.*, 1987).

La British Standard Institution, en 1968, aceptó el procedimiento basado en 1% Agar tributirin, como método estándar para la detección de microorganismos lipolíticos en manteca. También el American Public Health Association (APHA), en su cuarta edición del 2001, ha incorporado el uso de tributirin al 1% como método para el recuento de microorganismos lipolíticos.

3.7.- Uso de Tweens.

Los Tweens han sido probados como substrato para lipasas de diferentes microorganismos. Los tweens son altamente solubles y son esteres de ácidos grasos de un polioxialquileno derivado de sorbitan; ellos difieren solamente en el particular componente de ácido graso. Tween 40 es un éster de ácido palmítico, Tween 60 es un éster de ácido esteárico y Tween 80 es un éster de ácido oléico. Los Tweens son estables en diluciones alcalinas y soluciones ácidas minerales. Además de ser virtualmente neutros y no-volátiles tanto como estables al calor (Sierra, 1956).

Si los microorganismos son probados con los Tweens como sustrato y tienen una actividad lipolítica, entonces un halo opaco puede ser observado alrededor de la colonia. Cuando se estudió microscópicamente estos halos opacos arrojaron consistencia de cristales. Los diferentes Tweens pueden ser distinguidos uno de otro por sus cristales característicos formados en los halos. (Sierra, 1956).

Las ventajas de los Tweens son:

- a) Provee un contacto óptimo entre las células y el sustrato.
- b) Puede ser usado para ensayos de especificidad de sustratos, por que es conocida su composición.
- c) Se observan directamente zonas visibles de hidrólisis, así se evita el uso de tintes potencialmente tóxicos (Sierra, 1956).

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

También se ha sugerido que el Tween 80 debería ser usado como sustrato para esterazas y Tween 85 (Trioleato de sorbitán polioxietileno) debería ser usado para lipasas (Lyle von Reissen, 1957). Sin embargo, Shelley (1985), reportó que no hubo ventajas en usar Tween 85 comparado con Tween 80 para aislados lácteos.

Investigando la actividad enzimática de bacterias endofíticas, se ha modificado el método de Sierra (1956) en la determinación de actividad lipolítica, el Tween 80 fue sustituido por Tween 20, observándose halos claros alrededor de las colonias (Ivonilde *et al.*, 2006).

3.8.- Lipasas

Las enzimas son clasificadas y codificadas por la NC-IUBMB (Nomenclatura Comitee of the Internacional Union of Biochemistry and Molecular Biology) de acuerdo con la reacción catalizada. La nomenclatura utiliza una abreviación E.C. (Enzyme Comisión) seguido de hasta 4 dígitos referentes a la clase y subclase a la que pertenece la enzima.

Lipasa es el nombre genérico para un grupo de enzimas pertenecientes a la clase hidrolasa (E.C. 3.1) y que actúan sobre ligaciones éster (E.C. 3.1.1).

Dentro de este grupo, destacan las “verdaderas lipasas” conocidas químicamente como triacilglicerol lipasas (E.C. 3.1.1.3), cuya definición clásica describe a estas enzimas como glicerol éster hidrolasas que actúan sobre ligaciones éster presentes en acilglicérols, liberando ácidos grasos y glicerol (Jaeger *et al.*, 1994), constituyendo esta enzima lipasa una clase especial de carboxil éster hidrolasas (carboxilesterasas)

La reacción típica catalizada por las lipasas en un medio acuoso es la hidrólisis de éster. Esta reacción ocurre vía hidrólisis secuencial de los grupos acilo en los glicéridos, de tal forma que en un momento dado la mezcla de reacción no sólo contiene triglicéridos, agua, glicerol y ácidos grasos, sino también diglicéridos y monoglicéridos (Figura 1)(Gandhi, 1997; Haraldsson, 1991).

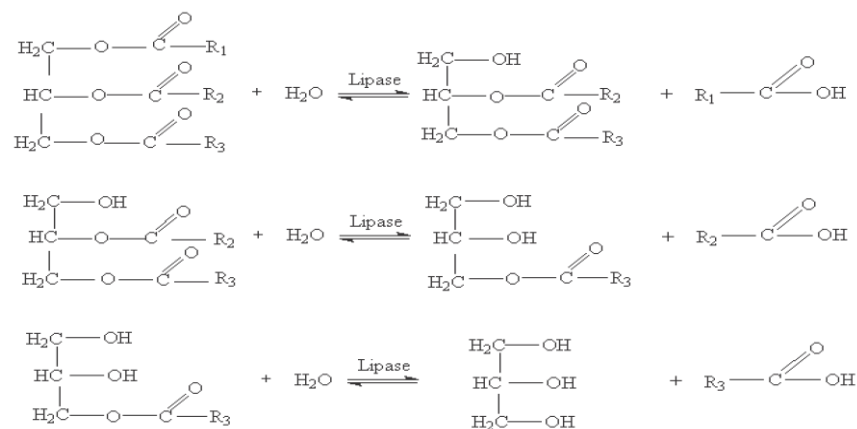


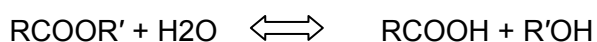
Figura 1 : Hidrólisis secuencial de los grupos acilo de los triglicéridos, catalizada por las lipasas

Se ha estudiado la actividad de lipasas utilizando triglicéridos diferentes como sustratos: una de cadena corta (tributirina) y otros de cadena larga (trioleina) previamente emulsificados, llegándose a medir su actividad basado en la valoración continua de los ácidos grasos liberados en el transcurso de la hidrólisis (García, 2005).

Las lipasas han sido extensamente caracterizada con respecto a su capacidad de hidrólisis y síntesis, además de su enantioselectividad a través de sustratos artificiales, tales como ácidos carboxílicos, alcoholes y aminos (Jaeger y Eggert, 2002).

Las dos principales categorías en las cuales las lipasas catalizan reacciones (hidrólisis y síntesis) puede ser clasificado de la siguiente manera:

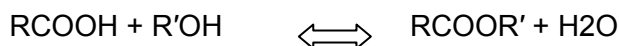
(i) Hidrólisis:



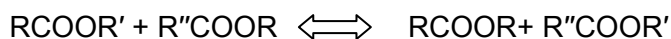
(ii) Síntesis:

Las reacciones bajo esta categoría pueden ser separados como:

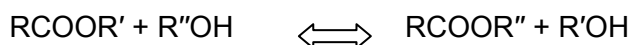
(a) Esterificación



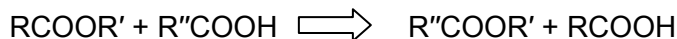
(b) Interesterificación



(c) Alcoholisis



(d) Acidolisis



Las tres últimas reacciones son frecuentemente agrupadas juntas dentro de un sólo término conocido como transesterificación (Gandhi, 1997)

Las lipasas microbianas presentan una serie de ventajas comparadas a las de origen animal y vegetal, una vez que las enzimas son extracelulares en su gran mayoría, son fácilmente separadas del micelio por filtración o centrifugación (Essamri et al., 1998), el proceso puede ser fácilmente conducido (Jesus et al., 1999).

Las lipasas poseen alta velocidad de síntesis y alto rendimiento de conversión de substrato en producto (Leal, 2000).

La lipasa de *Penicillium restrictum* mostró un alto nivel de actividad catalítica hacia los triglicéridos de cadena larga y mediana (Jesus et al., 1999).

La hidrólisis de aceite de palma ha sido investigada para la obtención de mono y diacilgliceroles empleando preparaciones de lipasas de fuentes microbianas (*Candida rugosa*), vegetal (germen de trigo) y animal (páncreas de cerdo). Entre estas lipasas, las tasas de conversión de hidrólisis más elevadas fueron obtenidas con la lipasa de *Candida rugosa*, con actividad óptima a 37°C y pH: 7.5 (Khor et al., 1986).

La estabilidad de lipasas microbianas en presencia de solventes orgánicos es una característica que ha sido ampliamente investigada (Essamri et al., 1998 y Maia et al., 1999), pues ello puede posibilitar la realización de reacciones donde el agua no es un buen solvente.

La actividad de la lipasa de *R. oryzae* micelio se ha estudiado en solventes hidrofóbicos como: alcanos, acetona, éter y cloroalcanos (Essamri et al., 1998).

La síntesis de ésteres de largas cadenas de ácidos grasos por medio de alcoholisis química de aceites y grasas, y por esterificación de ácidos grasos con alcoholes esta bien establecida (De et al., 1999)

Varios tipos de alcoholes de cadena primaria, secundaria, recta y ramificada pueden ser empleadas en transesterificación usando lipasas como catalizadores (Linko et al., 1998; De et al., 1999; Selmi y Thomas, 1998; Breivik et al., 1997, Wu et al., 1999; Nelson et al., 1996)

En la conversión de grasas de ésteres de alcohol (C4-C18:1) usando lipasa inmovilizada de *Mucor miehei* (Lipozyme IM-20) en un sistema libre de solvente se ha obtenido porcentaje de conversión molar de todos los correspondientes alcohol ésteres desde 86,8 a 99,2% (De et al., 1999).

Se ha investigado la capacidad de lipasas de lograr transesterificación con cortas cadenas de alcohol para dar alquil ésteres. La lipasa de *M. miehei* fue la más

eficiente para convertir triglicéridos a sus alquil éster con alcoholes primarios, mientras que la lipasa de *Candida antarctica* fue la más eficiente para transesterificación de triglicéridos con alcoholes secundarios para dar alquil ésteres ramificados (Nelson *et al.*, 1996).

La conversión del aceite de semilla de palma a alquil ésteres usando lipasas de *P. cepacia* con etanol genera altas concentraciones de 72%, mientras solo el 15% de metilesters fue obtenido con metanol: metanolisis (Abigor *et al.*, 2000).

Se ha estudiado las reacciones de metanolisis usando lipasas extracelulares, encontrándose que la lipasa inmovilizada de *C. antarctica* (Novozym 435) fue la más efectiva para la metanolisis entre las lipasas investigadas (Shimida, *et al.*, 1999).

Las lipasas son enzimas termoestables (Corzo y Revah,1999, y Sharma *et al.*, 2001). Además, presentan versatilidad y simplicidad en la manipulación ambiental y genética de su capacidad productiva (Sharma *et al.*, 2001).

3.8.1- Especificidad de Lipasas:

Las enzimas pueden ser clasificadas por el tipo de reacción catalizada o su especificidad.

La especificidad es una diferencia comparativa en porcentaje de catálisis de ciertas reacciones. Después que una enzima ha sido identificada como una lipasa, varias especificaciones dentro de la clase se han identificado o puede esperarse que ocurra (Jensen *et al.*, 1983).

Los tipos de especificidad de las lipasas están en función a los siguientes factores:

- a) Substrato, evidenciado por los diferentes porcentajes de lipólisis de tri-,di-, y monoglicéridos por la misma enzima (ejm. lipasa pancreática); también observado para las enzimas separadas de un mismo origen para tri-,di-, y monoglicéridos (ejm. lipasas lipoproteína de plasma postheparina)
- b) Preferencia por la posición del grupo ester: esteres primarios (ejm. Lipasa

pancreática), ésteres secundarios (ejm. lipasa de *Geotrichum candidum*) y para ésteres no específicos o hidrólisis aleatoria (ejm. lipasa de *Candida cylindracea*)

c) Preferencia por los tipos de ácidos grasos, sean éstos de cadena corta, etc (ejm. esterasa pregástrica, lipasa de *G. candidum*).

d) Estereoespecificidad, observado por la hidrólisis rápida de un éster *sn* primario comparado al otro.

e) La combinación de a) – d) (Jensen *et al.*, 1983)

Kaieda, *et.al*, en 2001 y 1999, investigó la metanolisis de aceite de soya con lipasas de región no específica y de región 1(3), en cada año respectivamente, en un sistema conteniendo agua sin un solvente orgánico. Entre las lipasas de región no específica, estas provienen de *C. rugosa*, *P. cepacia* y *P. fluorescens*; las cuales exhibieron significativamente alta capacidad catalítica.

La lipasa de *Rhizopus oryzae* 1(3)-región específica han demostrado ser efectiva para la metanolisis de aceite de soya (Scheib *et al.*, 1998).

3.9.- Esterasas

Las esterazas (E.C. 3.1.1.1), que muchas veces son difíciles de diferenciar de las lipasas, son otra clase de carboxil ester hidrolasas ampliamente distribuidas en la naturaleza, pues actúan esencialmente catalizando la hidrólisis de ésteres. Sin embargo, su actividad enzimática está restringida a la hidrólisis de ligaciones éster en sustratos solubles en agua (Alvarez-Macarie *et al.*, 1999)

La característica particular de las esterazas, es que atacan sustratos solubles o parcialmente solubles en agua como son los ésteres simples, monoglicéridos, y el Tween, estos sustratos son fáciles de preparar y producen zonas más agudas que cuando se emplean lípidos verdaderos. La hidrólisis de estos compuestos indica la actividad de la esteraza, no la actividad verdadera de la lipasa (APHA, 2001).

3.10.- Fosfolipasas

Las fosfolipasas son otras de las enzimas hidrolizantes de lípidos, las cuales convierten los fosfolípidos, componentes primarios de la membrana celular, a ácidos grasos libres, lisofosfato, mono- y diglicéridos, glicerolfosfatidos, y materiales más sencillos. La detección de fosfolipasa no es tema del presente estudio, pero cabe notar, que en algunos casos la presencia de fosfolipasas estimularía la actividad de una lipasa. (APHA, 2001).

3.11.- Diferencias entre Lipasas y Esterasas

El problema de la diferenciación entre lipasas (E.C.3.1.1.3) y esterases (E.C.3.1.1.1) ha sido investigado por varios autores y aun existen controversias. Se han definido las lipasas a partir de su característica cinética: la propiedad de activación en presencia de sustratos insolubles en agua y emulsionados, o sea, en presencia de una interfase lípido/agua. Las lipasas serían activadas en presencia de ésteres emulsionados, en cambio, las esterases no presentan esta activación, ejerciendo su función hidrolítica sobre sustratos solubles en agua. (Gomes, 2004).

Las verdaderas lipasas manifiestan máxima actividad hacia triglicéridos de cadena larga insolubles en agua, y sobre varios tipos de fosfolipasas (Arpigniy y Jaeger, 1999)

La diferencia entre lipasas y esterases también se puede explicar por esa especificidad preferencial de sustrato de las dos enzimas. Los sustratos naturales para lipasas son aceites y grasas conteniendo triacilglicérols constituidos de ácidos grasos de cadena larga, o sea, uniones éster triples, mientras las esterases actúan sobre uniones éster únicas, liberando ácidos grasos de baja masa molar (Bier, 1955; Brockman, 1984). Además, se debe enfatizar que la mayoría de las lipasas pueden hidrolizar los sustratos de esterases, en cambio lo inverso no es verdadero (Jaeger *et al.*, 1999)

3.12.- Tecnología de Catálisis Enzimática

Se ha considerado usar células completas en los procesos de biocatálisis, estas células requieren ser inmovilizadas, de tal forma que ellas asemejen a la catálisis ordinaria de fase sólida usada convencionalmente en reacciones sintéticas. Existen muchos métodos de inmovilización, una de las técnicas disponibles es usar poros de partículas de soporte de biomasa (BSPs), desarrollada por Atkinson *et al.*(1979), y ello tiene varias ventajas por sobre otros métodos en términos de aplicación industrial, algunas de ellas son:

- a).- Aditivos químicos no son requeridos.
- b).- No hay necesidad de pre-producción de células.
- c).- La manipulación aséptica de partículas no es necesario.
- d).- Hay mayor porcentaje de transferencia de masas y producción dentro de BSPs.
- e).- Las partículas son reusables.
- f).- Las partículas son durables en contraste al mecanismo de corte.
- g).- Bioreactor scale-up es fácil.
- h).- Los costos son bajos comparados a otros métodos (Fukuda *et al.*, 2001).

Se ha investigado las condiciones de cultivo para la producción de lipasa, utilizando células de *Rhizopus oryzae* inmovilizadas dentro de BSPs, además el efecto del pre-tratamiento de células y el contenido de agua en la reacción de metanolisis. Como resultado, cuando la metanolisis fue llevada a cabo usando células inmovilizadas en BSP en presencia de 10-20% de agua, el contenido de metil esterés en la reacción alcanzó de 80 a 90% sin ningún pretratamiento con solvente orgánico (Ban, *et al.*, 2001).

3.13.- Uso comercial de Enzimas

Con un mercado creciente y promisorio, la mayor parte de la producción de enzimas esta destinada a las industrias de detergentes y almidón. Se estima que el mercado mundial de enzimas bordea aproximadamente US\$ 1355 millones por año (Shanley, 1998).

En cuanto al número de compañías que comercializan enzimas esta próximo al millar, el número de productores es muy inferior. En los EEUU y parte oeste de Europa, existen apenas cerca de 30 industrias productoras de enzimas. Cerca del 90% de la producción anual proviene de las mayores empresas productoras de enzimas, como Novozymes con sede en Dinamarca, Gist Brocades, en Holanda; Amano, en Japón; Solvay, Pfizer y Genecor , en los EEUU (De Castro *et al.*, 2004).

3.14.- Uso comercial de Lipasas

Las lipasas pueden ser obtenidas de orígenes diversos. Se ha reportado la disponibilidad comercial de las lipasas obtenidas a partir de 34 diferentes fuentes, incluyendo 18 a partir de hongos y 7 de bacterias (Jaeger y Reetz, 1998).

