

Actividad lipolítica de hongos aislados del aceite de cocinar usado y de suelos de talleres mecánicos



Lipolytic activity of fungi isolated from used cooking oil and machine shop floors

Pérez, Zulma; Uriarte Ortiz, Rommel; Gazo, Gabriela

 Zulma Pérez

kzulma@gmail.com

Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua,
Managua, Nicaragua

 Rommel Uriarte Ortiz

Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua,
Managua, Nicaragua

 Gabriela Gazo

Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua,
Managua, Nicaragua

Revista Torreón Universitario

Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua-Managua,
Nicaragua
ISSN: 2410-5708
ISSN-e: 2313-7215
Periodicidad: Cuatrimestral
vol. 10, núm. 27, 2021
revis.torreon.faremc@unan.edu.ni

Recepción: 07 Mayo 2020
Aprobación: 09 Octubre 2020

URL: <http://portal.amelica.org/ameli/jatsRepo/387/3871840011/index.html>

DOI: <https://doi.org/10.5377/torreon.v10i27.10845>

Financiamiento

Fuente: Financiado por Vice-Rectoría de Investigación, Posgrado y Extensión Universitaria, de la UNAN-Managua a través de los Fondos para Proyectos de Investigación (FPI). Inició en el año 2016 y finalizó en mayo del 2020.
Autor de correspondencia: kzulma@gmail.com

El autor o los autores de los artículos, ensayos o investigaciones conceden a la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, Managua (UNAN-Managua) los derechos de edición (copyright) del trabajo enviado, por consiguiente la Universidad cuenta con el derecho exclusivo para publicar el artículo durante el periodo completo de los derechos de autor.



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-SinDerivar 4.0 Internacional.

Resumen: El objetivo de la investigación era seleccionar el género con mayor actividad enzimática mediante la utilización de aceite de cocinar usado como única fuente de sustrato, por lo que se aislaron hongos del aceite de cocinar usado y de suelos contaminados por talleres mecánicos. Las muestras se inocularon en medios generales para hongos (agar PDA), al obtener cultivos axénicos fueron inoculados en agar tributirín, los géneros se identificaron mediante microscopía de campo claro y contraste de fase. En el medio selectivo se consideró como indicador de géneros lipolíticos, la presencia de halo alrededor de la colonia o cristalización cercana a la colonia. Los géneros identificados en suelo fueron *Fusarium* y *Aspergillus*, en el aceite se identificó el género *Aspergillus*. Se realizaron ensayos con aireación, sin aireación, en los ensayos sin aireación se evaluó la interacción entre los géneros aislados del suelo a lo que llamamos consorcio. La actividad enzimática en la primera fase para el género *Aspergillus* en ensayos sin aireación, aislado del aceite fue de 0.0148 (U/ml). Para *Aspergillus* y *Fusarium* aislados del suelo la actividad enzimática fue de 0.0051 y 0.0055 (U/ml) respectivamente; en el consorcio fue de 0.003 U/ml. El género *Aspergillus* aislado del aceite presentó mayor actividad enzimática y fue seleccionado para la segunda fase de medición de actividad lipolítica. La mayor actividad enzimática 0.0777 (U/ml) se obtuvo a las 144 horas, cuando el cultivo fue evaluado con aireación / alimentación continua. Cuando los cultivos eran aireados/alimentación discontinua, la actividad enzimática fue similar a la alcanzada sin aireación (0.026 y 0.034 (U/ml) respectivamente). Estos resultados sugieren que los géneros estudiados son capaces de utilizar el aceite de cocinar usado como única fuente de carbono para sus procesos metabólicos.

Palabras clave: Hongos lipolíticos, lipasa, actividad enzimática, aceite de cocinar usado.

Abstract: The objective of the research was to select the genus with the highest enzymatic activity by using used cooking oil as the only source of the substrate. Fungi were isolated from used cooking oil and from contaminated soils by mechanical car repair shops. The samples were inoculated in general fungal media (PDA agar), when obtaining axenic cultures they were inoculated in selective agar for lipolytic fungi (tributyryn agar), the genus were identified by bright field microscopy and phase contrast. In the selective medium, the presence of halo around

the colony or crystallization close to the colony was considered as an indicator of lipolytic genus. The genus identified in soil were *Fusarium* and *Aspergillus*, the genus *Aspergillus* was identified in the oil. The tests were carried out with aeration, without aeration, in the tests without aeration, the interaction between the genres isolated from the soil was evaluated, which was named consortium. The enzymatic activity in the first phase for the genus *Aspergillus* in tests without aeration, isolated from the oil was 0.0148 (U/ml). For *Aspergillus* and *Fusarium* isolated from the soil, the enzymatic activity was 0.0051 and 0.0055 (U / ml) respectively; in the consortium it was 0.003 U/ml. The genus *Aspergillus* isolated from the oil showed higher enzymatic activity and was selected for the second phase of lipolytic activity measurement. The highest enzymatic activity 0.0777 (U / ml) was obtained at 144 hours, when the culture was evaluated with aeration interrupted and continuous feeding. When the cultures were subjected to an aeration interrupted and discontinuous feeding, the enzymatic activity was similar to that achieved without aeration (0.026 and 0.034 (U / ml) respectively). These results suggest that the genus studied are capable of utilize used cooking oil as the only carbon source for their metabolic processes.

