

EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD LIPOLÍTICA EN AISLAMIENTOS DE *Fusarium* spp. Y APLICACIÓN DE INTERÉS NUTRICIONAL DE LIPASAS MICROBIANAS

SINDY CAROLINA CASTILLO RAMIREZ



TRABAJO DE GRADO

**Presentado como requisito parcial para optar por los títulos de
MICROBIÓLOGA INDUSTRIAL
NUTRICIONISTA Y DIETISTA**

María Ximena Rodríguez Bocanegra, PhD
DIRECTORA MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL
Ángela María Alvarado Fernández, Mbio.
CO-DIRECTORA MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL

Lilia Yadira Cortés Sanabria ND., MSc., PhD.
DIRECTORA NUTRICIÓN Y DIETÉTICA

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
PROGRAMA DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL
PROGRAMA DE NUTRICIÓN Y DIETÉTICA
BOGOTÁ
2013**

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la resolución N°13 de julio de 1946

“La universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por qué las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia.”

AGRADECIMIENTOS

A Dios por todo lo que me ha dado.

A mis padres que siempre me han apoyado en todo y que no solo me han dado el estudio si no la educación que me han hecho la persona que soy ahora.

A mi hermana por su amor y amistad.

A toda mi familia en general que es mi motor, mi motivación y mi fuerza.

A mis mejores amigas, lore y lala que nunca me dejaron sola en este proceso, me ayudaron cuando pudieron en el laboratorio y cuando no con el ánimo, los consejos y el apoyo, gracias por ser parte de este camino.

A María Ximena Rodríguez por brindarme la oportunidad de trabajar con ella en este proyecto, por su confianza, apoyo, guiarme y compartirme su conocimiento, una excelente directora de trabajo de grado.

A angelita por su apoyo incondicional, su tiempo, por su amistad y por toda la ayuda que me brindo durante el desarrollo de este trabajo, excelente Co-Directora.

A Carel Y Marcela por su apoyo y animo todo el tiempo.

A UNIDIA por abrirme las puertas para desarrollar este trabajo.

A Yadira Cortes por apoyarme y acompañarme en el desarrollo del trabajo de grado de nutrición.

Y en general a todos mis amigos y personas que me acompañaron durante el desarrollo de este hermoso trabajo.

Muchas Gracias por el apoyo.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	11
1. INTRODUCCIÓN, PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.....	12
2. MARCO TEÓRICO.....	14
2.1 Generalidades del género <i>Fusarium</i>	14
2.2 <i>Fusarium</i> spp. como fitopatógeno	14
2.3 <i>Fusarium</i> spp. como patógeno de animales	14
2.4 <i>Fusarium</i> spp. como patógeno de humanos.....	14
2.5 Factores de patogenicidad de <i>Fusarium</i>	15
2.6 Actividad lipolítica	16
2.7 Evaluación de actividad lipolítica	16
2.8 Lipasas en la industria	17
3. OBJETIVOS	19
3.1 Objetivo general.....	19
3.2 Objetivos específicos.....	19
4. METODOLOGÍA.....	20
4.1 Microorganismos.....	20
4.2 Reconstitución de los microorganismos	20
4.3 Pruebas de caracterización enzimática semicuantitativa	20
4.4 Pruebas de evaluación de actividad enzimática cuantitativa	21
4.5 Análisis estadístico	22
4.6 Revisión bibliográfica de aplicación de lipasas microbianas en industria alimentaria	22
4.6.1 Recolección de la información:	22
4.6.2 Criterios de selección de la información:	22
4.6.2 Estrategia de búsqueda:.....	22
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	23
5.1 Selección del control positivo	23
5.2 Selección de sustratos.....	24
5.3 Pruebas de caracterización enzimática semicuantitativas y cuantitativas	27
5.3.1 Sustrato yema de huevo	27

5.3.2	Sustrato tributirina	29
5.3.3	Sustrato aceite de oliva	32
5.3.4	Sustratos Margarina y Mantequilla.....	33
5.4	Revisión bibliografía	37
5.4.1	Lípidos	38
5.4.2	Ácidos grasos.....	38
5.4.3	Clasificación de ácidos grasos según la saturación	39
5.4.3.1	Ácidos grasos saturados (AGS).....	39
5.4.3.2	Ácidos grasos insaturados.....	39
5.4.3.2.1	Ácidos grasos monoinsaturados (AGMI).....	39
5.4.3.2.2	Ácidos grasos poliinsaturados (AGPI).....	39
5.4.3.2.3	Grasas trans (AGT).....	40
5.4.3.2.3.1	Grasas trans y salud.....	42
a)	Enfermedades cardiovasculares.....	42
b)	Resistencia a la insulina y diabetes mellitus	43
c)	Inflamación.....	43
5.4.3.2.3.2	Recomendaciones de la ingesta de ácidos grasos.....	43
5.4.3.2.3.3	Procesos tecnológicos y su impacto en la salud.....	44
5.4.3.2.3.4	Tecnologías alternas para la disminución de AGT.....	44
5.5	Industria de aceites y grasas	45
5.5.1	Fraccionamiento.....	45
5.5.2	Hidrogenación	46
5.5.3	Interesterificación	47
5.5.3.1	Interesterificación química.....	47
5.5.3.2	Interesterificación enzimática.....	48
5.5.4	Aplicaciones de las lipasas.....	48
5.5.4.1	Generalidades de las lipasas	49
5.5.4.2	Las lipasas en la industria de grasas.....	49
5.5.4.2.1	Hidrolisis- interesterificación	50
5.5.5	Mecanismos para la concentración de AGPI.....	51
6.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	52
6.1	CONCLUSIONES	52