Dentro del grupo de bacterias productoras de lipasa, comercialmente están disponibles las enzimas de *Pseudomona sp.*, *Pseudomonas fluorescens*, *Burkholderia* (anteriormente *Pseudomona*) *cepacia* para la aplicación en síntesis quirál, y las lipasas de *Burkholderia sp* y *Arthrobacter sp* utilizadas para diagnostico de triglicéridos (Gomes, 2004)

Los hongos de diversos géneros demostraron ser buenos productores de lipasas y sus enzimas están siendo utilizadas bajo el punto de vista académico e industrial. Por ejemplo, lipasas de *Aspergillus níger*, *Aspergillus orizae*, *Mucor javanicus*, *Rhizopus niveus*, *Rhizopus orizae*, *Penicillium camembertii*, *Penicillium roqueforti* y de la levadura *Candida rugosa*, están siendo comercializadas actualmente por Amano Europe Enzyme Ltd, UK, para procesamiento de aceites, grasas y quesos,

para la determinación de triglicéridos, como aditivo en preparaciones digestivas y para síntesis quirál (Gomes, 2004)

Las lipasas (E.C. 3.1.1.3) tienen aplicación comercial de facilitar la eliminación de la suciedad de naturaleza grasosa, a pesar que son idóneas para este tipo de productos, su uso no está tan extendido como el de las proteasas y celulasas. (García., 2005).

Actualmente el mayor consumidor de lipasas es la industria de formulación de detergentes (Novo Nordisk, 1995 y Jaeger *et al.* 1998) en la que es usada generalmente en combinación con proteasas y celulasas, permitiendo la remoción de manchas de aceites. La enzima Lipolasa (*Humicola lanuginosa* lipase-Novozymes) es empleada en la formulación de un gran número de marcas de importantes detergentes en todo el mundo (De Castro *et al.*, 2004).

Además del uso en la industria de detergentes, las lipasas están teniendo nuevas aplicaciones en los más diversos campos tales como la industria farmacéutica, química fina, cosméticos, oleoquímicos, cueros, pulpa de celulosa, papel, y en el tratamiento de residuos industriales (De Castro *et al.*, 2004)

Los campos de aplicación de lipasas tiene buenas perspectivas en la industria alimentaria, tal es así que en la industria de panificación el uso de lipasas 1,3-especifica, tienen un excelente efecto acondicionador de masa, facilitando su uso en máquinas convencionales de la industria de panificación. Además de eso, aumenta el volumen del pan, mejora la textura de la miga y confiere también un color más blanco. En esta aplicación, las lipasas degradan los lípidos del trigo, modificando su interacción con el gluten, permitiendo que el gluten obtenga una red más fuerte y más elástica (Qi, 1997).

También en la producción de salchichas fermentadas, la aplicación de lipasas de *Rizomucor miehei* presenta aspectos económicos positivos, ya que permite la disminución del tiempo de maduración manteniendo las características analíticas y sensoriales. (Pandey *et al.*, 1999)

El uso de lipasas también ha sido aplicado para la degradación biológica, y remoción de carga lipolítica de efluentes industriales generados en frigoríficos, mataderos, industrias lácteas y alimentarias en general (Gandhi,1997; Pandey *et al.*,1999; Lie y Molin, 1991). En este contexto, los procesos alternativos que facilitan la recuperación o disminución de carga de grasa de efluentes son de extremo interés para la industria.

Un tratamiento preliminar de estos efluentes por medio de la acción de lipasa, concluyó que reduce la proporción de lípidos, el diámetro de las partículas de grasas en hasta 60% y el tiempo de permanencia de los efluentes en los lagos de estabilización (Leal *et al.*, 2002 y Masse *et al.*, 2001).

Estudios recientes de aplicación de lipasas se están dando también para la generación de energía como es la producción de biocombustibles, que son alternativos al diesel de petróleo, hechos a partir de aceites vegetales. El uso de lipasas para la producción de Biodiesel es una tecnología reciente, cuyo estudio, desarrollo y optimización esta tornándose de interés creciente como lo confirman trabajos realizados por Goodrum y Eiteman (1996), y Fukuda *et al.* (2001)

3.15.- Lipasas y Biodiesel

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

Las semillas de *Jatropha* (Euphorbiaceae), la cual es un género que comprende 70 especies que crecen en ciudades tropicales y subtropicales, son reportados que contiene actividad de lipasas, las cuales podrían catalizar reacciones de transesterificación (Staubmann *et al.*,1999). Es interesante mencionar también que los aceites de semillas de *Jatropha* fue usado durante la segunda guerra mundial

como combustible sustituto al diesel. Últimamente, sus mezclas con combustible diesel han sido probadas (Pramanik, 2003).

El interés en la investigación de triglicéridos como: tributirín (C4:O), tricaproín (C6:O), tricaprylín (C8:O) y tricaprín (C10:O) como sustratos para lipasas esta siendo resaltada ya que éstos son componentes potenciales de futuros combustibles diesel derivados de plantas (Goodrum y Eiteman, 1996).

3.16.- Perspectivas de las lipasas.

Las aplicaciones comerciales de las lipasas reportan que estas enzimas aisladas o purificadas poseen un número de propiedades que tornan su uso atractivo como catalizador en biotransformación, tales como alta eficiencia catalítica (pueden elevar la velocidad de reacción de 108 a 1012 veces), selectividad, actuación en condiciones blandas de temperatura (30 a 70°C) y en presión atmosférica (Dixon *et al.*,1979 y Novo Nordisk ,1995).

El aislamiento y selección de microorganismos lipolíticos es un primer paso importante en la posterior purificación y aplicación de la tecnología enzimática de lipasas capaces de catalizar procesos como la transesterificación de triglicéridos presentes en aceites y grasas y su bioconversión en Biodiesel.

Fukuda *et al.*(2001), sostiene que las enzimas extracelulares o intracelulares empleadas en la Bioconversión deben ser purificadas por procedimientos que pueden ser demasiados complejos para usos prácticos. Además, que las enzimas recuperadas a través de tales operaciones son generalmente inestables y caras.

Sin embargo, mediante ingeniería genética se ha logrado que la lipasa cDNA de *Fusarium heterosporum* incrementase su producción por encima de tres veces de la cepa original usando *Saccharomyces cerevisiae* como hospedero (Nagao, *et al.*, 1996). Siendo así, los avances registrados en la tecnología de ADN permitirán a los productores de enzimas colocar en el mercado lipasas microbianas con actividad bien elevada, a un costo más accesible.

Por lo tanto, sigue siendo una alternativa interesante la utilización de catálisis enzimática usando lipasas para el tratamiento de aceites usados. Ello ayudaría en la solución del manejo de los aceites y grasas de desecho, cuya mala gestión ocasiona problemas al medio ambiente (Fiedler, 2005; Yada *et al.*, 2001; IPES, 2002; OIKOS, 1998) y a la salud pública (De La Cruz y Huamán, 2002)

Además, la obtención de productos por transformación microbiana y que sean de uso energético como el Biodiesel, contribuiría también a resolver problemas ambientales, sociales y económicos como son: la contaminación derivada del diesel de petróleo cuya combustión genera emisiones nocivas al medio ambiente y la salud (monóxido de carbono, dióxido de azufre, óxidos de nitrógeno, dióxido de azufre, hidrocarburos, y aldehídos); en lo social, el consumo arraigado hacia los combustibles de origen fósil, cuyo agotamiento ya predecible generará malestar en el consumidor final; y en lo económico, nuestra matriz energética se diversificaría y por lo tanto no dependeríamos de manera importante de las súbitas fluctuaciones del precio del petróleo que es manejado internacionalmente por la Organización de los Países Exportadores de Petróleo (OPEC).

IV.- MATERIALES Y METODOS

4.1.- Recolección y naturaleza de las Muestras:

Se colectaron 100mL de cada muestra en frascos de vidrio estériles. En total se analizaron seis muestras de aceites vegetales de desecho proveniente de frituras y generados en el Comedor Universitario de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

Los aceites residuales generados en dicho establecimiento eran almacenados para luego convertirlos en Biodiesel mediante transesterificación química.

Las muestras que fueron analizadas y al mismo tiempo usadas como substrato para lipasas fueron de la siguiente naturaleza:

Muestra 1 (M1): Aceite vegetal de desecho de composición diversa

Muestra 2 (M2): Aceite vegetal de desecho de composición diversa

Muestra 3 (M3): Aceite vegetal de desecho de soya y palma

Muestra 4 (M4): Aceite vegetal de desecho de composición diversa

Muestra 5 (M5): Aceite vegetal de desecho de soya

Muestra 6 (M6): Aceite vegetal de desecho de composición diversa

Las muestras fueron llevadas al laboratorio S-20 de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (FCB-UNMSM) y analizadas en diferentes momentos durante el lapso de 8 meses aproximadamente.

4.2.- Substrato de lípidos:

En las dos metodologías empleadas en la presente investigación para aislamiento de hongos lipolíticos se tomó de la misma muestra de aceite (M) que es analizada el volumen o el peso correspondiente que sirvió como único substrato de lípidos que fue incorporada al caldo Czapek y los agares respectivos.

Previamente este substrato fue esterilizado 3 veces consecutivas a 121°C por 20 minutos.

4.3.- Método APHA modificado

Corresponde al estandarizado para el recuento de microorganismos lipolíticos en alimentos y propuesta por el American Public Health Association (APHA, 2001), pero modificada para los objetivos de la presente investigación.

Las modificaciones consistieron en probar el éter de petróleo como diluyente alternativo al buffer fosfato (KH_2PO_4) comúnmente empleado. También se disminuyó a la mitad el peso de Agar Plate Count (APC), además de duplicar la cantidad del medio base conteniendo el sustrato de lípidos. Las variaciones se hicieron en función a los valores recomendados por el fabricante.

A esta metodología se denominó: Método APHA modificado (Met. APHA modif.).

4.4.- Método Czapek

Este método consistió en emplear el medio mínimo de sales conocido como Caldo Czapek Dox suplementado con 3% de sustrato de lípidos como única fuente de carbono. Se usó sólo caldo Czapek como diluyente de las muestras; y también se probó emplear el éter de petróleo como un diluyente adicional al caldo Czapek, ello para lograr una mejor emulsión. Luego se sembró en medio sólido de Agar Czapek Dox (3% de sustrato de lípidos)

A esta metodología se denominó: Método Czapek (Met. Czapek)

La capacidad de lipólisis de todas las cepas de hongos aisladas por ambos métodos se probó al sembrarse cada una en Agar Czapek Dox con 3% de sustrato de lípidos (muestra de aceite analizada:M) como única fuente de carbono, a esta prueba se denominó: Ensayo de Lipólisis (P.L.)

4.5.- Uso de Diluyentes.

Se usaron dos tipos de diluyentes para las muestras analizadas: Buffer fosfato y Éter de petróleo que se probaron separadamente en el Met. APHA modif.

El éter se probó también como un solvente adicional al caldo Czapek con la finalidad de lograr un mejor homogenizado de la muestra de aceite analizada con el Met. Czapek

Las muestras analizadas se procesaron también sin ningún diluyente denominándose: muestra pura

A los diluyentes, al caldo Czapek y a las muestras puras procesadas se les asignó las abreviaturas : B , E, C, P1 y P2; donde:

- B : significa Buffer fosfato.
- E : significa Éter de petróleo
- C: significa Caldo Czapek Dox
- P1: significa muestra pura procesada con el Met. APHA modif.
- P2: significa muestra pura procesada con el Met. Czapek.

4.6.- Preparación del inóculo

La preparación del inóculo de las muestras (M) se realizaron usando los siguientes diluyentes y también se procesaron las muestras puras :

4.6.1.- En el Método APHA modificado.

- a) Como diluyente solo buffer más muestra : B+M
- b) Como diluyente solo éter más muestra : E+M
- c) Muestra pura sin diluyente : P1.

4.6.2.- En el Método Czapek

- a) Como diluyente solo caldo Czapek más muestra : C+M.
- b) Como diluyente caldo Czapek más muestra más éter : C+M+E.
- c) Muestra pura sin diluyente : P2.

4.7.- Procedimiento para Método APHA modificado

Se usó la metodología aceptada por el American Public Health Association (APHA, 2001) que emplea el Método de una Sola Capa o Single Layer Method.

Este método consistió en preparar 40 mL de Medio Base (p/v): 1,5 g de agar agar (3,8%) y 5 g (12,5%) del substrato de lípidos.

Se esterilizaron los constituyentes a 121°C por 20 min. y después se homogenizaron en un vaso de licuadora estéril por 3 min. aproximadamente.

Luego, en 280 mL de agua destilada se agregó 3,5 g de Agar Plate Count (APC), se calentó a temperatura moderada en una cocina eléctrica hasta disolver.

Se esterilizó el medio a 121°C por 20 min.

Finalmente, el Medio Base y el APC disueltos se mezclaron en un vaso de licuadora estéril por 3 minutos a velocidad moderada.

Todo este homogenizado se le denomina: Single Layer Medium (SLM) o Medio de una Sola Capa.

4.7.1.- Preparación de la muestra de aceite de desecho

En un tubo de ensayo se agregó 9 mL de un tipo de diluyente sea buffer fosfato (B) o éter de petróleo (E), luego se pesó 1 g de muestra (M) (p/v) que es agregada a cada tubo de ensayo conteniendo los diluyentes respectivos, obteniéndose las diluciones : B+M (10:1) y E+M (10:1)

Se homogenizaron ambos tubos en un Vortex Mixer por 3 minutos.

Se colocó 1 mL de la muestra preparada con buffer fosfato o éter de petróleo en placas petri estériles, respectivamente, y por duplicado. Inmediatamente, se vertió el homogenizado SLM sobre la placa (método por incorporación). Seguidamente la placa se movió con la mano suavemente sobre una base plana hasta lograrse un medio homogéneo.

Se procesó también un volumen de 1 ml de muestra pura (P1) sin diluyente. La muestra pura se agregó también en una placa petri estéril, por duplicado, y se vertió

inmediatamente el mismo homogenizado SLM sobre la placa, al igual que los casos anteriores.

Las placas se incubaron al medio ambiente y se registraron temperaturas promedios máxima de 35 °C y mínima 28 °C. El tiempo de incubación fue no mayor a 15 días, revisándose cada dos días si hubo crecimiento.

4.8.- Procedimiento para Método Czapek

Se preparó 100 ml (p/v) de caldo Czapek (3% con substrato de lípidos): Nitrato de Sodio (0,2 g), Fosfato dipotásico (0.1 g), Sulfato de Magnesio(0,05 g), Cloruro de Potasio(0,05 g), Sulfato Férrico (0,001 g). El pH fue ajustado a 6.3 con Ácido Fosfórico (H_2PO_4) (Koneman *et al.*, 1975)

4.8.1.- Uso de sólo caldo Czapek

En un tubo de ensayo se colocó 9,7 ml de caldo Czapek (C) más 0,3 ml de muestra (M), se obtuvo la dilución: C+M (100:3) (v/v)

4.8.2.- Elección del éter de petróleo como diluyente adicional

La elección del éter de petróleo se hizo de acuerdo a lo recomendado por Grosman (1948),

Además, se consideró el criterio de solvente de compuestos orgánicos al éter de petróleo (solvente lipofílico) con respecto a la solución salina de Czapek debido a que esta última es de naturaleza acuosa (solvente lipofóbico).

4.8.3.- Prueba para determinar el volumen óptimo de éter a usarse.

Para la determinación del volumen óptimo de éter como diluyente adicional al caldo Czapek, se estableció un patrón visual de mejor y peor homogenizado para una muestra de aceite vegetal hecho a base de soya y/o algodón marca Capri (fabricante àlicor S.A.A.) combinándola con éter de petróleo o el medio mínimo de sales Czapek.

Se consideró siempre el 3% de fuente carbonada (en este caso aceite Capri) de acuerdo a lo recomendado para la formulación del medio mínimo de sales: caldo Czapek Dox (Koneman *et al.*, 1975)

El patrón establecido se obtuvo de la siguiente manera:

9,7 mL de éter de petróleo más 0,3 mL de muestra de aceite vegetal: Mejor homogenizado

9,7 mL de medio mínimo de sales Czapek más 0,3 mL de muestra de aceite vegetal: Peor homogenizado

Establecido el patrón, se consideró volúmenes constantes de : 9,5 ; 9,6; 9,7 y 9,8 mL del medio mínimo de sales Czapek combinándose con los diferentes volúmenes posibles de aceite y éter hasta completar 10 mL y se decidió por la mejor emulsión observada.

Se probaron las siguientes proporciones:

Constituyentes	V.cte.Czapek 9,5mL		V.cte. Czapek 9,6mL		V.cte.Czapek 9,7mL		V.cte. Czapek 9,8mL	
	aceite	éter	aceite	éter	aceite	éter	aceite	éter
Volumen probado (mL)	0,4	0,1	0,3	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1
	0,3	0,2	0,2	0,2	0,1	0,1	-	-
	0,2	0,3	0,1	0,3	-	-	-	-
	0,1	0,4	-	-	-	-	-	-

La mejor emulsión correspondió a un volumen constante de 9,6 mL del medio mínimo de sales Czapek y volúmenes de 0,3 mL de aceite y 0,1 mL de éter de petróleo (100:3:1) (v/v/v).

4.8.4.- Uso del Éter de petróleo.