Keywords: Lipolytic fungi, lipase, enzyme activity, used cooking oil.

INTRODUCCIÓN

Las lipasas son proteínas ubicuas distribuidas ampliamente en la naturaleza, presentes en los animales, en las plantas y en los microorganismos, generalmente las secretan al medio extracelular, facilitando así, los procesos de extracción y purificación para la industria (Rabbani, y otros, 2013).

La variabilidad, adaptabilidad y ventajas en la producción de lipasas microbianas, ha permitido su promoción dentro del grupo de las enzimas más producidas en el mundo, con aplicaciones biotecnológicas en el procesamiento de alimentos lácteos, aceites, detergentes, cosméticos, cuero, productos farmacéuticos, papel, producción de surfactantes, biodiesel y recientemente como una alternativa promisorio para el tratamiento de aguas residuales contaminadas con altos contenidos de lípidos. Las lipasas microbianas son muy apreciadas como biocatalizadores debido a sus características peculiares, como la capacidad de utilizar una amplia gama de sustratos, alta actividad y estabilidad. Sin embargo, en ciertos segmentos industriales el uso de lipasas todavía está limitado por su alto costo. Por lo tanto, hay un gran interés en la obtención de lipasas de bajo costo, altamente activas y estables que se pueden aplicar en diferentes ramas industriales (Anobom, y otros, 2014).

Las lipasas (triacilglicerolacil hidrolasas, EC. 3.1.1.3), son enzimas con actividad biológica sobre el enlace éster de las moléculas de triacilglicerol presentes en las grasas o en los aceites. Cuando actúan en medio acuoso pueden producir glicerol, ácidos grasos, monoglicéridos y diglicéridos, mientras que, en ausencia de agua, la reacción es reversible (esterificación, interesterificación, y transesterificación), generando glicéridos (Pedroza Padilla, Romero Tabarez, & Orduz, 2017).

NOTAS DE AUTOR

kzulma@gmail.com

Esta investigación surge al analizar el impacto ambiental de la deposición final del aceite de cocinar usado en Nicaragua, proveniente de los comedores de instituciones, comedores populares, restaurantes y hoteles. El aceite de cocinar usado no es colectado de manera adecuada, no existe una regulación que controle estos vertidos. La única empresa que promueve la colecta de este desecho es la Empresa de Productos verdes en el Laboratorio de Biotecnología en la UNAN-Managua y lo utiliza como materia prima para la elaboración de jabón de limpieza. En el caso de los suelos contaminados en los talleres de mecánica, los aceites son vertidos directamente al suelo sin tratamiento previo. Al aislar géneros fúngicos capaces de utilizar hidrocarburos y aceites de cocinar usado como sustrato, podrían ser utilizados en la industria para producir enzimas y biorremediar suelos y aguas contaminadas.

La actividad de la lipasa puede ser determinada cualitativa y cuantitativamente, el objetivo principal de la investigación era seleccionar el género con mayor actividad enzimática mediante la utilización de aceite de cocinar usado como única fuente de sustrato.

Los ensayos se hicieron en sistemas de fermentación con sustrato sólido modificado, sin aireación, con aireación interrumpida/alimentación discontinua y aireación interrumpida/alimentación continua. Para un proceso de fermentación con sustrato sólido, pueden utilizarse matrices biológicas, es decir, sustratos naturales, o soportes inertes, estos son sustratos sintéticos impregnados. La elección de uno u otro tipo de soporte dependerá de las particularidades del proceso y del tipo de producto que se quiere obtener. Teniendo en cuenta esto, la mayoría de los procesos desarrollados en los últimos años se han valido de sustratos naturales que provienen de procesos agroindustriales y que mayormente son subproductos sin valor económico. De esta forma, este tipo de fermentación se plantea cada vez más como una alternativa para agregar valor y aprovechar materia orgánica. En los ensayos se trabajó con un medio de sales minerales básicas, utilizando como sustrato sólido el bagazo de caña.

METODOLOGÍA

Colecta de muestra del aceite de cocinar usado

Del aceite almacenado en barriles en la empresa de productos verdes, se tomaron submuestras al azar, posteriormente se hizo homogenización para obtener una muestra final, ésta se dejó expuesta al ambiente para que las esporas fúngicas colonizaran la superficie.

Colecta de muestra de suelos contaminados en talleres mecánicos

Se colectaron submuestras al azar en áreas donde se observó presencia de aceite, luego se hizo homogenización para obtener una muestra final y de ésta se hicieron las inoculaciones.

Aislamiento

Las muestras de suelo y aceite se inocularon directamente en agar papa dextrosa, éste medio de cultivo es no selectivo, su uso está indicado especialmente para el aislamiento de hongos filamentosos y levaduras. Se hizo uso de dos técnicas de inoculación, derrame en placa y extensión en superficie o por agotamiento. En ambas técnicas se utilizó como sustrato aceite de cocinar usado, esterilizado con filtros de 0.22 μm , se incubaron durante 7 días a 35 °C.

Aislamiento en agar tributirín

Una vez obtenidos cultivos axénicos de ambas matrices, fueron inoculados en agar tributirín, éste se usa para la detección de microorganismos lipolíticos. La digestión péptica del tejido animal y el extracto de levadura proporcionan nutrientes a los microorganismos. La degradación del tributirín por los microorganismos, se reconoce por zonas claras que rodean las colonias lipolíticas en el medio de cultivo turbio. Se incubaron durante 7 días a 35 °C.

Identificación microscópica de los géneros fúngicos aislados

Las colonias de los cultivos axénicos aislados en agar tributirín fueron observados en el microscopio, se utilizó la técnica de cinta adhesiva, porque se conserva la yuxtaposición original de las esporas y segmentos de hifas; consiste en tomar con ayuda de pinzas, una tira de cinta de 4 cm aproximadamente, con el lado adhesivo hacia afuera, presionando firmemente contra la superficie de la colonia del hongo, luego, la cinta se colocó en un portaobjetos conteniendo una gota de azul de lactofenol. (Arias Cifuentes & Piñeros Espinoza, 2008). Para la identificación de los géneros, se utilizaron claves dicotómicas según fitopatología de Agrios.

Producción de lipasa con sistemas de fermentación con sustrato sólido sin aireación, con géneros aislados del aceite de cocinar usado y del suelo contaminado por talleres mecánicos

El medio de cultivo estaba compuesto por (g/L): NaH_2PO_4 1,2, KH_2PO_4 2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 y CaCl_2 0.25. (Gwen Falony, Armas, Dustet Mendoza, & Martínez Hernández, 2006). Los ensayos se realizaron por triplicado, a cada Erlenmeyer de 100 ml se le agregaron 20 ml de medio de cultivo, más 1 ml de suspensión de esporas (10^7 UFC/ml) en solución salina. La fuente de carbono fue el aceite de cocinar usado 2% (v/v), éste fue aplicado en forma de emulsión en buffer de fosfato y como sustrato sólido bagazo de caña 2 % (p/v). Los ensayos duraron 8 días, a 35 °C, sin aireación. Además de hacer los ensayos con cada uno de los géneros identificados por cada matriz, se realizaron montajes en consorcio fúngico (*Aspergillus sp.* y *Fusarium sp.* en suelo), para evaluar su interacción entre géneros y por consiguiente la actividad enzimática. Se consideró una interferencia analítica, la coloración del bagazo de caña en el medio de cultivo, por lo tanto, se decidió montar un control, el cual contenía medio de cultivo más bagazo, en las mismas condiciones que los ensayos con géneros fúngicos identificados. Una vez cuantificada la concentración de lipasas en las muestras se procedió a restar la concentración identificada en el control, se aplicó lo mismo en todos los ensayos.

Producción de lipasa con sistemas de fermentación con sustrato sólido, con aireación interrumpida/alimentación discontinua, con géneros aislados del aceite de cocinar usado.

El medio de cultivo estaba compuesto por (g/L): NaH_2PO_4 1,2, KH_2PO_4 2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 y CaCl_2 0.25. (Gwen Falony, Armas, Dustet Mendoza, & Martínez Hernández, 2006). Los ensayos se realizaron por triplicado, a cada Erlenmeyer de 100 ml se le agregó 20 ml de medio de cultivo, más 1 ml de suspensión de esporas (10^7 UFC/ml) en solución salina. La fuente de carbono fue el aceite de cocinar usado 2% (v/v) éste fue aplicado en forma de emulsión en buffer de fosfato y como sustrato sólido bagazo de caña 2 % (p/v). Los ensayos duraron 8 días, a 35 °C, con aireación interrumpida.

Producción de lipasa con sistemas de fermentación con sustrato sólido, con aireación interrumpida/alimentación continua

El ensayo fue hecho en percoladores, compuestos por unidades de filtración con capacidad de 500 ml, la cámara superior y la receptora con graduación. Dos vías laterales permiten la conexión a la línea de vacío, los adaptadores con tubos de vacío de 1/4 a 5/16 de pulgada (de 6 a 8 mm) de diámetro interior. El equipo de filtración fue conectado a una bomba de vacío, la cual estaba controlada por un temporizador, cuyo funcionamiento estaba programado cada 5 minutos de trabajo y 15 minutos de descanso, los cultivos fueron aireados de manera interrumpida, garantizándoles 5 minutos de aireación durante los 10 días de ensayo a 35 °C. El medio de cultivo utilizado fue el mismo que en la producción de lipasa sin aireación. Las muestras fueron colectadas a las 0, 48, 96, 144 y 240 horas.