Elegida la mejor proporción para la emulsión del aceite (100:3:1) (v/v/v), se procedió a constituir el medio líquido de la siguiente forma: 9,6 mL de caldo Czapek (C); 0,3 mL de muestra (M) y 0,1 mL de éter de petróleo (E) (100:3:1) (v/v/v).

Se procesó además un volumen de 10 mL de muestra pura (P2) sin diluyente.

Todos los tubos: C+M, C+M+E y P2 se incubaron al medio ambiente durante 15 días y se registraron temperaturas promedio máxima de 35 °C y mínima 28 °C. Diariamente cada tubo fue homogenizado en Vortex por 3 minutos a velocidad máxima.

Luego de este tiempo se inoculó 0,1 mL de cada tubo a su respectiva placa de Agar Czapek con 3% de substrato de lípidos (pH 6,3), se sembró por diseminación con un hisopo de algodón estéril y por duplicado. Se envolvieron las placas con papel Kraft y se colocaron a incubar al medio ambiente registrándose temperaturas promedio máxima de 31 °C y mínima 23 °C, y el porcentaje de humedad relativa promedio máxima fue de 68 % y mínima 55%. El tiempo de incubación fue no mayor a 15 días, revisándose cada dos días si hubo crecimiento.

4.9.- Prueba de Lipólisis.

Los hongos aislados por ambos métodos (Met APHA modif. y Met. Czapek) se sometieron a la Prueba de Lipólisis (P.L.) que consistió en sembrar por puntura cada aislado en Agar Czapek con 3% de substrato de lípidos (pH 6,3). Las placas fueron envueltas con papel Kraft e incubadas a temperatura ambiente registrándose promedios máxima de 31°C y mínima 23 °C .Las placas fueron observadas cada dos días.

Se considera la presencia de hongos lipolíticos en general al evidenciar halos transparentes alrededor de la colonia y/o un desarrollo profuso del hongo sobre el Agar Czapek (3%).

4.9.1.- Determinación de Actividad Lipolítica

La menor actividad de lipólisis se consideró para aquellos hongos que presentaron halos de degradación menores a 1 mm y diámetros de desarrollo de las colonias menores a 0.5 cm.

La mayor capacidad de lipólisis se considera para aquellos hongos que logren la degradación completa del substrato de lípidos incorporado al Agar Czapek (3%), lo que se evidencia con la variación del color lechoso inicial del agar (aspecto que se debe al substrato de lípidos agregado) hacia un color transparente del medio, además de observarse un desarrollo profuso del hongo.

4.10.- Identificación de hongos.

Se empleó la técnica de microcultivo en lámina, la cual consiste en cortar un trozo de Agar Sabouraud Glucosado (ASG) y depositarlo sobre una lámina portaobjeto. Esta lámina se colocó en una placa con un trozo de algodón húmedo estéril.

Con el asa de siembra microbiológica se cogió una porción del hongo crecido en Agar Czapek (P.L.:Prueba de Lipólisis) y se colocó en el centro de uno de los lados del trozo de ASG. Luego se colocó encima del trozo de agar una laminilla cubreobjeto estéril y se incubó durante 6 días.

Pasado ese tiempo, se procedió al montaje de la laminilla cubreobjeto. Con la ayuda de una pinza, esta laminilla se depositó sobre una lámina portaobjeto limpia donde previamente se había colocado una gota del colorante Azul de Lactofenol, se quitó el exceso de colorante con papel toalla y se sella la laminilla con esmalte.

Se hizo las observaciones microscópicas a 10x y 40x

4.11.- Análisis Estadístico del número de hongos lipolíticos aislados

Para la determinación de diferencias entre el número total de hongos lipolíticos aislados por el Método APHA modificado y el Método Czapek se realizó con la

comparación de medias del número total de hongos a través de la prueba de T-Students.

La comparación de medias de los dos grupos independientes: Met. APHA modif. y Met. Czapek, según el número de hongos lipolíticos aislados para cada muestra en su método respectivo se logró con la prueba de Mann Whitney.

La determinación de diferencias significativas del número de hongos lipolíticos aislados de acuerdo al tipo de inóculo utilizado para el Met. APHA modif. : B+M, E+M y P1; y entre los tipos de inóculo del Met. Czapek : C+M, C+M+E y P2; se hizo a través del Análisis de Varianza (ANOVA) y la Prueba de Comparaciones Múltiples de Tukey.

Todos los análisis tuvieron un nivel de confianza del 95%.

V.- RESULTADOS

5.1.- Microorganismos lipolíticos y no lipolíticos:

El número total de aislados fue de 123 cepas.

En el Met. APHA modif. crecieron en el Medio de una Sola Capa (SLM) ; 6, 3 y 9 microorganismos de M2, M3 y M6, respectivamente, que no presentaron actividad degradativa en la Prueba de Lipólisis (P.L.) sobre Agar Czapek (3% de substrato de lípidos). En total fueron 18 microorganismos NO lipolíticos.

El resto de microorganismos que crecieron de las muestras procesadas por el Met. APHA modif. si presentaron actividad lipolítica (Tabla 2, Figura 2)

Por el Met. Czapek, todos los microorganismos que crecieron evidenciaron actividad hidrolítica en la P.L. (Tabla 2)

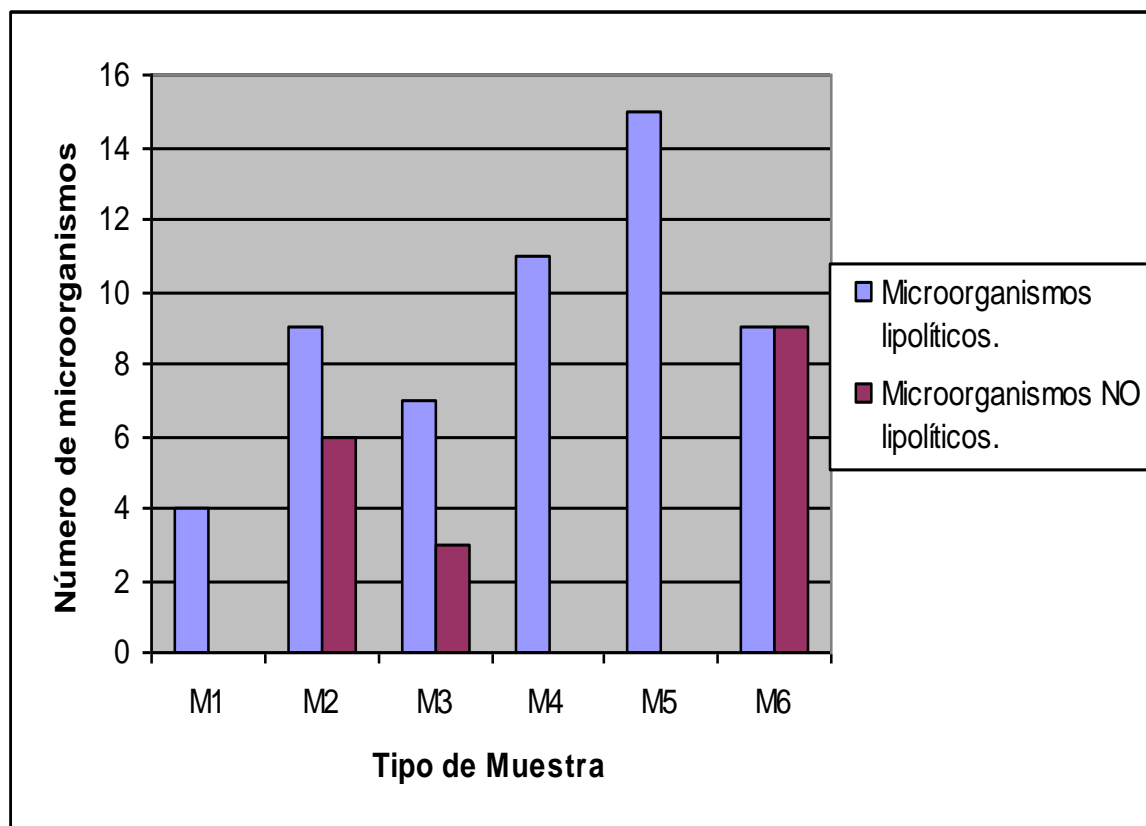


Figura 2: Comparación del número de microorganismos lipolíticos y NO lipolíticos que crecieron en cada muestra por el Método APHA modificado.

5.2.- Número de hongos lipolíticos aislados con el Método APHA modificado.

Por este método se aislaron un total de 55 cepas de hongos lipolíticos (h.l)(Tabla 3, Figura 3)

En M1 y M2 crecieron 2 y 4 h.l, respectivamente, usando buffer (B) como diluyente y ninguno usando éter (E). En M3 y M4 crecieron 4 y 8 h.l., respectivamente, usando B; y usando E solamente creció 1 h.l. para cada muestra. Solo en M5 crecieron similar número de h.l. 7 y 6 usando el B y E , respectivamente.

Cuando no se usó diluyente (P1) crecieron sólo 2 h.l. por muestra, excepto para M2 en donde crecieron 5 h.l. , y la M6 donde no hubo crecimiento.

El subtotal de h.l. aislados en B+M fue de 32, en cambio en E+M fue de solo 10 y el subtotal de h.l. al procesar todas las muestras puras (P1) fue de 13.

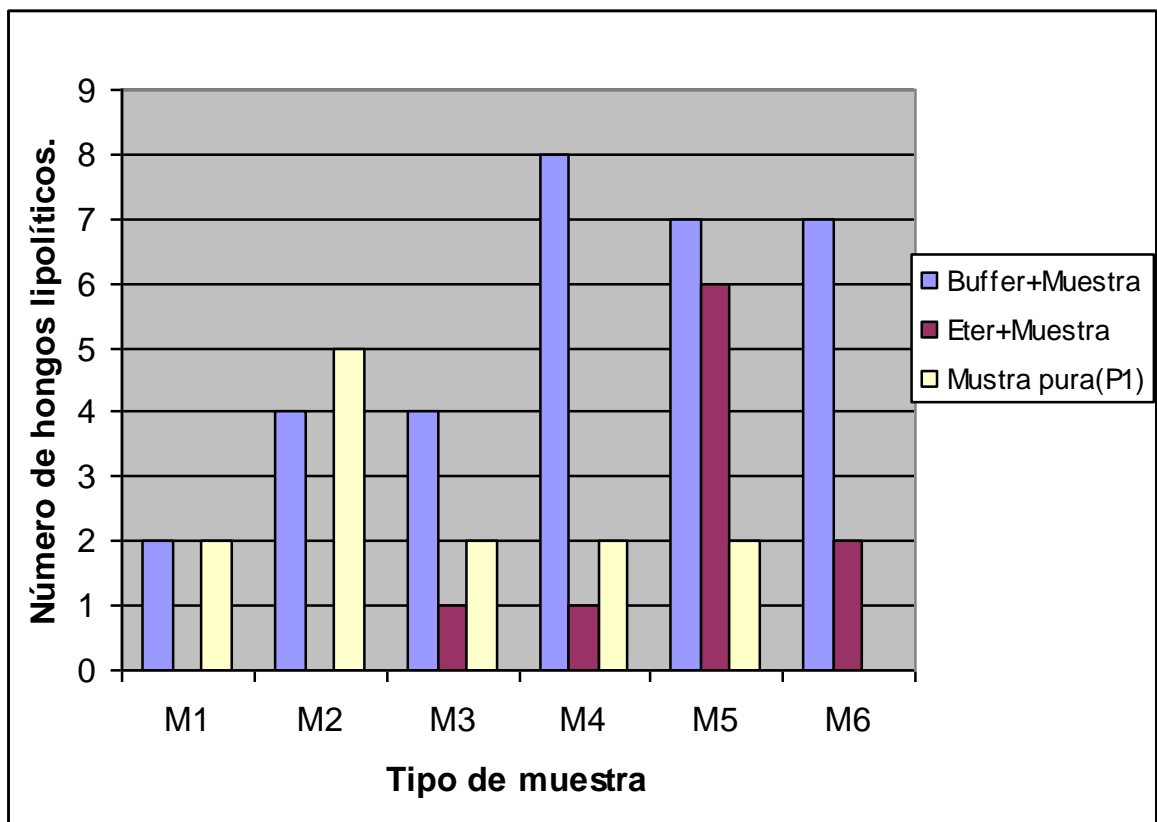


Figura 3: Comparación del número de hongos lipolíticos aislados por muestra usando Buffer fosfato, Éter de petróleo y la muestra pura (P1) empleando el Método APHA modificado.

5.3.- Número de hongos lipolíticos aislados con el Método Czapek:

El total de hongos lipolíticos (h.l.) aislados por este método fue de 50 (Tabla 4, Figura 4)

Usando solo caldo Czapek (C) como diluyente en M1, M2 y M5 crecieron 3 h. l. en cada una; y usando éter (E) adicional crecieron 2, 6 y 5 h.l. para las mismas muestra respectivas. En M6 crecieron 2 h.l. al usar solamente C y 1 h.l. usando E+C .

Para las muestras puras (P2) de M1 y M5 hubo crecimiento de 3 h.l., en cada caso respectivo; y para M2, M3, M4 crecieron 2 h.l., por caso.

El subtotal de h.l. aislados usando solo caldo Czapek como diluyente fue de 20, y de 18 usando éter como diluyente adicional. Además el subtotal de h.l. que crecieron al procesar todas las muestras puras (P2) fue de 12.

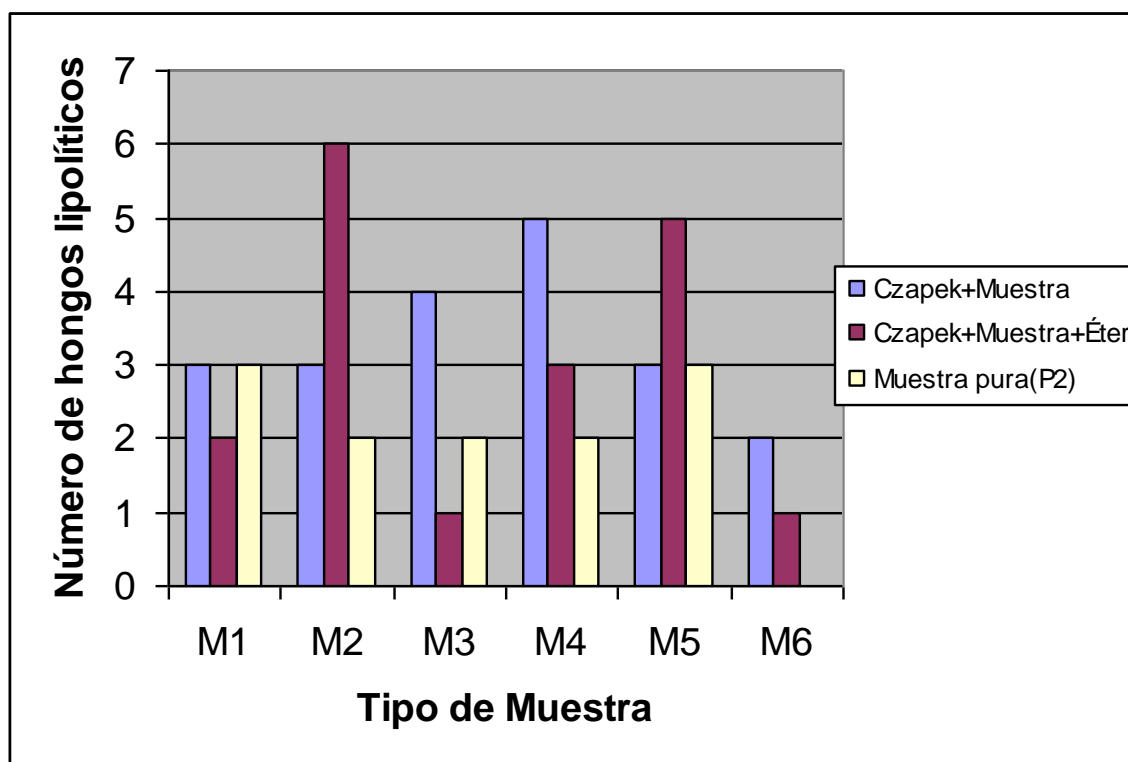


Figura 4: Comparación del número de hongos lipolíticos aislados por muestra usando caldo Czapek, éter de petróleo (como diluyente adicional) y la muestra pura sin diluyente (P2) empleando el Método Czapek.

5.4.- Número de hongos lipolíticos aislados por ambos métodos para cada muestra

El total de hongos lipolíticos (h.l.) aislados por el Met. APHA modif. fue de 55 y para el Met. Czapek fue de 50 (Tabla 3 y 4).

El número de h.l. aislados para M1 y M2 por el método APHA modif. fue de 4 y 9, respectivamente; mientras que con el Met. Czapek se aislaron 8 y 11 h.l., respectivamente (Tabla 3 y 4, Figura 5).

Para M3 se aisló 7 h. l. sea con el Met. APHA modif. o con el Met. Czapek, respectivamente (Tabla 3 y 4 , Figura 5).

Para M4, M5 y M6, la cantidad de h. l. aislados con el Met. .APHA modif. fueron de 11, 15 y 9, respectivamente; y con el Met. Czapek de 10, 11 y 3 hongos, respectivamente (Tabla 3 y 4, Figura 5)

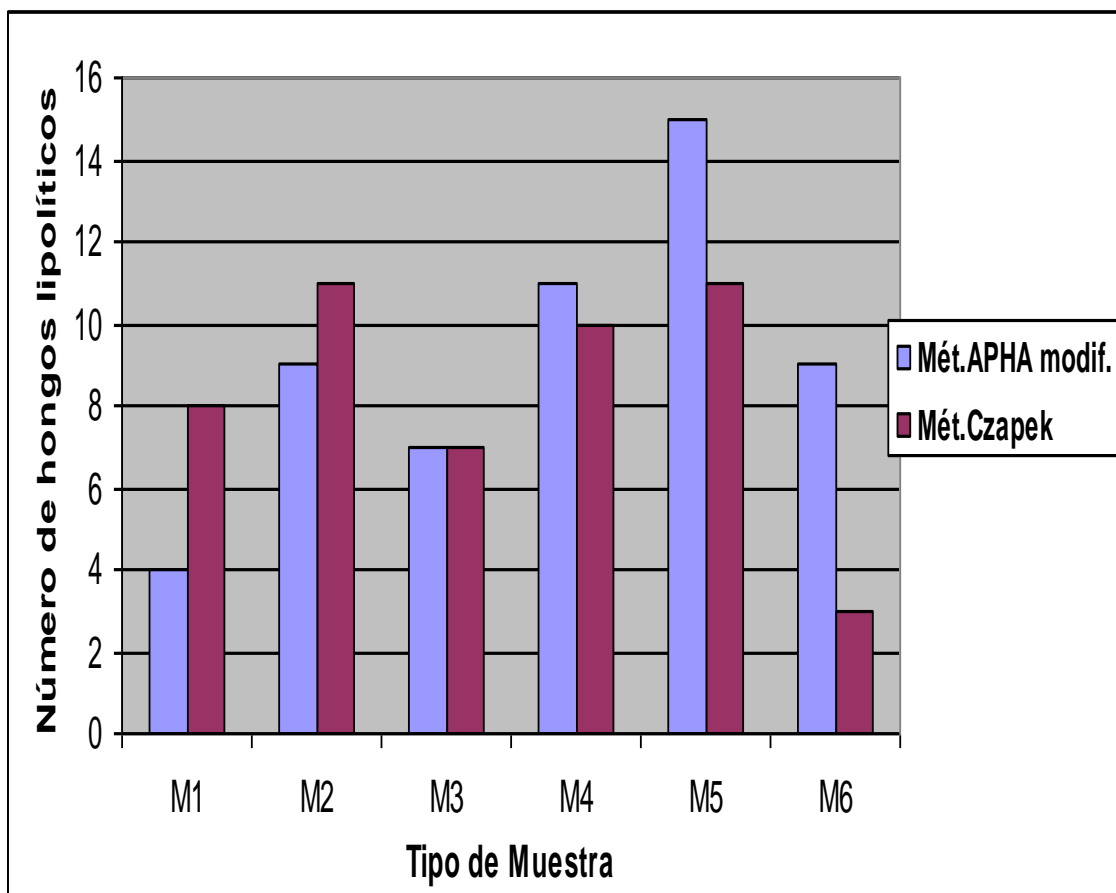


Figura 5: Comparación del número de hongos lipolíticos aislados en cada muestra por Método APHA modificado y Método Czapek.

5.5.-Número de hongos lipolíticos aislados según el tipo de inóculo empleado

Para el Met. APHA modif. se aislaron 32 hongos lipolíticos (h.l.) con el tipo de inóculo B+M, 10 con el inóculo E+M y 13 al procesar el inóculo de la muestra pura (P1) (Tabla 3, Figura 6)

En el caso del Met. Czapek se aislaron: 20 h.l. con el inóculo: C+M , 18 con el inóculo: C+M+E y 12 al procesar el inóculo de la muestra pura (P2) (Tabla 4, Figura 6)

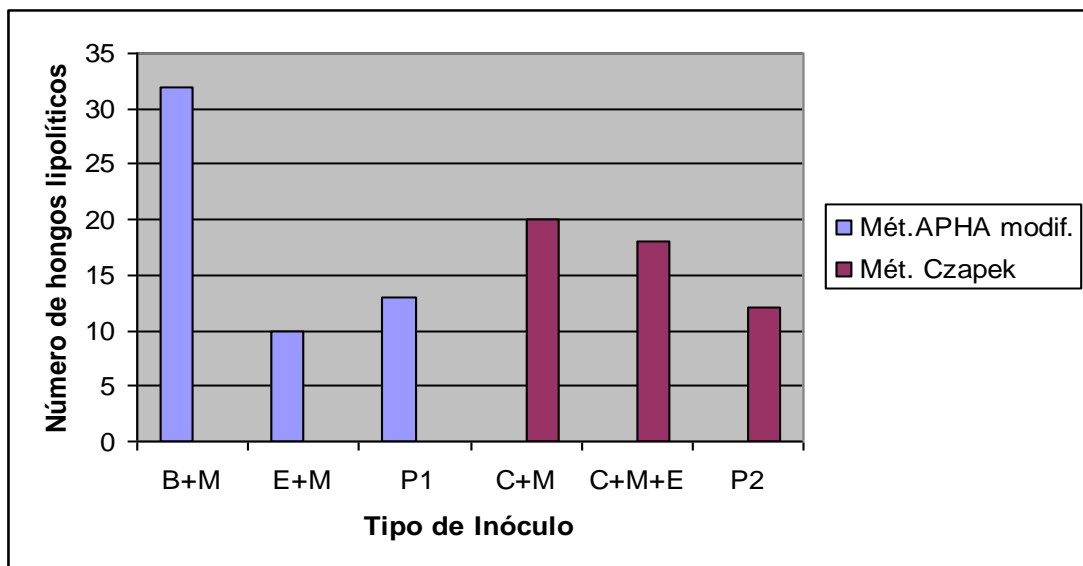


Figura 6: Comparación del número de hongos lipolíticos aislados según el tipo de inóculo empleado.

5.6.- Días de inicio de aparición de halos de degradación de cepas aisladas por el Método APHA modificada

En Medio de una Sola Capa :

En el Met. APHA modif., las cepas aisladas en el Medio de una sola capa o Single Layer Medium (SLM), se observó para M1, M2 y M3 actividad degradativa al 11avo día de incubación en promedio. En cambio, para M4 y M6 se observó actividad degradativa, en ambos casos, al 4to día; y para M5 al 2do día en promedio (Tabla 5 , Figura 7).

En Agar Czapek :

Las cepas aisladas de SLM y que fueron sembradas en A. Czapek con 3% de sustrato de lípidos (P.L.:Prueba de Lipólisis) presentaron actividad de hidrólisis para M1 y M3 al 5to día en promedio para cada caso; en cambio para M5 y M6 al 14avo día en promedio (Tabla 5 , Figura 7).

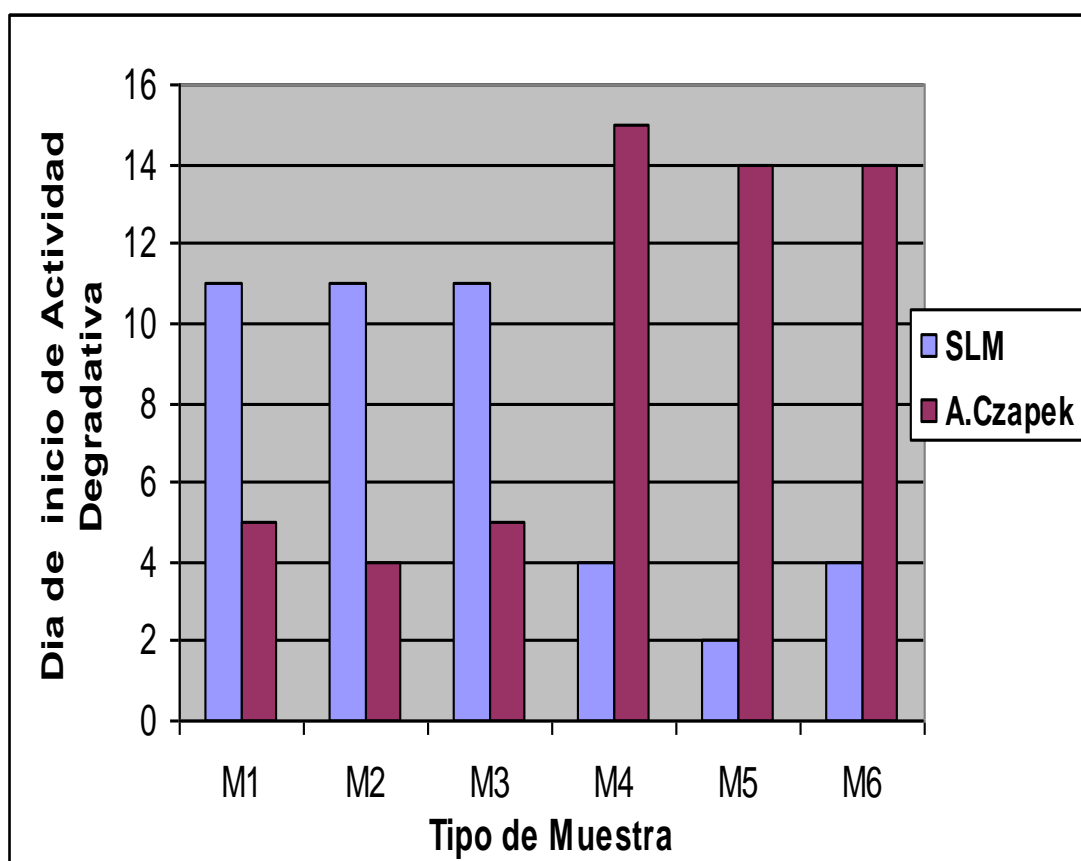


Figura 7: Comparación de los días de inicio de actividad degradativa de los hongos aislados por muestra y que corresponden al Método APHA modificado, según los medios sólidos empleados: Medio de una Sola Capa (SLM) y Agar Czapek (3% con sustrato de lípidos).

5.7.- Días de inicio de aparición de halos de degradación de cepas aisladas por el Método Czapek .

Las cepas aisladas por el Met. Czapek presentaron actividad de lipólisis al 6to, 4to y 8vo día en promedio para M1 ,M2 y M3, respectivamente; y al 15avo, 10mo y 16avo día en promedio para M4, M5 y M6; respectivamente. (Tabla 5, Figura 8)

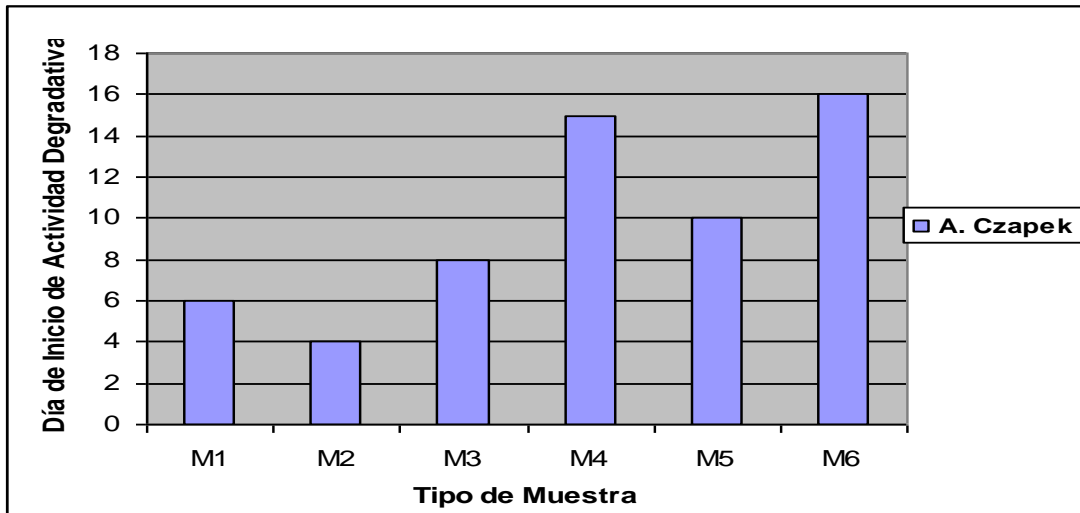


Figura 8: Comparación de los días de inicio de actividad degradativa de los hongos aislados por muestra y que corresponden al Método Czapek, según el medio sólido empleado: Agar Czapek (3% substrato de lípidos).

5.8.- Comparación de los días de inicio de actividad lipolítica de las cepas aisladas por ambos métodos (P.L.: Prueba de Lipólisis).

El día de inicio de actividad lipolítica sobre Agar Czapek (3% con substrato lípidos) de todas las cepas aisladas de una misma muestra (P.L: Prueba de Lipólisis) sea por el Método APHA modificado o por el Método Czapek presentaron similar tiempo de inicio de actividad de degradativa (Figura 9).

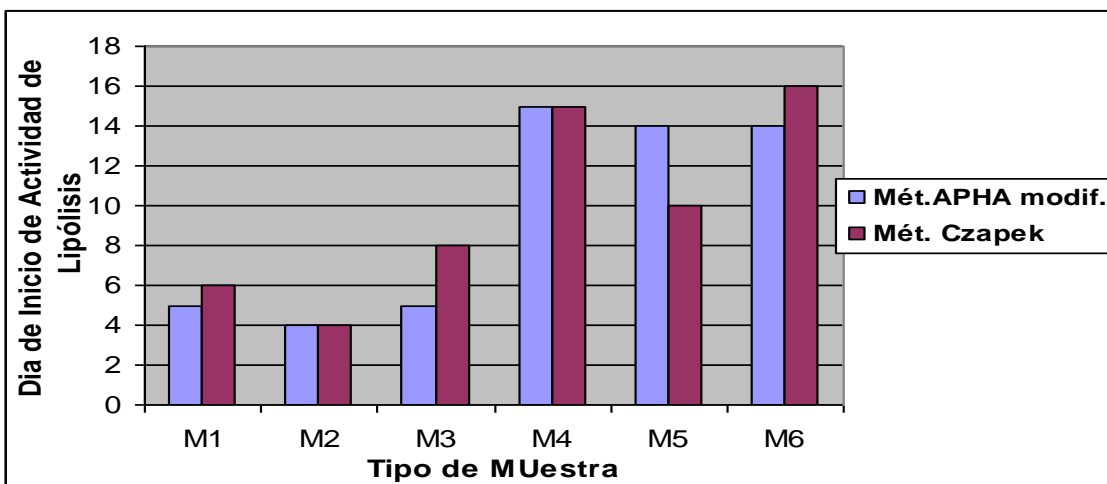


Figura 9: Comparación de los días de inicio de actividad lipolítica (P.L.:Prueba de Lipólisis) sobre Agar Czapek (3%) de los hongos aislados por cada muestra y según los dos métodos empleados.

5.9.- Análisis Estadístico:

5.9.1.- Prueba de T-Students

La Prueba de T-Students se aplicó para el análisis de diferencias significativas en el número total de hongos lipolíticos (h.l.) aislados entre los métodos generales: Met. APHA modif. y Met. Czapek.

Se observa que la media del número de hongos lipolíticos en el Met. APHA modif. es de 3.06 ± 2.58 ; y para el Met. Czapek es 2.78 ± 1.52 . No existe diferencias significativas para el total de hongos lipolíticos aislados por método APHA modificado y por el método Czapek, pues $P > 0.05$ (Tabla 6, Figura 10).

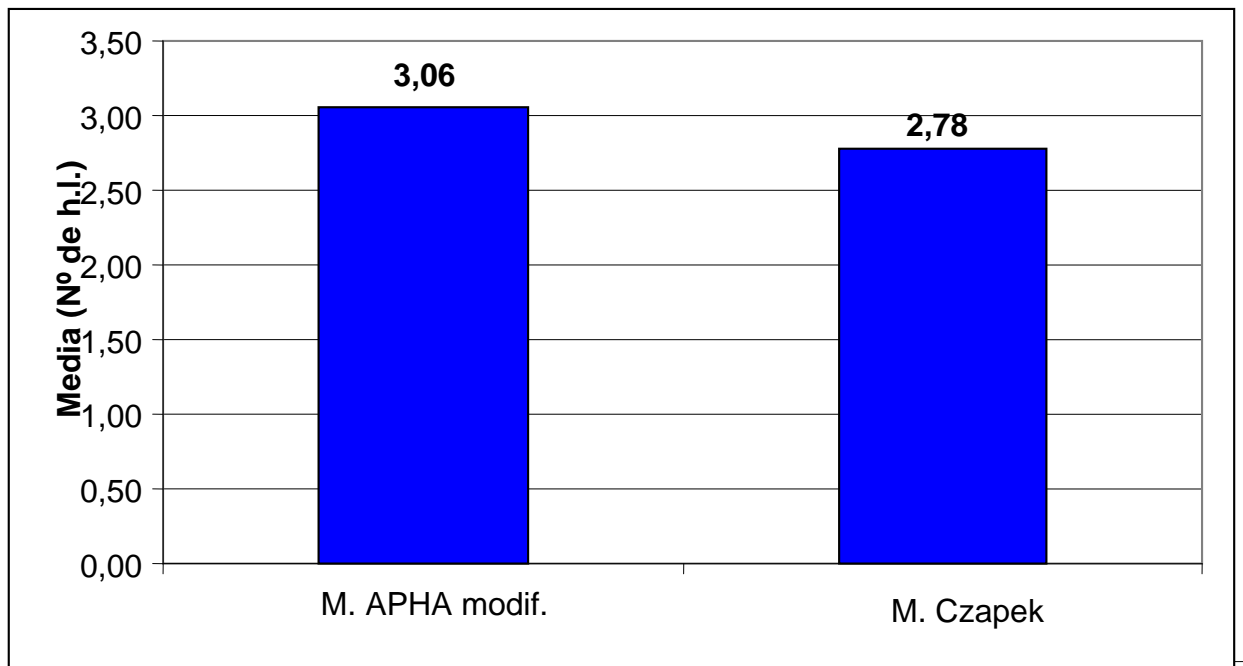


Figura 10: Prueba de T-Students: Medias del número de h.l. según Métodos

5.9.2.- Prueba de Mann Whitney

Para el análisis de diferencias significativas entre el número de hongos lipolíticos aislados para cada muestra (M) individual según cada método general empleado : Met. APHA modif. y M.Czapek se aplicó la prueba de Mann Whitney.