Cada dos días se le agregó 25 ml de medio de cultivo (para evitar el agotamiento de nutrientes), 1 ml de aceite de cocinar usado estéril (filtro 0.22 μm) y emulsificado en buffer de fosfato estéril (autoclave). La cantidad de esporas utilizada fue la misma que en los ensayos sin aireación. En cada ensayo se realizó el montaje de un control, el cual era restado al realizar la cuantificación de la actividad enzimática de lipasa.

El bagazo utilizado en los ensayos sin aireación y con aireación era previamente tamizado (850 μm) y posteriormente esterilizado en autoclave.

Análisis cuantitativo de actividad enzimática

La lipasa extracelular de todos los aislamientos fue cuantificada por método espectrofotométrico. Se midió la hidrólisis del p-NPP para liberar p-nitrofenol (p-NP). Para preparar la curva de calibración, se utilizó el método propuesto por (Margesin & Shinner, 2005) con modificaciones. Se disolvió 1.25 mg de p-nitrofenol (p-NP) en una solución buffer y se aforó a 25 ml, la concentración era de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Como sustrato se utilizó el p-NPP a una concentración de 20 mM, éste se disolvió en 2-propanol. El buffer de fosfato utilizado $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ (100 mM se ajustó a pH 7.25 con una solución de hidróxido de sodio 1N).

Curva de calibración

Se preparó una curva estándar (62.5, 50, 37.5, 25, 12, 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$) para cuantificar actividad enzimática en función de la concentración de pNP, para aforar a 5 ml se utilizó la solución buffer de fosfato con pH 7.25, fueron preparados en tubos cónicos de polipropileno para centrifuga.

Para la lectura del blanco se agregaron 5 ml de solución buffer en el tubo cónico, se agitó cada uno de los tubos durante 5 segundos en vórtex, se incubaron durante 10 min a 40 °C. Luego se procedió a leer los tubos en espectrofotómetro a 410 nm, la solución buffer era utilizada como blanco para calibrar el equipo.

Procedimiento para la lectura de las muestras

Previo a la lectura de las muestras se les agregó 25 ml de agua destilada y se filtraron, a cada tubo de polipropileno se le agregó 4 ml de buffer y 800 μl de muestra y se incubó a 40 °C durante 10 minutos, luego se le agregó 200 μl de sustrato (pNPP) y se incubaron nuevamente durante 10 minutos a 40 °C, la reacción se detuvo con hielo durante 10 minutos, se centrifugó durante tres minutos a 3000 rpm y se leyó a 410 nm al igual que la curva de calibración. (Sadati, Barghi, & Larki, 2015).

Cálculos y expresión de resultados

Se calculó la concentración de pNP de las muestras mediante la curva de calibración, a ésta se le restó la concentración de pNP calculada en la muestra control. Una unidad de enzima se definió como 1 μ mol de 4-nitrofenol, enzimáticamente liberado del sustrato en mililitros por minuto (ml / min).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento de microorganismos lipolíticos en agar tributirín

Algunos métodos donde la producción de lipasa es confirmada por la formación de zonas turbias o cristales blancos alrededor de las colonias en el agar. Es posible usar medios de agar con sustratos o tintes indicadores agregados para detección de organismos lipolíticos. La identificación cualitativa incluye ensayos de difusión en gel, basados en la incorporación de lípidos, sustratos en los medios y ensayos basados en la adición de un tinte de color en los medios. (Lanka & Latha, 2015).

De la muestra de aceite se identificó el género *Aspergillus*. De la muestra de suelo contaminada, se identificaron dos géneros, *Aspergillus* y *Fusarium*.

Aunque en ambas matrices se identificó el género *Aspergillus*, no se puede asegurar que sean la misma especie.

En la figura 1, imagen a), se observa la formación de halos alrededor de las colonias, esta colonia fue aislada del aceite de cocinar usado. La imagen b) es una colonia aislada de los suelos contaminados por talleres mecánicos, a pesar que ambas matrices se inocularon en el mismo medio de cultivo bajo las mismas condiciones. El comportamiento de estos géneros fue diferente. Para el género *Fusarium* (Fig. 1 b), se observó cristalización alrededor de la colonia, el cual es un indicador de microorganismo lipolítico.

En ensayos realizados por (Sierra, 1957), agregaron tween como sustrato en los medios de cultivo, se observó alrededor de las colonias de microorganismos lipolíticos la formación de un halo, esto se debe a los cristales de sales de calcio, del ácido graso liberado por la lipólisis.