Dicho análisis concluye que no existe diferencias significativas entre los dos métodos generales empleados para ninguna muestra en particular, pues en ningún caso $P < 0,05$ (Tabla 7, Figura 11).

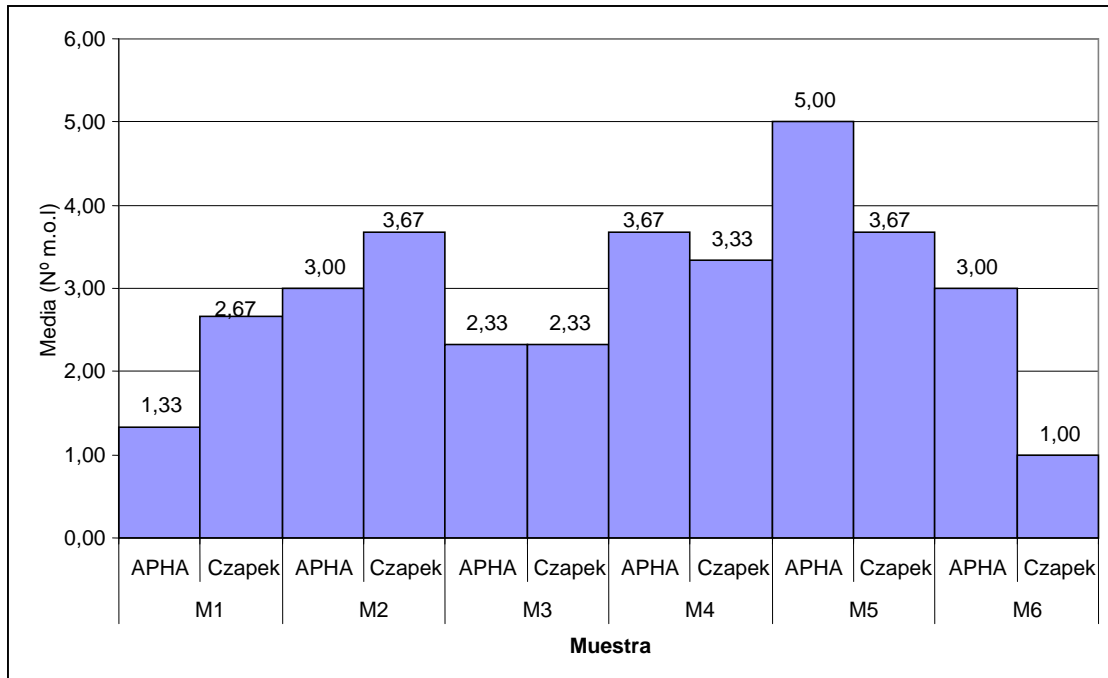


Figura 11: Prueba de Mann Whitney: Medias del número de hongos lipolíticos de cada muestra según métodos

5.9.3.- Análisis de Varianza (ANOVA) y Prueba de Comparaciones Múltiples de Tukey

La prueba de ANOVA y la Prueba de Comparaciones Múltiples de Tukey , permitió determinar estadísticamente si existen diferencias significativas entre el número de hongos lipolíticos (h.l.) aislados de los seis tipos de inóculos empleados.

Se comprobó que existen diferencias del número de hongos lipolíticos aislados en por lo menos un par de tipos de inóculos usados, ello se logró mediante el análisis de varianza (ANOVA) (Tabla 8, Figura 12)

La Prueba de Comparaciones Múltiples de Tukey determinó que entre el uso del Buffer Fosfato (B+M) y el Éter de petróleo (E+M) que fueron empleados como

diluyentes en el Met. APHA modif. si existen diferencias significativas ($P < 0,05$). El uso del buffer permitió aislar mayor número de hongos lipolíticos en comparación al empleo del éter. También se encontró diferencias significativas en la cantidad de hongos lipolíticos aislados con el uso de Buffer Fosfato(B) como diluyente en Met. APHA modif. y la cantidad de hongos lipolíticos obtenidos al procesar las muestras puras con el Met. Czapek (P2). El inóculo B+M del Met. APHA modif. permitió aislar mayor número de hongos lipolíticos en comparación al tratamiento de la muestra pura (P2) por el Met. Czapek.

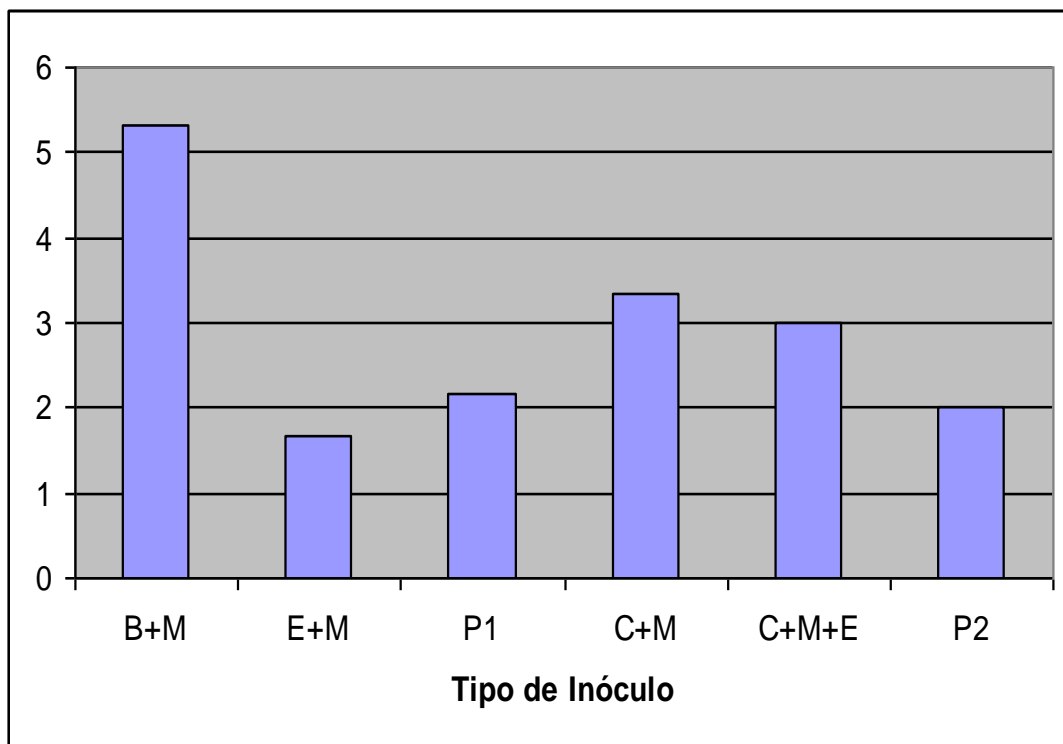


Figura 12: Prueba de ANOVA: Medias de número de h. l. según tipo de inóculo

5.10.- Hongos lipolíticos con mayor y menor capacidad de lipólisis

De los 105 hongos lipolíticos aislados (100%) por ambos métodos (Tabla 3 y 4), solo 10 de ellos presentaron mayor actividad de lipólisis y representan el 9,52% del total de aislados. Este grupo de hongos presentó una degradación completa del

substrato de lípidos incorporado al medio, además de observarse crecimiento profuso en toda la placa.

El restante 90,48% de cepas aislados presentaron actividad lipolítica pobre para las condiciones descritas en la metodología. Este grupo, presentó crecimiento de las colonias no mayores a 0,5 cm de diámetro sobre el Agar Czapek (3% substrato de lípidos) y halos de degradación alrededor de las colonias menores a 1 mm.

5.10.1. Identificación del Género de los hongos con mayor actividad de lipólisis

Se procedió a la observación microscópica a 10x y 40x de las 10 cepas de hongos considerados con mayor capacidad de lipólisis y se identificaron 3 géneros : *Penicillium* , *Aspergillus* y *Geotrichum* (ver Anexo: Fotos 1, 2 y 3)

Dentro del genero *Penicillium*, se observaron hifas tabicadas, con conidioforos ramificados, en cada esterigma se observó la formación de conidias dispuestas en cadenas.

Para el género *Aspergillus* , microscópicamente se observaron hifas tabicadas y en el extremo distal de sus conidióforos presentaba la típica cabeza aspergilar.

El género *Geotrichum* se identificó por al presencia de hifas hialinas septadas, clamidosporas . Además, se observó el desarrollo del típico micelio blanco cuando fue sembrado en Agar Sabouraud Glucosado (ASG).

Estos 10 hongos más lipolíticos se distribuyeron de la siguiente manera: 8 (7,62%) pertenecientes al género *Penicillium*, 1 (0,95%) perteneciente al género *Aspergillus* y 1 (0,95%) perteneciente al género *Geotrichum*. De estos 10 hongos se aislaron 4 por el Met. APHA modif. y 6 por el Met. Czapek. Ninguno de estos tres géneros identificados pudo aislarse por simultáneo con ambos métodos a partir de la misma muestra analizada (Tabla 1).

De este grupo la única cepa del género *Geotrichum* se logró aislar usando el éter de petróleo como diluyente. En cambio, usando el buffer fosfato se aisló la única

cepa del género *Aspergillus*. Ambos géneros se obtuvieron sólo a partir de la muestra seis (M6) y con el Método APHA modificado.

Tabla 1 : Cantidad, género y código de los 10 hongos aislados con mayor capacidad de lipólisis y su correspondiente muestra origen.

Inóculo Muestra	Met. APHA modif..			Met. Czapek		
	*B+M	**E+M	***P1	^C+M	^^C+M+E	^^^P2
M1	-	-	-	-	-	-
M2	-	-	-	1 <i>Penicillium</i> M2-Cz	-	-
M3	-	-	-	-	-	-
M4	-	1 <i>Penicillium</i> M4-APH	1 <i>Penicillium</i> M4P-APH	-	-	-
M5	-	-	-	-	2 <i>Penicillium</i> M5.a-Cz M5.b-Cz	2 <i>Penicillium</i> M5P.a-Cz M5P.b-Cz
M6	1 <i>Aspergillus</i> M6.a-APH	1 <i>Geotrichum</i> M6.b-APH	-	1 <i>Penicillium</i> M6-Cz	-	-

- * B+M : Buffer+ muestra.
- ** E+M : Eter + muestra.
- *** P1 : Muestra pura (sin diluyente).
- ^ C+M : Czapek + muestra
- ^^ C+M+E : Czapek + muestra + éter
- ^^^ P2 : Muestra pura (sin diluyente)

VI.- DISCUSIÓN

6.1.- Aislamiento de hongos lipolíticos a partir de las muestras de aceites vegetales de desecho proveniente de frituras.

En las 6 muestras de aceite usado (M) se aislaron 123 cepas en total. De los cuales 105 fueron hongos lipolíticos ya que crecieron sobre A. Czapek al 3% de substrato de lípidos (pH 6,3): Prueba de lipólisis, este grupo representó el 100% de hongos lipolíticos (Tabla 2). La mayoría de éstos corresponden a las muestras M2, M4 y M5, coincidentemente para ambos métodos empleados: Met. APHA modif. y Met. Czapek. (Tabla 3 y 4), lo que puede indicar que ambos métodos dan resultados similares.

En el procesamiento de las muestras puras: P1 y P2 utilizando los Met. APHA modif. y Met. Czapek, se aislaron cantidades totales similares de 13 y 12 hongos lipolíticos, respectivamente, para cada método (Figura 6) (Tabla 3 y 4). Lo que evidencia que independientemente de los diluyentes probados, y bajo las condiciones descritas en la metodología empleada, es posible aislar hongos lipolíticos que pueden permanecer viables dentro de la misma muestra sin emplear diluyente alguno. Tal es así, que se pudo aislar tres hongos del género *Penicillium* con alta capacidad lipolítica que corresponde uno a la M4 (M4P-APH) y dos a la M5 (M5P.a-Cz y M5P.b-Cz) obtenidas a partir de muestras puras (Tabla 1).

Del total de hongos lipolíticos aislados por ambos métodos el 9,52% (10 cepas) presentaron alta actividad de lipólisis, perteneciendo 8 al género *Penicillium* (M4-APH, M4P-APH, M2-Cz, M5.a-Cz, M5.b-Cz, M5P.a-Cz, M5P.b-Cz, M6-Cz). Estos resultados coinciden con los reportados por Sztajer & Maliszewska (1988) quienes de 160 cepas productoras de lipasas encontraron el 10% con alta capacidad de lipólisis y también a *Penicillium sp* como la cepa más frecuente dentro del grupo de hongos filamentosos.

Los géneros aislados *Geotrichum*, *Penicillium* y *Aspergillus* a través del método APHA modificado están dentro del grupo con mayor capacidad de lipólisis (Tabla 1).

Estos tres, además del género *Rhizomucor*, han sido reportados como los mejores productores de lipasas (Stcklein *et al.*, 1993). Para el aislamiento dentro de la metodología APHA modificado se usó el Agar Plate Count (APC) en cuya composición esta presente la peptona de caseína, como fuente de nitrógeno; el extracto de levadura, como proveedor de las vitaminas del complejo B; y la glucosa como fuente carbonada, además de adicionarse el sustrato de lípidos. En particular, para el aislamiento de la única cepa del género *Geotrichum* (M6.b-APH) se logró en condiciones similares a las reportadas por Tsujisaka *et al.*(1973) quien aisló a la especie *Geotrichum candidum* en medio de cultivo conteniendo glucosa y peptona, suplementado con aceites vegetales y ácidos grasos, pero bajo las condiciones de fermentación en sustrato líquido (FSL).

El aislamiento de especies del género *Penicillium* por Met.APHA modif. pudo ser favorecida por la presencia de la glucosa (presente en el APC), la que juega un rol importante en la producción de lipasas para algunas especies del género *Penicillium* (Petrovic *et al.*, 1990). Otros azúcares más complejos como el almidón (forma macromolecular de la glucosa) y el extracto de levadura (Sztajer y Maliszewska, 1989), además este último nutriente junto con la peptona (Sant'anna *et al.*, 1997), han permitido el estudio del género *Penicillium* como productor de lipasa y proteasa.

El aislamiento de la única cepa del género *Aspergillus* (M6.a-APH) a partir de la muestra M6 (Tabla 1), se logró sólo con el Met. APHA modif., y pudo ser favorecida, en particular para esta muestra, por el efecto benéfico de la peptona (Cihangir y Sarikaya, 2004) y del extracto de levadura (Mahadik, 2002) presentes en el Agar Plate Count. (APC)

El género *Penicillium* fue el único género que logró aislarse por simultáneo a partir de dos tipos de inóculos diferentes y provenientes de la misma muestra. Para el Met. APHA modif. de los inóculos: E+M y P1 correspondiente a la muestra M4 se aisló dos cepas de éste género (M4-APH y M4P-APH). También por el Met. Czapek se logró aislar dos cepas a partir de inóculo C+M+E (M5.a-Cz, M5.b-Cz) y dos cepas del

inóculo P2 (M5P.a-Cz, M5P.b-Cz) correspondientes a la misma muestra M5 (Tabla 1). Ello confirma para este género *Penicillium* su característica de ubicuidad y su reconocido importante rol en los procesos naturales de reciclado biológico (Pitt, 1991).

6.2.- Días de inicio de aparición de halos de degradación.

En las cepas aisladas por el Met. APHA modif. (Tabla 5, Figura 7) se observó para cada muestra una relación inversa entre los días promedio de inicio de actividad degradativa en los dos medios sólidos empleados: Single Layer Médium (SLM) y Agar Czapek con 3% de substrato de lípidos (P.L.) (Tabla 5, Figura 7). Ello puede evidenciar que las cepas aisladas tuvieron una preferencia inicial por un substrato particular contenido en el SLM por ejemplo la peptona, ya que durante el crecimiento fúngico para la producción de lipasas; dependiendo de las condiciones de cultivo, pueden ser formadas proteasas extracelulares (Papagianni y Moo-Young, 2002).

El tiempo promedio de inicio de actividad hidrolítica durante la Prueba de Lipólisis (P.L.) de las cepas aisladas por ambos métodos: Met APHA modif. y Met. Czapek fue muy similar. Lo que demuestra que los hongos aislados de una misma muestra y por cualquiera de los dos métodos tuvieron un comportamiento similar al ser sembradas sobre Agar Czapek (3%), que contenía como única fuente carbonada un substrato de lípidos (Tabla 5, Figura 9).

6.3.- Análisis de Varianza (ANOVA) y Prueba de Comparaciones Múltiples de Tukey

El Análisis de Varianza (ANOVA) y luego la Prueba de Comparaciones Múltiples de Tukey revelaron que si existen diferencias significativas del número de hongos lipolíticos aislados entre los tipos de inóculos empleados para el Met. APHA modif. (Tabla 8, Figura 12).

El Éter de petróleo (E) se empleó por su propiedad de ser un buen solvente orgánico y con ello lograr una mejor emulsión de la muestra de aceite analizada, en

comparación con la naturaleza acuosa del buffer fosfato (B) el cual es usado comúnmente como diluyente para el Método APHA estándar. El éter es recomendado como el mejor solvente para la extracción de aceites (Grosman, 1948); y aceptado por ACS (American Chemical Society) para los ensayos de recuperación de triglicéridos purificados (APHA, 2001). Pero su uso no benefició en el aislamiento de mayor número de hongos lipolíticos, sino por el contrario la cantidad de ellos fue mucho menor comparándolo al número de hongos lipolíticos aislados usando buffer fosfato (B) (Tabla 3, Figura 3). Ello se podría explicar debido a la toxicidad del éter de petróleo (E) frente a la mayoría de microorganismos, excepto para aquellos tolerantes a él. Es así, que dentro del grupo de hongos con mayor capacidad de lipólisis se aisló sólo con el uso del éter y por el Met. APHA modif, a un hongo del género *Geotrichum* (M6.b-APH) y a otro del género *Penicillium* (M4-APH) provenientes de la M6 y M4, respectivamente. Ambos presentaron alta capacidad de lipólisis “in vitro” (Tabla 1).

La otra diferencia significativa que mostró la prueba de Tukey fue entre el uso del buffer fosfato (B) del Met APHA modif. y el tratamiento que se hizo a la muestra pura (P2) con el Met Czapek (Tabla 8, Figura 12). El mayor número de hongos lipolíticos aislados se logró al usarse buffer (B) en el Met. APHA modif. Ello pudo deberse al efecto benéfico del buffer fosfato(B) y/o los constituyentes del SLM.

La prueba de Comparaciones Múltiples de Tukey no halló diferencias significativas entre los tipos de inóculos empleados para el Met. Czapek (Tabla 8, Figura 12). El éter usado para esta metodología no influyó en el número de hongos lipolíticos aislados. Ello pudo deberse a que en la metodología Czapek se usó una cantidad mínima de éter (0,1 ml) de un total de 10 ml de homogenizado. Pues, a pesar que se procedió con cuidado para evitar la volatilidad del éter, ello pudo haber ocurrido durante el procesamiento de la muestra o también durante los 15 días en promedio en que fueron incubados los tubos antes de sembrarse en medio sólido. Dado ello, el éter no influyó en el número de los hongos lipolíticos aislados, como si influyó entre dos tipos de inóculos usados para el Met. APHA modif. (Tabla 8, Figura 12).

VII.- CONCLUSIONES

1.- Se logró aislar a partir de aceites vegetales de desecho 10 cepas de hongos que tuvieron alta capacidad de lipólisis y que pertenecen a los géneros: *Geotrichum* , *Aspergillus* y *Penicillium*.

2.- El mayor número de hongos que resultaron ser altamente lipolíticos pertenecieron al género *Penicillium* (8 cepas de 10) y éstas fueron aisladas en cinco de los seis tipos de inóculos empleados.

3.- En el Método APHA modificado el uso del éter de petróleo como diluyente para el aislamiento de lipolíticos no es indicado, en cambio se concluye que el buffer fosfato si es el más óptimo.

4.- En el Método Czapek el uso del éter de petróleo como diluyente adicional al caldo Czapek no influenció en la cantidad de hongos lipolíticos aislados.

5.- Los dos métodos empleados son adecuados para el aislamiento de lipolíticos, sin embargo con el método APHA modificado se logró aislar la mayor diversidad de género de hongos lipolíticos.

VIII.- RECOMENDACIONES

- 1.-Repetir la influencia del éter de petróleo en el método Czapek usando volúmenes diferentes a los empleados .
- 2.-Reformular el caldo Czapek para lograr una mejor disolución de las sales que lo conforman.
- 3.- Considerar otros rangos de temperatura, pH, tipo de substrato, etc a los ya trabajados y probarlos con aquellos hongos aislados y considerados como no altamente lipolíticos.
- 4.- Comprobar la capacidad de lipólisis de los hongos considerados con mayor capacidad lipolítica usando otros tipos de substratos de lípidos.
5. Diseñar una metodología que permita cuantificar la producción de la enzima lipasa de los hongos lipolíticos aislados.

IX.- ILUSTRACIONES

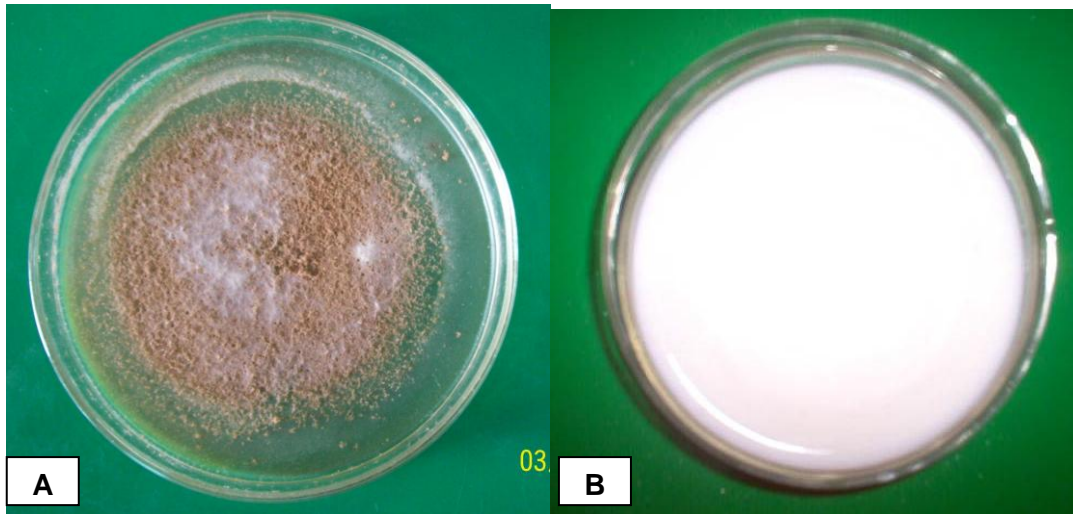


Foto 1: Crecimiento de *Geotrichum sp* en Agar Czapek con 3% de substrato de lípidos como única fuente de carbono (A), comparada a la placa no inoculada (B).

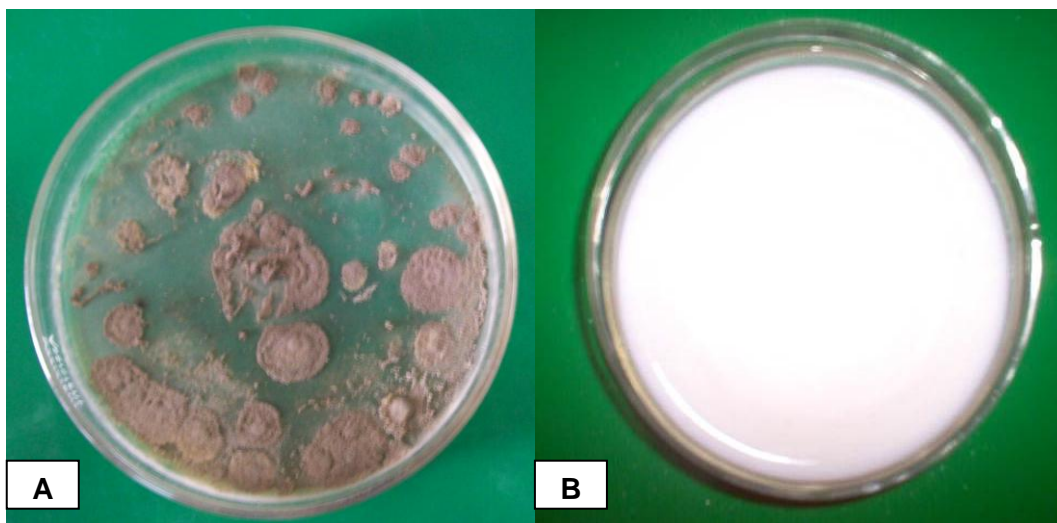


Foto 2: Crecimiento de *Penicillium sp* .en Agar Czapek con 3% de substrato de lípidos como única fuente de carbono (A), comparada a la placa no inoculada (B).

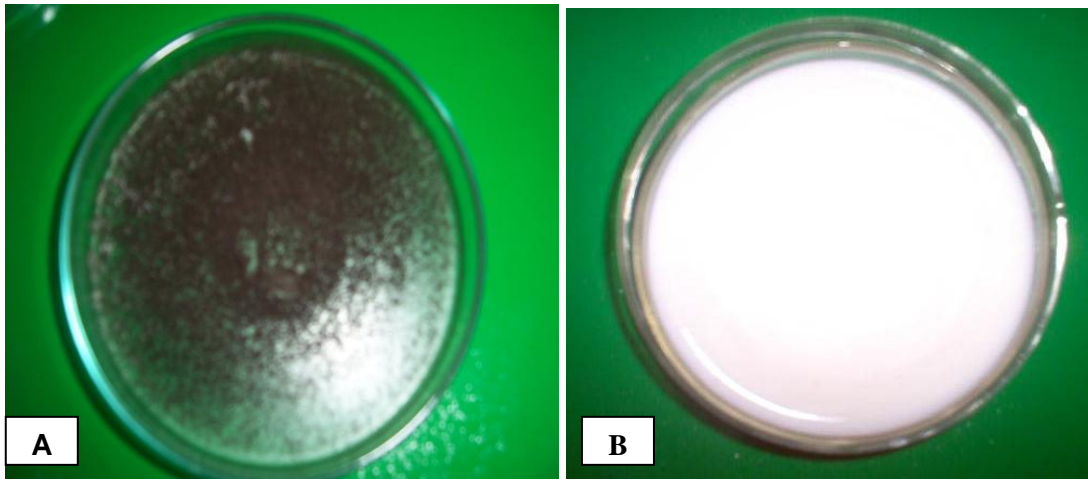


Foto 3: Crecimiento de *Aspergillus sp* en Agar Czapek con 3% de substrato de lípidos como única fuente de carbono (A), comparada a la placa no inoculada (B).

X.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ABIGOR,R., UADIA,P., FOGLIA, T., HAAS, M., JONES, K., OKPEFA, E.,OBIBUZOR,J., BAFOR, M. Lipase-catalysed production of biodiesel fuel from some Nigerian lauric oils.Biochem. Soc. Trans. 2000, vol.28, p.979-981.
- ALCARRAZ, M, FLORES, A. y LEON, J. Aislamiento primario de microorganismos lipoliticos a partir de efluentes de curtiembres. En: XIV Reunión Científica del Instituto de Ciencias Biológicas Antonio Raimondi de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (ICBAR-UNMSM). Lima-Perú, 27-29 Abril 2005.
- ALVAREZ-MACARIE E., AUGIER-MAGRO, GOZZO J., BARATTI, T. Molecular characterization of gene encoding and esterasa from *Bacillus licheniformis* sharing significant with lipase. Biotechnol.Lett. 1999 vol.21, p.313-319.
- APHA. American Public Health Association. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Lipolytic Microorganisms, 4th Ed. 2001. c.15; p. 175-181.
- ARPIGNY,J..L. y JAEGER K-E.. Bacterial lipolytic enzimas: classification and properties. Biochem.J. 1999, vol.343, p.177-183.
- ATKINSON, B., BLACK, G.M., LEWIS, P.J.S., PINCHES,A. Biological particles of given size, shape, and density for use in biological reactors.Biotechnol. Bioeng. 1979,vol.21, p.193-200.
- BAN, K.; KAIEDA, M.; MATSUMOTO, T.; KONDO, A.; FUKUDA, H. Whole cell biocatalyst for biodiesel fuel production utilizing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles.Biochem. Eng.J. 2001, vol. 8, p.39-43.
- BENJAMIN, S. y PANDEY, A. . Isolation and characterization of three distinct forms of lipases from *Candida rugosa* produced in solid state fermentation. *Braz. Arch. Biol. Techn.* 2001, vol. 44, p. 213-221.
- BIER,M. Lipases. Methods Enzymol. 1955, vol.1, p. 627-642.

BREIVIK,H.; HARALDSSON, G.G.; KRISTINSSON,B. Preparation of highly purified concentrates of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid. J. Am. Oil Chem. Soc. 1997, vol.74, p.1425-1429

BRITISH STANDARDS INSTITUTION. Methods of microbiological examination for dairy purposes:colony count technique for lipolytic organisms. 1968, BS4285.1.10., 18.

BROCKMAN, H. L. General feature of lipolysis in lipases:Reaction scheme interfacial structure and experimental approaches in Lipases. Borgstrom, B. & Brockman, H. L.(eds.) Elsev. Sci. Publis., Amsterdam, 1984, p.1-46.

CARDENAS, F.; CASTRO, M.S., SÁNCHEZ-MONTERO J.M.; SINISTERRA, J.V.,VALMASEDA,M; ELSON S.W. ; ALVAREZ, E. Novel microbial lipasas :catalytic activity in reactions in organic medio. Enzyme Microbial Technol. 2001, vol.28, p.145-154.

CARLILE M.J. y WATKINSON,S.,C.The Fungi. London: Academic Press, 1997 460p

CASTRO ROJAS Jorge Luís. “Manejo de residuos peligrosos aceite usado en la EPS-RS L.F.MARTE”. Asesor:.Amparo Becerra Paucar. Informe de suficiencia para optar el título profesional de Ingeniero Sanitario. Universidad Nacional de Ingeniería. Fac. Ing. Ambiental, Lima, 2005.

CIHANGIR, N. y SARIKAYA, E. Investigation of lipase production by a new isolate of *Aspergillus sp.* World J. Microbiol. 2004, vol.20, p.193-197.

CORDOVA, J., NEMMAOUI, M., ISMAÏLI-ALAOUI, M., MORIN, A., ROUSSOS, S., RAIMBAULT, M. & BENJILALI, B. Lipase Production by Solid State Fermentation of Olive cake and Sugar cane Bagasse. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 1998, vol.5, p.75-78.

CORZO, G. AND REVAH, S. Production and Characteristics of the Lipase from *Yarrowia lipolytica* 681, Biores. Technol. 1999, vol.70, p.173-180.

DE, B.K.; BHATTACHARYYA, D.K.; BANDHU,C. Enzimatic síntesis of fatty alcohol esters by alcoholysis. J. Am. Oil chem. Soc. 1999, vol.76, p.451- 453.

DE CASTRO, H.F.; MENDES,A.A.; DOS SANTOS,J.C.; DE AGUIAR,C.L. Jan/Feb. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. Quimica Nova. 2004, vol. 27, nº .1

DE LA CRUZ RODRÍGUEZ, Eduardo Rubén y HUAMAN GUTIÉRREZ, Juan Orlando. "Formación de hidrocarburos aromáticos policíclicos y del 3,4-Benzopireno en aceites comestibles alterados por recalentamiento". Asesor: Jesús Lizano. Tesis Título Profesional UNMSM, Departamento Académico de Farmacología, Bromatología y Toxicología, Lima, 2002.

DIXON,M.; WEBB; E.C. THORNE; C.J.R. y TIPTON K.F. Enzymes. 3ra ed. London, Ed. Longman, 1979

DOMÍNGUEZ, A., COSTAS, M., LONGO, M., LONGO, M.A., SANROMÁN, A.,. A novel application of solid state culture: production of lipases by *Yarrowia lipolytica*. Biotech. Letters. 2003, vol. 25, p.1225-1229.

ELIBOL, M. y OZER, D. Response surface analysis of lipase production by freely suspended *Rhizopus arrhizus*. Process Biochem. 2002, vol.38, p.367-372.

ESSAMRI, M., DEYRIS, V., COMEAU, L. Optimization of lipase production by *Rhizopus oryzae* and study on the stability of lipase activity in organic solvents. J. of Biotechnol. 1998, vol. 60, p. 97-103.

FEDELI, E. Aspectos fisicoquímicos del proceso de fritura. Grasas y Aceites. 1998, nº. 49(3-4), p. 261-264.

FERNÁNDEZ, J. Agroenergética: Una opción alternativa de la agricultura. 1993, nº.17, p.10-18.

FERRER, M.; PLOU, F.J.; NUERO, O.M.; REYES, F.; BALLESTEROS, A. A Purification and properties of a lipase from *Penicillium chrysogenum* isolated from industrial waste. J. Of Chem. Technol. And Biotechnol. 2000, vol.75, p. 569-576.

FIEDLER, H. Guidance by source category:Annex C,Part III. Souerce Categories. Waste oil refineries United Nations Environment Programme. 2005, p.1-25

FREIRE, D.M.G., GOMES, P.M., BON, E.P.S., SANT'ANNA Jr., G. Lipase production by a new promising strain of *Penicillium restrictum*. Rev. De Microbiol. 1997, vol. 28, p. 6-12

FRYER, T.F, LAWRENCE, R,C y REITER, B. Methods for isolation and enumeration of lipolytic organisms. J. Dairy Science. 1967, vol.50, nº.4, p.477-484.

FUKUDA, H.; KONDO, A.; NODA, H. Biodiesel Fuel Production by Transesterification of oils. Journal of Bioscience and Bioengineering. 2001, vol. 92, nº 5, p 405-416

GANDHI ,N.N. Applications of Lipase. JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society. 1997, vol.74, nº.6, p.621-634.

GARCIA, M. Hidrólisis enzimática de triglicéridos en emulsiones o/a. Aplicación a formulaciones de detergentes. Tesis Doctoral-Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Ciencias. Universidad de Granada, 2005.