En estudio realizado por (Gopinath, Anbu, & Hilda, 2005) aislaron hongos de cinco muestras de estaciones diferentes, contaminadas por residuos de aceites, los inocularon previamente en agar PDA y luego realizaron evaluación cualitativa para hongos lipolíticos, en diferentes medios sólidos (medio de cultivo sólido con tween 20, LTB agar y agar tributirín), para determinar cuál de las especies presentaba el halo con mayor diámetro, este patrón de comportamiento es indicador de la producción de lipasa extracelular en el medio; se observó el desarrollo de una zona clara cristalizada en el medio sólido, donde se le agregó tween 20 como sustrato, lo que tomaron como criterio para considerar a *Aspergillus fumigatus* y *Aspergillus nidulans* como microorganismos lipolíticos, la reacción en este medio por la lipasa extracelular, fue observada desde los primeros días de incubación; sin embargo, en especies como *Aspergillus niger* y *Aspergillus versicolor*, la actividad lipolítica se visualizó después de 72 horas de incubación. El pico de la mayor actividad enzimática (>7cm) ocurrió a 168 horas para *Aspergillus fumigatus* y *Aspergillus nidulans*. Para especies como *Aspergillus clavatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus versicolor* y *Fusarium sp.* se observó una débil actividad lipolítica con halos menores a 4 cm. Con respecto a la evaluación de las especies fúngicas analizadas en agar tributirín, el comportamiento fue diferente en comparación a los resultados utilizando tween 20 como sustrato. El tributirín es un sustrato convenientemente utilizado, no necesita adición de emulsificadores, la hidrólisis del tributirín por microorganismos fúngicos puede ser evaluada cualitativamente, midiendo el incremento del diámetro de la zona clara. *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus versicolor*, y *Fusarium sp.* presentaron halo después de 48 horas de incubación. *Aspergillus ochraceus* presentó

actividad lipolítica después de 72 horas de incubación. En este estudio los halos en los géneros identificados (*Aspergillus* y *Fumigatus*) se observaron después de los 5 días de incubación en agar tributirín.

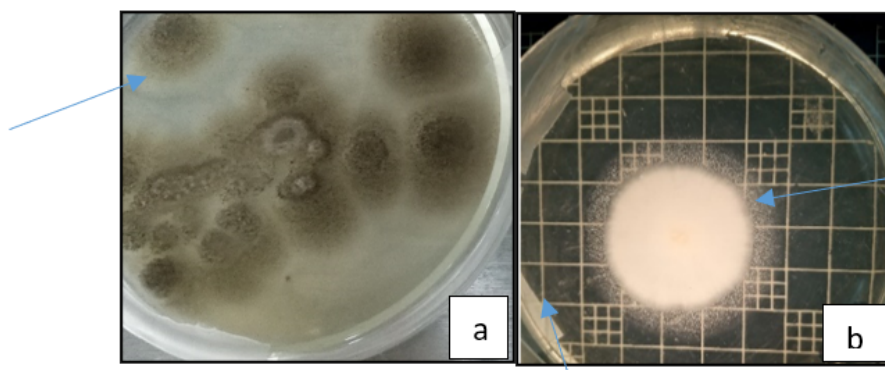


FIGURA 1

a) Género *Aspergillus* aislado del aceite de cocinar usado. b) Género *Fusarium* aislado de suelos contaminados por talleres mecánicos.

Actividad enzimática sin aireación con géneros aislados del aceite de cocinar usado y del suelo contaminado por talleres mecánicos

Las lipasas son producidas por muchos microorganismos, al igual que otras enzimas de la familia de las hidrolasas, como las esterases. Entre los microorganismos, los hongos son ampliamente reconocidos como fuentes preferibles de lipasa porque generalmente producen la enzima de manera extracelular, lo que facilita la recuperación de la enzima del caldo de fermentación (Rai, Shrestha, Sharma, & Joshi, 2014).

En la figura 2 se observan los géneros identificados por matrices, en la matriz suelo se identificaron los géneros *Aspergillus* y *Fusarium* y en aceite solamente se identificó *Aspergillus*.

La figura 2 muestra la interacción entre los géneros *Aspergillus* y *Fusarium* (Consortio (s)), la actividad enzimática determinada en el consorcio fue de 0.003 U/ml (considerada baja), esto podría deberse a que uno de los dos géneros es altamente competitivo por nutrientes presentes en el medio.

La actividad determinada en los géneros de manera individual *Aspergillus* (s) y *Fusarium* (s), fue de 0.0051 y 0.0055 respectivamente, no hubo diferencia significativa entre ellos. El género *Aspergillus* aislado del aceite, presentó actividad enzimática 27 veces aproximadamente más alta, que la actividad enzimática determinada en los géneros aislados del suelo.