GOMBERT, A. K.; PINTO, A. L.; CASTILHO, L.R. AND FREIRE, D. M. G. Lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state fermentation using babassu oil cake as substrate. *Process Biochem.* 1999, vol.35, p.85-89.

GOODRUM, J, & EITEMAN,M. Physical properties of low molecular weight triglycerides for the development of Bio-diesel fuel models. Bioresource Technology. 1996, vol.56, p.55-60.

GOMES DE LIMA, Valeria Marta. "Produção e purificação da lipase de *Bacillus megaterium* e sua aplicação em biocatalise em solventes orgânicos". Orientador: David Alexander Mitchell. Tese apresentada como requisito parcial à obtenção de grau de doutor. Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

GROSMAN, V.,A. La Extracción de Aceites Vegetales por Solventes. Trabajo presentado para optar el título de Químico. Sección Química de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, 1948.

HUSS, H. Eine fettspaltende Bakterie (*Bactridium lipolyticum* n.sp.). Centr. F. Bakt., 1908, 2. XX. p.474.

INTI. Instituto Nacional de Tecnología Industrial. Utilización de Aceite Vegetal como combustible en motores Diesel. 5º Jornadas de Desarrollo e Innovación. 2004. p. 1-2.

IPES. Instituto de Promoción del Desarrollo Sostenible. Proyecto piloto demostrativo: Gestión Ambiental de los Aceites Usados. Documento de Sistematización del Programa APGEP-SENREM. Convenio USAID-CONAM. 2002, Lima, Perú.

IVONILDE,A., BARBOSA C., GONÇALES J. D. Enzymatic activity of endophytic bacterial isolates of *Jacaranda decurrens* Cham (Carobinha –do-campo). *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2006, vol.49, nº 3, p.353-359

JACOBSEN, T.; OLSEN, J.; ALLERMANN,K. Production, partial purification and immunochemical characterization of multiple forms of Lipase from *Geotrichum candidum*. *Enzyme Microbial Technol.* 1989, vol.11, p.90-95.

JAEGER, K. E.; DIJKSTRA, B.W., REETZ,M.T. Bacterial Biocatalist: molecular biology, three dimensional structures and biotechnological applications of lipases. *Annu. Rev. Microbiol.* 1999, vol.53, p.315-351.

JAEGER K.E.,EGGERT,T. Lipase for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*. 2002, vol.13, nº.4, p.390-397.

JAEGER, K.E.; RANSAK, S.; KOCH, H.B.; FERRATO,F.; DIJKSTRA, B.W. Bacterial lipases. *FEMS Microbiol.Rev.* 1994, vol.15, p.29-63.

JAEGER, K.E. y REETZ, M.T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnol.* 1998, Sep;16(9), p.396–403

JENSEN, R.G.; DEJONG,F.A.; CLARK,R.M. Determination of Lipase Specificity. *Lipids*. 1983, vol.18, nº.3, p.239-252.

JESUS, M.F.C.P.; BRANCO, R.N.; SANT'ANNA Jr., G.L.; FREIRE, D.M.G.; SILVA Jr., J.G. *Penicillium restrictum* lipases: a comparative study and characterization of enzyme with different degree of purity. *Braz. J. of Chem. Eng.* 1999, vol. 16, p.113-118.

KAIEDA, M.; SAMUKAWA, T.; KONDO, A.; FUKUDA,H. Effect of metanol and water contents on production of biodiesel fuel from plant oil catalized by various lipases in a solvent-free system. *J. Biosci. and Bioeng.* 2001, vol.91, p.12-15.

KAIEDA, M.; SAMUKAWA, T.; MATSUMOTO, T.; BAN, K.; KONDO, A.; SHIMADA, Y.; NODA, H.; NOMOTO, F.; OHTSUKA, K.; IZUMOTO, E.; FUKUDA, H. Biodiesel fuel production from plant oil catalyzed by *Rhizopus oryzae* lipase in a water-containing system without an organic solvent. J. Biosci. and Bioeng. 1999, vol.88, p.627-631.

KAMINI, N. R., MALA, J. G. S., PUVANAKRISHNAN, R. Lipase production from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation using gingelly oil cake. Process Bioche. 1998, vol. 33, p.505-511.

KHOR, H.T.; TAN, N.H.; CHUA, C.L. Lipase-catalyzed hydrolysis of palm oil. J. Am.Oil Chem.Soc. 1986, vol. 63, p.538-540.

KONEMAN, E.W.; ROBERTS, G.D.; WRIGHT, S.E. Czapek Dox Agar. En: The Williams & Wilkins Company (edit.) 2nd Edition. Practical Laboratory Mycology. 1975, p.127.

LEAL MARCIA CRISTIANE MARTINS RIBEIRO. "Utilização de enzimas hidrolíticas no tratamento de resíduos da indústria de laticínios". Orientador: Geraldo Lippel Santanna Junior. Tese de Mestrado. Programa de Engenharia Química da COPPE; UFRJ. Rio de Janeiro, 2000.

LEAL, M.C.M.R.; CAMMAROTA, M.C.; FREIRE, D.M.G.; SANT'ANNA Jr., G.L. Hydrolytic enzymes as coadjuvants in the anaerobic treatment of dairy wastewater. Braz.J. of Chem. 2002, vol.19, p.175-180.

LIE, E.; MOLIN, G. Em Bioconversión of waste materials to industrial products. Elsevier Applied Science. New York. 1991, p.401.

LINKO, Y.-Y., LAMSA, M., WU, X., UOSUKAINEN, W., SAPPALA, J., LINKO, P. Biodegradable products by lipase biocatalysis. J. Biotechnol. 1998, vol.66, p.41-50.

LYLE VON REISSEN, V. Convenient, simplified preparation of less commonly used media. J.Clinic.Microbiol. 1975, vol.2, p.554-555.

MAHADIK, N.D.; PUNTAMBEKAR, U.S.; BASTAWDE, K.B.; KHIRE, J.M.; GORHALE, D.V. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid-state fermentation. Process Biochem. 2002, vol.38, p.715-721.

MAIA, M.M.D.; HEASLEY, A.; MORAIS, M.M.C.; MELO, E.H.M., MORAIS Jr., M.A.; LEDINGHMAN, W.M.; LIMA FILHO, J.L. Effect of culture conditions on lipase production by *Fusarium solani* in batch fermentation. *Biores. Technol.* 2001, vol.76, p.23-27.

MAIA, M.M.D.; MORAIS, M.M.C.; MORAIS Jr., M.A.; MELO, E.H.M.; LIMA FILHO, J.L. Production of extracellular lipase by the phytopathogenic fungus *Fusarium solani* FS1. *Rev. De Microbiol.* 1999., vol. 30, p.01-10.

MASSE, L.; KENNEDY, K.J.; CHOU, S. Testing of alkaline and enzymatic hydrolysis pretreatments for fat particles in slaughterhouse wastewater. *Bioresource Technology.* 2001, vol.77, nº.2, p.145-155(11).

MIRANDA, O.A.; SALGUEIRO, A.A.; PIMENTEL, M.C.B.; LIMA FILHO, J.L.; MELO, E.H.M.; DURAN, N. Lipase production by a Brazilian strain of *Penicillium citrinum* using industrial residue. *Biores. Technol.* 1999, vol.69, p145-147.

NAGAO, T., SHIMADA, Y., SUGIHARA, A., TOMINAGA, Y. Expression of lipase cDNA from *Fusarium heterosporum* by *Saccharomyces cerevisiae*: high-level production and purification. *J. Ferment. Bioeng.* 1996, vol.81, p.488-492.

NAZARIO RAMÍREZ, Mirtha Soledad. "Aprovechamiento de aceites vegetales de desecho generados por el comedor universitario de la Universidad Nacional Agraria La Molina, para la elaboración de biodiesel". Asesor: José Calle. Tesis Título Profesional. Universidad Nacional Agraria La Molina, Departamento de Ingeniería Ambiental, Física y Meteorología, Lima, 2005.

NELSON, L.A.; FOGLIA, A.; MARMER, W. N. Lipase-catalyzed production of biodiesel. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1996, vol.73, p.1191-1195.

NOVO NORDISK; 1995. Em Catálogo Informativo, 30.

O'DONNELL, E.T. A study of the lipase enzymes of psychrophilic bacteria. PhD Thesis. University of Strathclyde, Glasgow, U.K., 1975.

OIKOS. Casos de Aplicaciones Tecnológicas Ambientales en el Ecuador, Julio, 1998, p.1-8.

PANDEY, A.; BENJAMIN, S.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.; KRIEGER, N., SOCCOL V.T. The realm of microbial lipases in Biotechnology. *Biotechnol Appl. Biochem.* 1999, vol.29, p.119-131.

PAPAGIANNI, M. y MOO-YOUNG, M. Protease secretion in glycoamylase producer *Aspergillus niger* cultures: fungul morphology and inoculum effects. *Process Biochem.* 2002, vol. 37, p.1271-1278.

PASTORE, G.M.; COSTA, V.S.R.; KOBLITZ, M.G.B. Purificação parcial e caracterização bioquímica de lipase extracelular produzida por nova linhagem de *Rhizopus sp.* *Ciênc. e Tecnol. de Alim.* 2003, vol.23, p.135-140.

PETROVIC, S.E., SKRINJAR, M.; BECAREVIC, A.; VUJICIC, I.F.; BANKA, L. Effect of various carbon sources on microbial lipases biosynthesis. *Biotechnol. Lett.* 1990, vol.12, p.299-304.

PITT, J. A Laboratory Guide to Common *Penicillium* Species. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Division of Food Processing. 1991

PRAMANIK, K. Properties and use of *Jatropha curcas* oil and diesel fuel blends in compression ignition engine. *Renewable Energy.* 2003, vol.28, p.239-248.

QI SI J. Synergistic effect of enzymes for breadbaking. *Cereal Foods World.* 1997, vol. 42, nº10, p. 802-807.

RAO, P.V.; JAYARAMAN, K.; LAKSHMANAN, C.M. Production of lipase by *Candida rugosa* in Solid State Fermentation. 1: Determination of Significant Process Variables. *Proc. Biochem.* 1993, vol.28, p.385-389.

RATH, S. Ein Versuch zur Verbesserung der Methodik zur quantitativen Ermittlung lipolytischer Keime. *Milchwissenschaft.* 1961, vol.11, p.97-122.

SANT'ANNA Jr., G. L.; FREIRE, D.M.G.; GOMES, P.M.; BOM, E.P.S. Lipase production by a new promising strain of *Penicillium restrictum*. *Rev. Microbiol.* 1997, vol.28, p.6-12.

SCHEIB,H.; PLEISS,J.; STADLER, P.; KOVAC, A.; POTTHOFF, A.P.; HAALCK, L.; SPENER,F.; PALTAUF,F.; SCHMID, R.D. Rational design of *Rhizopus oryzae* lipase with modified stereoselectivity toward triacylglycerols. *Protein Eng.* 1998, vol.11, p.675-682.

SELMI, B. y THOMAS, D. Immobilized lipase-catalyzed ethanolysis of sunflower oil in solvent-free medium. *J.Am.Oil Chem. Soc.* 1998, vol.76, p.691-695.

SHAH, S.; SHARMA, S.; GUPTA,M. Biodiesel preparation by lipase-catalyzed transesterification of *Jatropha* oil. *Energy & Fuels.* 2004, vol.18, p.154-159

SHANLEY, A. Enzymes usher in a new era. *Chemical Engineering (NY) (USA).* 1998, vol.105, nº.7, p.63-64, 66.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U.C. Production, purification, characterization and applications of lipases. *Biotechnol. Adv.* 2001, vol.19, p.627-662.

SHELLEY, A.W. Studies on lipolytic psychrotropic bacteria from raw milk. M.Sc. Thesis.University of Queensland, Brisbane, Australia, 1985.

SHELLEY, A.W.; DEETH, H.C.; MAC RAE, I.C. Review of methods of enumeration, detection and isolation of lipolytic microorganisms with special reference to dairy applications. *Journal of Microbiological.* 1987, vol.6. p.123-137.

SHIMADA, Y.; SUGIHARA, A.; NAGAO, T.; TOMINAGA, Y. Induction of *Geotrichum candidum* lipase by long-chain fatty acids. *J. Ferment. Bioeng.* 1992, vol.74, p.77-80.

SHIMIDA, Y.; WATANABE, Y.; SAMUKAWA, T.; SUGIHARA, A.; NODA, H.; FUKUDA, H.; TOMINAGA, Y. Conversion of Vegetable Oil to biodiesel using immobilized *Candida antarctica* lipase. *JAACS.* 1999, vol.76, p.789-793.

SIERRA, G. A simple method for the detection of lipolytic activity of micro-organisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie van Leeuwenhoek.* 1956, vol.23, p.15-22.

STAUBMANN, R.; NCUBE, I.; GUBITZ, G.M.; STEINER, W.; READ, J.S. Esterase and lipase activity in *Jatropha curcas* L. seeds. *J Biotechnol.* 1999, vol.75, p.117-126.

SZTAJER, H. y MALISZEWSKA, I. The effect of culture conditions on lipolytic productivity of *Penicillium citrinum*. Biotechnol. Lett. 1989, vol.11, p.895-898.

TAN, T.; ZHANG, M.; XU, J.; ZHANG, J. Optimization of cultura conditions and properties of lipase from *Penicillium camembertii* Thom PG-3. Process Biochem. 2004, vol. 39, p.1495-1502.

TSUJISACA, Y.; IWAI, M.; FUKUMOTO, T.; OKOMOTO, Y. Induced formation of lipase by *Geotrichum candidum* Link. Agri. Biol. Chem. 1973, vol.37, p.837-842.

UL-HAQ, I.; IDREES, S. y RAJOKA, M. I. Production of lipases by *Rhizopus oligosporous* by solid-state fermentation. Process Biochem. 2002, vol.37, p.637-641.

UNEP. Secretariat of the Basel Convention. Application Form for the placement or removal of waste on Annex VIII or Annex IX. 2001, p.1-3.

WINKLER, Michael. Tratamiento biológico de aguas de desecho. 6ta Reimpresión. Mexico, Editorial LIMUSA S.A. de C.V.,1999. 338 p. ISBN 968-18-1926-8

WU, W.H.; FOGLIA, T.A.; MARMER, W.N.; PHILLIPS, J.G. Optimizing production of ethyl esters of grease using 95% ethanol by response surface methodology. J. Am. Oil Chem. Soc. 1999, vol.76, p.517-521.

YADA, M.; KAWAGUCHI, H. y SASAKI, K. Bioconversion de wastes. Chijinshokan Press, Tokyo, Japan. 2001

ZINGG ROSSELL, Augusto Felipe. "Evaluación de la potencia, torque, consumo de combustible y emisión de particulados en un motor empleando petróleo Diesel y Biodiesel". Asesor: José Calle. Tesis Maestría. Universidad Nacional Agraria La Molina, Maestría en Ciencias Ambientales, Lima, 2004

Marco Legal consultado:

Perú. Ley N° 28054, del 7 de Agosto del 2003. Disponible en: www.adaalegreconsultores.com.pe/normas/Hidrocarburos/1.pdf

Perú. Decreto Supremo N° 021-2007-EM, del 18 de Abril del 2007. Disponible en: www.ansa.com.pe/uploads/DS%20%20021_2007_EM.pdf

XI.- ANEXOS

Marco Legal: Biocombustibles en el Perú

Base legal: Ley N° 28054

Ley que promueve el Mercado de Biocombustibles; establece en su Artículo 1° el marco general para promover el desarrollo del mercado de los Biocombustibles sobre la base de la libre competencia y el libre acceso a la actividad económica, con el objetivo de diversificar el mercado de combustibles, fomentar el desarrollo agropecuario y agroindustrial, generar empleo, disminuir la contaminación ambiental y ofrecer un mercado alternativo en la Lucha contra las Drogas.

En su Artículo 3°, como Políticas Generales, establece desarrollar y fortalecer la estructura científico-tecnológica destinada a generar la investigación necesaria para el aprovechamiento de los biocombustibles; y promover la formación de recursos humanos de alta especialización en materia de biocombustibles comprendiendo la realización de programas de desarrollo y promoción de emprendimientos de innovación tecnológica.

Además ese mismo artículo, establece como política incentivar la participación de tecnologías, el desarrollo de proyectos experimentales y la transferencia de tecnología adquirida, que permitan la obtención de biocombustibles mediante la utilización de todos los productos agrícolas o agroindustriales o los residuos de éstos.

Como disposición complementaria, la misma ley establece la creación del Programa de Promoción del uso de Biocombustibles: PROBIOCOM, el cual estará a cargo de PROINVERSIÓN, que tendrá por objeto promover las inversiones para la producción y comercialización de biocombustibles y difundir las ventajas económicas, sociales y ambientales de su uso.

En su segunda disposición complementaria se establece la constitución de una Comisión Técnica encargada de proponer y recomendar las normas y disposiciones complementarias para el cumplimiento de la presente Ley.

Decreto Supremo N° 021-2007-EM

En su artículo 1º, el presente reglamento establece los requisitos para la comercialización y distribución de los Biocombustibles, así como lo referente a las normas técnicas de calidad de los mencionados productos.

Artículo 4.- Definiciones

En el presente Reglamento se utilizarán los siguientes términos cuya definición se detalla a continuación:

Alcohol Carburante: Es el Etanol Anhidro Desnaturalizado, obtenido de la mezcla del Etanol Anhidro con la Sustancia Desnaturalizante en una proporción volumétrica no inferior a 2% (dos por ciento) ni superior a 3% (tres por ciento) en el caso de ser gasolina motor sin contenido de plomo.

Bases de Mezcla: Son las gasolinas de 97, 95, 90, 84 octanos y otras que se encuentren autorizadas para su comercialización en el país así como el Diesel N° 2, cuyas calidades se establecen en las Normas Técnicas Peruanas correspondientes.

Queda prohibido utilizar el Diesel N° 1 para mezclarlo con el Biodiesel B100.

Biocombustibles: Productos químicos que se obtienen a partir de materias primas de origen agropecuario, agroindustrial o de otra forma de biomasa y que cumplen con las normas de calidad establecidas por las autoridades competentes para su uso como combustible. Éstos pueden ser sólidos (biomasa), gaseosos (biogás, gas de gasificador u otros tipos de gas manufacturados a partir de residuos, carbón, etc) o líquidos.

Para fines del presente Reglamento entiéndase como Biocombustibles al Alcohol Carburante y al Biodiesel.

Biodiesel: Combustible compuesto de ésteres mono-alquílicos de ácidos grasos de cadenas largas derivados de recursos renovables tales como aceites vegetales o grasas animales, para ser usados en motores de ciclo Diesel.

Para fines del presente Reglamento se entiende como una sustancia oleaginosa obtenida a partir del aceite de palma, higuera, piñón, soya, colza, girasol y otros vegetales oleaginosos, así como grasas animales y aceites comestibles usados.

Diesel BX: Es la mezcla que contiene Diesel N° 2 y Biodiesel B100, donde X representa el porcentaje en base volumétrica de Biodiesel B100 contenido en la mezcla; siendo el diferencial volumétrico el porcentaje de Diesel N° 2.

Biodiesel B100: Biodiesel puro, sin mezcla alguna, que cumple las especificaciones establecidas en las Normas Técnicas Peruanas o, mientras éstas no sean aprobadas, la norma ASTM D 6751-06 en su versión actualizada o las correspondientes normas internacionales.

Etanol: Es el alcohol etílico cuya fórmula química es $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$ y se caracteriza por ser un compuesto líquido, incoloro, volátil, inflamable y soluble en agua.

Para los efectos de este Reglamento se entiende como el alcohol obtenido a partir de caña de azúcar, sorgo, maíz, yuca, papa, arroz y otros cultivos agrícolas.

Etanol Anhidro: Tipo de alcohol etílico que se caracteriza por tener como máximo 0,5% (cero coma cinco por ciento) de humedad y por ser compatible con las gasolinas con las cuales se puede mezclar para producir un combustible oxigenado para uso motor.

Gasohol: Es la mezcla que contiene gasolina (de 97, 95, 90, 84 octanos y otras según sea el caso) y Alcohol Carburante.

Sustancia Desnaturalizante: Gasolina natural, componentes de gasolina, gasolina sin plomo u otras sustancias añadidas al Etanol Anhidro, en una concentración volumétrica no inferior a 2% (dos por ciento) ni superior a 3% (tres por ciento) para convertirlo en no potable y evitar que sea destinado a usos diferentes al de componente oxigenante de combustibles para uso motor.

Artículo 9.- Porcentaje de la mezcla de Biodiesel B100 con Diesel N° 2

El porcentaje de Biodiesel B100 en la mezcla de Biodiesel B100 - Diesel N° 2 que se comercialice en el país, será desde 2% (dos por ciento) hasta 20% (veinte por ciento).

No está permitida la comercialización de mezclas en proporciones diferentes a las establecidas en la tabla siguiente:

% Vol. Biodiesel B100	% Vol. Diesel N°2	Denominación
2	98	Diesel B2
5	95	Diesel B5
20	80	Diesel B20

Artículo 10.- Cronograma para la comercialización de Biodiesel B100 y de Diesel BX:

La comercialización del Biodiesel B100 y del Diesel BX será de acuerdo al siguiente cronograma:

- A partir de la vigencia del presente Reglamento el Biodiesel B100 y el Diesel B20 podrán ser comercializados por los Distribuidores Mayoristas solamente a los Consumidores Directos autorizados por la Dirección General de Hidrocarburos para adquirir estos productos.

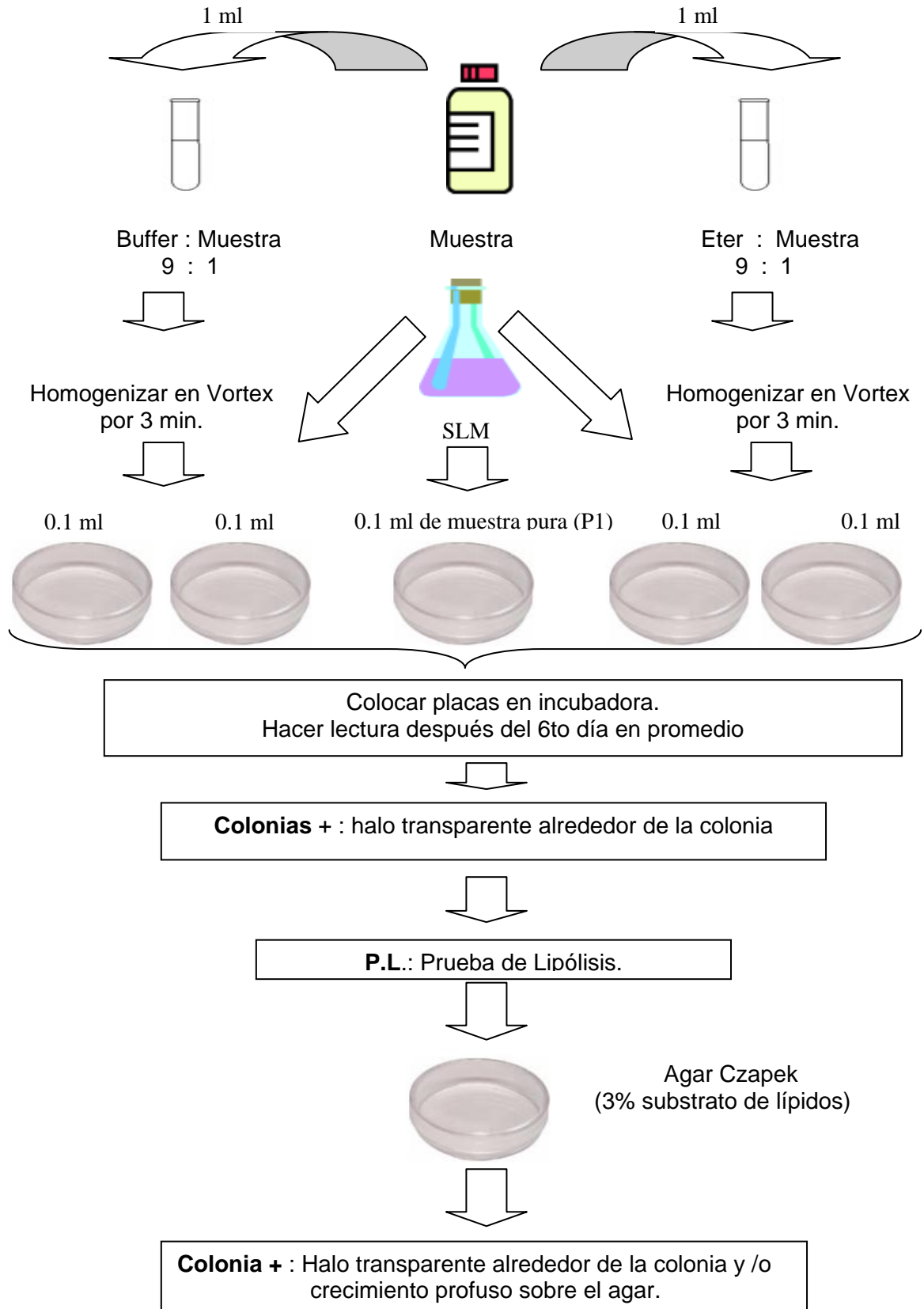
- A partir de la vigencia del presente Reglamento se podrá comercializar en todo el país el Diesel B2.

- A partir del 1 de enero de 2009 la comercialización de Diesel B2 será obligatoria en todo el país, en reemplazo del Diesel N° 2.

- A partir del 1 de enero de 2011 la comercialización de Diesel B5 será obligatoria en todo el país, en reemplazo del Diesel B2.

ORGANIGRAMA 1: Aislamiento de hongos lipolíticos según método

APHA modificado (Met. APHA modif.)



ORGANGRAMA 2: Aislamiento de hongos lipolíticos según Método Czapek.(Met. Czapek)

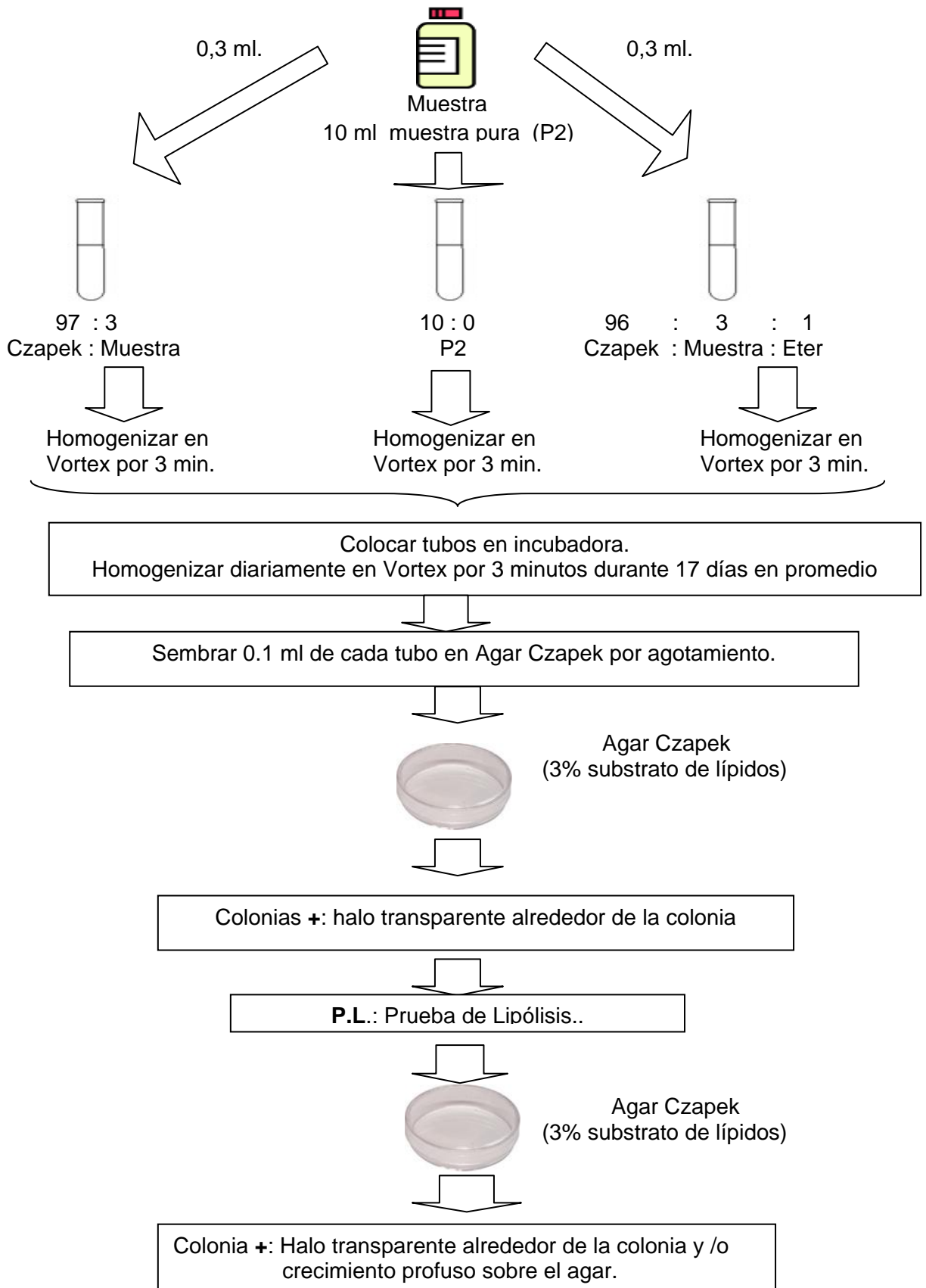


Tabla 2: Número de microorganismos lipolíticos (m.o.l.) y No lipolíticos (NO m.o.l.) que crecieron por el Método APHA modificado y Método Czapek

Muestra \ Método	APHA modificado		*Czapek
	NO m.o.l.	m.o.l.	m.o.l
M1	0	4	8
M2	6	9	11
M3	3	7	7
M4	0	11	10
M5	0	15	11
M6	9	9	3
Sub-total	18	55	50
Total de hongos lipolíticos	-	105	
Total de cepas aisladas	123		

*Para Método Czapek todas las cepas aisladas presentaron actividad de hidrólisis.

Tabla 3: Número de hongos lipolíticos aislados por muestra (M) con el Método APHA modificado empleando los diluyentes: Éter de petróleo (E), Buffer fosfato (B) y de la muestra pura sin diluyente (P1)

Método APHA modificado				
Muestra \ Inóculo	*B+M	**E+M	***P1	sub-total
M1	2	0	2	4
M2	4	0	5	9
M3	4	1	2	7
M4	8	1	2	11
M5	7	6	2	15
M6	7	2	0	9
sub total	32	10	13	
Total				55

* B+M : Buffer más Muestra.

** E+M : Éter más Muestra

*** P1 : sin diluyente.

Tabla 4: Número de hongos lipolíticos aislados por muestra (M) con el Método Czapek empleando Caldo Czapek (C) , Éter de petróleo (E) como diluyente adicional y de la muestra pura sin diluyente (P2)

Método Czapek.				
Submétodo Muestra	^C+M	^^C+M+E	^^^P2	sub-total
M1	3	2	3	8
M2	3	6	2	11
M3	4	1	2	7
M4	5	3	2	10
M5	3	5	3	11
M6	2	1	0	3
sub- total	20	18	12	
Total				50

^ C+M : Czapek+Muestra.

^^ C+M+E : Czapek+Muestra+Éter

^^^P2 : sin diluyente

Tabla 5: Días de inicio de actividad degradativa de los hongos aislados por muestra correspondiente al Método APHA modificado y Método Czapek, según el medio sólido empleado.

Método Muestra	APHA modif.		Czapek
	SLM	Agar Czapek	Agar Czapek
M1	11	5	6
M2	11	4	4
M3	11	5	8
M4	4	15	15
M5	2	14	10
M6	4	14	16

Tabla 6: Prueba de T-Students: Análisis de medias del número total de hongos lipolíticos aislados según métodos.

Método	+N	Media	Desviación típica	*P
APHA modif.	18	3,06	2,58	0,69*
Czapek	18	2,78	1,52	

*P=0.69 (P>0.05). No existe diferencias significativas

+N= total de tratamientos por número de muestras

Tabla 7: Prueba de Mann Whitney : Análisis de medias del número de hongos lipolíticos según muestras individuales por métodos

Muestra		°n	Media+	Desviación típica	P
M1	APHA	3	1,33	1,15	0,2*
	Czapek	3	2,67	0,58	
M2	APHA	3	3,00	2,65	0,39*
	Czapek	3	3,67	2,08	
M3	APHA	3	2,33	1,53	0,99*
	Czapek	3	2,33	1,53	
M4	APHA	3	3,67	3,79	0,7*
	Czapek	3	3,33	1,53	
M5	APHA	3	5,00	2,65	0,7*
	Czapek	3	3,67	1,15	
M6	APHA	3	3,00	3,61	0,7*
	Czapek	3	1,00	1,00	

+Prueba de Mann Whitney.

*P > 0,05 . No existen diferencias significativas

°n : Número de inóculos de Met. APHAModif. : B+M, E+M, P1 ; y Met. Czapek : C+M, C+M+E, P2.

Tabla 8: Análisis de Varianza (ANOVA) y Prueba de Comparaciones Múltiples de Tukey: Comparación de medias del número de hongos lipolíticos entre los tipos de inóculos empleados

Parámetro Método: Tipo de Inóculo		N	Media	Desviación típica	¹ ANOVA	² Prueba Tukey						
						M.APHAmo dif.			M.Czapek			
						B+M	E+M	P1	C+M	C+M+E	P2	
M.APHA modif	B+M	6	5,33	2,34	*P =0,01		** P=0.017				***P=0.036	
	E+M	6	1,67	2,25								
	P1	6	2,17	1,60								
M.Czapek	C+M	6	3,33	1,03								
	C+M+E	6	3	2,10								
	P2	6	2	1,10								

¹ ANOVA : * P= 0.01 <0.05 existe diferencias significativas.

² Prueba Tukey : ** P= 0.017<0.05 existe diferencias significativas.

***P= 0.036<0.05 existe diferencias significativas.

N : Número de muestras procesadas

FE DE ERRATAS

Página 56 (Referencias bibliográficas), debe incluirse la siguiente referencia:

HARALDSSON, G. G. Marine Lipids Biotechnology. 1991 v.7, p.337.

Página 61 (Referencias bibliográficas), debe incluirse la siguiente referencia:

STCKLEIN, W.; SZTAJER, H. ;MENGE, U.; SHIMID, R. Purification and properties of lipase from *Penicillium expansum*. Biochemica. Biophys. Acta. 1993, vol. 1168, p.181-189.