Estos resultados pueden deberse a que los géneros identificados, son capaces de utilizar el aceite de cocinar usado como única fuente de carbono. La baja actividad enzimática en géneros como *Fusarium*, podría deberse a que la producción de enzima es expresada de manera intracelular debido a que probablemente estos géneros no presentan mecanismos para expresión extracelular.

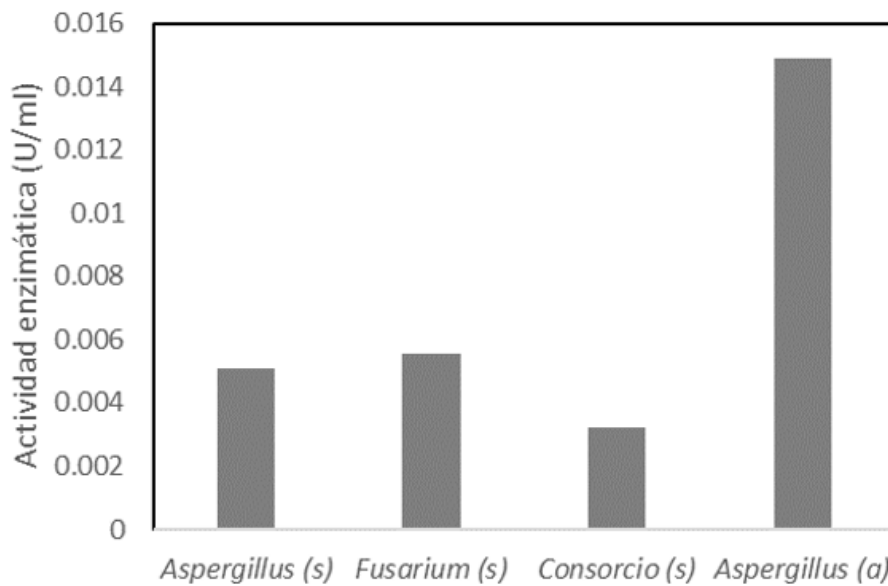


FIGURA 2

Actividad enzimática mediante géneros identificados aislados del suelo contaminado por aceites de talleres mecánicos y provenientes del aceite de cocinar usado. s: Géneros identificados en suelos contaminados por talleres mecánicos a: Géneros identificados en aceite contaminados por talleres mecánicos

Actividad enzimática con aireación interrumpida/alimentación discontinua

La aireación, fue mediante un sistema innovador, que consistió en el diseño de un temporizador adaptado a una bomba de vacío para oxigenar de manera interrumpida los cultivos, No hubo diferencia significativa en los resultados de actividad enzimática, entre los cultivos aireados (0.0267 U/ml), y sin aireación 0.03482 (U/ml); ambos ensayos tenían la misma concentración de sustrato. Esto puede deberse a que el sustrato no fue suficiente y condujo al estrés de los microorganismos. (Fig.3)

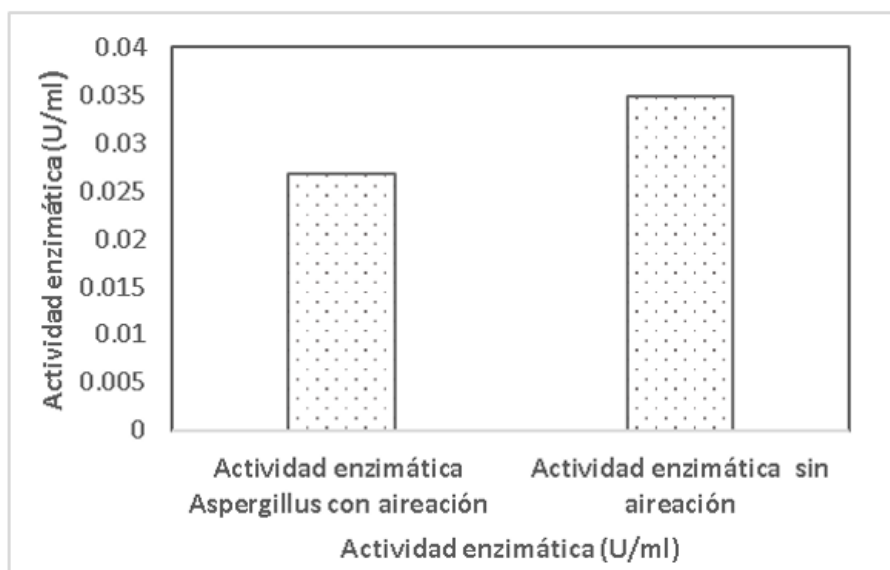


FIGURA 3

Género *Aspergillus* con mayor actividad enzimática (U/ml)

Actividad enzimática con aireación interrumpida/alimentación continua

En la figura 4 se observa la actividad enzimática del género *Aspergillus*. Basado en ensayos previos donde se registró baja actividad enzimática, se realizaron montajes suministrando alimentación continua y aireación interrumpida, la mayor actividad enzimática calculada (0.0777 U/ml) fue alcanzada a las 144 horas, siendo mayor dicha actividad al sistema de fermentación anterior.

Se han realizado ensayos para la producción de etanol con *Saccharomyces cerevisiae* (Laopaiboon, Thanonkeo, Jaisil, & Laopaiboon, 2007), se compararon sistemas de fermentación con alimentación continua y discontinua, los resultados demuestran que la producción de etanol mejoró en términos de concentración y rendimiento del producto, utilizando sistemas de fermentación continua.

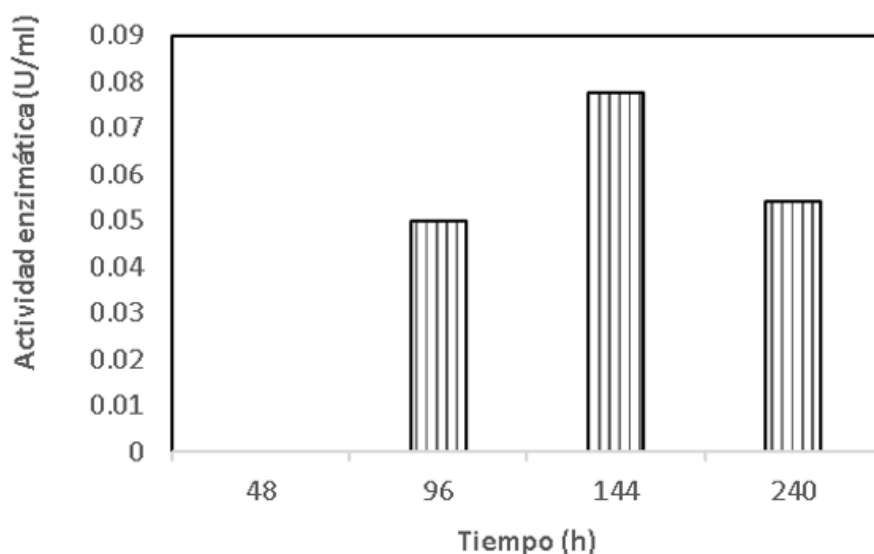


FIGURA 4

Actividad enzimática con aireación interrumpida y alimentación continua

En la figura 5 se comparan los valores de las actividades enzimáticas en diferentes condiciones. La mayor actividad enzimática (0.0777 U/ml) fue alcanzada cuando el cultivo era sometido a alimentación continua con aireación a las 144 horas, sin embargo, cuando el cultivo era aireado y con alimentación discontinua, la actividad enzimática fue similar a la alcanzada sin aireación (0.026 y 0.034 (U/ml) respectivamente). Esto probablemente se deba a que, aunque el cultivo era aireado, la cantidad de sustrato y el medio nutritivo no eran suficientes.

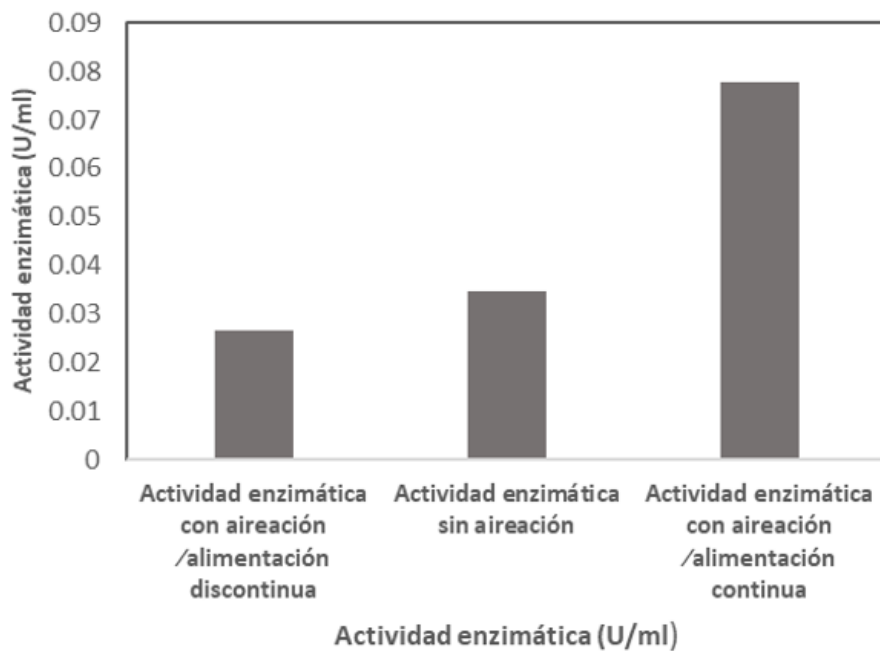


FIGURA 5
Comparación de la actividad enzimática del género *Aspergillus* con aireación/alimentación discontinua, sin aireación y aireación/alimentación continua.

CONCLUSIONES

Los resultados demuestran que los géneros identificados especialmente el Género *Aspergillus*, tiene la capacidad de utilizar el aceite de cocinar usado como única fuente de carbono.

Al proporcionar aireación y alimentación continua a los cultivos, la actividad enzimática se duplicó en comparación con los cultivos con aireación y alimentación discontinua.

Los ensayos fueron adaptados a sistemas innovadores y económicos de aireación.

Este estudio es el precedente para posteriores ensayos, donde se pretende mejorar la producción de la enzima lipasa, para ser purificada y comercializada.

Otro trabajo a tomar en cuenta que resultó de este estudio, es la posibilidad de utilizar estos géneros fúngicos, en la biorremediación de sitios contaminados por aceites e hidrocarburos.

AGRADECIMIENTOS

A la Vice-Rectoría de Investigación, Posgrado y Extensión Universitaria y a la Dirección de Investigación de la UNAN-Managua, por el financiamiento a través de los Fondos para Proyectos de Investigación (FPI).

A la Doctora Martha Lacayo Directora de Laboratorio de Biotecnología por apoyar siempre la investigación.

A Pablo Vallecillo por diseñar el temporizador para la aireación de los cultivos.

A Gabriela García Gazo por su apoyo incondicional en la realización de los ensayos.

BIBLIOGRAFÍA

- Anobom, C. D., Pinheiro, A. S., De-Andrade, R. A., Agueiras, E. C., C., A. G., Moura, M. V., ... Freire, D. M. (2014). From structure to catalysis: Recent Developments in the Biotechnological application of Lipases. *BioMed Research International*, 2014, 1-11. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/684506>
- Arias Cifuentes, E. L., & Piñeros Espinoza, P. A. (2008). Aislamiento e identificación de hongos filamentosos de muestras de suelos de los páramos de Guasca y Cruz verde. (Tesis de grado) Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.
- Gopinath, S., Anbu, P., & Hilda, A. (2005). Extracellular enzymatic activity profiles in fungi isolated from oil-rich environments. *Mycoscience*, 46, 119-126. <https://doi.org/10.1007/s10267-004-0221-9>
- Gwen Falony, G., Armas, J. C., Dustet Mendoza, J. C., & Martínez Hernández, J. L. (2006). Production of Extracellular Lipase from *Aspergillus niger* by Solid-State Fermentation. *Food Technol. Biotechnol.*, 44(2), 235-240.
- Lanka, S., & Latha, N. L. (2015). A Short Review on Various Screening Methods to Isolate Potential Lipase Producers: Lipases-the Present and Future Enzymes of Biotech Industry. *International Journal of Biological Chemistry*, 9(5), 207-219. <https://doi.org/10.3923/ijbc.2015.207.219>
- Laopaiboon, L., Thanonkeo, P., Jaisil, P., & Laopaiboon, P. (2007). Ethanol production from sweet sorghum juice in batch and fed-batch fermentations by *Saccharomyces cerevisiae*. *World J Microbiol Biotechnol*, 1497-1501. <https://doi.org/10.1007/s11274-007-9383-x>
- Margesin, R., & Shinner, F. (2005). *Manual of soil Analysis*. Heidelberg, Germany: Springer.
- Pedroza Padilla, C. J., Romero Tabarez, M., & Orduz, S. (2017). Actividad lipolitica de microorganismos aislados de aguas residuales contaminados con grasas. *Biotecnología en el sector Agropecuario y Agroindustrial.*, 15(1), 36-44. [http://dx.doi.org/10.18684/BSAA\(15\)36-44](http://dx.doi.org/10.18684/BSAA(15)36-44)
- Rabbani, M., Reza Bagherinejad, M., Sadeghi, H. M., Shariat, Z. S., Etemadifar, Z., Moazen, F., ... Zaghian, S. (2013). Isolation and characterization of novel thermophilic lipase-secreting bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(4), 1113-1119.
- Rai, B., Shrestha, A., Sharma, S., & Joshi, J. (2014). Screening, Optimization and Process Scale up for Pilot Scale Production of Lipase by *Aspergillus niger*. *Biomedicine and Biotechnology*, 2(3), 54-59. <https://doi.org/10.12691/bb-2-3-3>
- Sadati, R., Barghi, A., & Larki, R. A. (2015). Isolation and Screening of Lipolytic Fungi From Coastal Waters of the Southern Caspian Sea (North of Iran). *Jundishapur J Microbiol.*, 8(4), 1-7. [https://doi.org/10.5812/jjm.8\(4\)2015.16426](https://doi.org/10.5812/jjm.8(4)2015.16426)
- Sierra, G. (1957). A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *J. Microbiol.*, 23, 15-22.