6.2 RECOMENDACIONES	52
7. BIBLIOGRAFIA	54
ANEXOS	64

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Aislamientos de <i>Fusarium</i> seleccionados para la evaluación lipolítica con su respectivo origen	21
Tabla 2. Sustratos evaluados teniendo en cuenta la actividad enzimática.....	23
Tabla 3. Principales aspectos biomédicos de las estrategias alternativas a la hidrogenación (Adaptada de Menea <i>et al.</i> 2013).....	45

INDICE DE FIGURAS Y GRAFICAS

Figura 1. <i>P. aeruginosa</i> en medio margarina después de 48 h de incubación, fluorescencia con luz UV	24
Figura 2. Medio base tributirina con mantequilla como sustrato. <i>Geotrichum</i> sp., formación de halo de hidrólisis a las 48 h y fluorescencia a las 72h.....	25
Figura 3. Medio base tributirina con margarina a concentración completa y sonicado. a) <i>Geotrichum</i> sp. - formación de halo de hidrólisis y fluorescencia después de 72h de incubación. b) <i>F. oxysporum</i> (204)- formación de halo de hidrólisis y fluorescencia después de 96h de incubación.....	25
Figura 4. Medio base tributirina con mantequilla a media concentración y sonicado. a) <i>Geotrichum</i> sp. formación de halo y fluorescencia después de 72h. b) <i>F. oxysporum</i> formación de halo y fluorescencia después 96h	26
Figura 5. <i>Geotrichum</i> sp. en medio base tributirina con a) ácido oleico, b) aceite de canola y c) aceite de oliva después de 96 h de incubación.....	26
Figura 6. <i>F. oxysporum</i> (204) en medio base tributirina con a) ácido oleico, b) aceite de canola y c) aceite de oliva después de 96 h de incubación.....	27
Figura 7. <i>F. oxysporum</i> (204) en medio tributirina, a) halo de hidrólisis a las 120 h de incubación, b) halo de hidrólisis y c) fluorescencia después de 144 h de incubación.....	27
Figura 8. <i>Geotrichum</i> sp. en agar tributirina, área de aclaramiento en el centro de la colonia después de 144 h de cultivo, sin fluorescencia.....	27

Figura 9. Evaluación de actividad fosfolipasa en en agar base tributirina con yema de huevo después de 144h de incubación. a) <i>F. verticillioides</i> (161), b) <i>F. oxysporum</i> (203), c) <i>F. oxysporum</i> (310) y d) <i>Geotrichum</i> sp. - control positivo.....	29
Gráfica 1. Evaluación de actividad lipolítica en medio base tributirina con yema de huevo, expresada en diámetro del precipitado (cm).....	29
Figura 10. Prueba de actividad fosfolipasa a nivel cuantitativo. Placa de Elisa con extractos de los diferentes aislamientos en cultivo suplementado con yema de huevo después de 5 días de incubación y 3 horas de reacción enzimática con p-nitrofenil palmitato. 1) Blanco, 2) Control Abiótico, 3) <i>F. solani</i> (108) con sus réplicas (a-d) y 4) <i>F. oxysporum</i> (203) con sus réplicas (a-d).	30
Figura 11. Evaluación de actividad esterasa en agar base tributirina suplementado con tributirina. a) <i>F. solani</i> (108) después de 96h de incubación, b) <i>F. verticillioides</i> (205) después de 120 h de incubación, c) <i>F. oxysporum</i> (310) después de 120 h de incubación, d) <i>F. oxysporum</i> (406) después de 120 h de incubación.....	31
Gráfica 2. Evaluación de actividad esterasa en medio base tributirina suplementado con tributirina, expresada en longitud (cm) del halo de hidrólisis.....	31
Gráfica 3. Cuantificación de actividad de esterasas extracelulares en medio suplementado con tributirina, después de 5 días de incubación.....	32
Figura 12. Cuantificación de actividad de esterasas extracelulares en medio suplementado con tributirina, aislamiento <i>F. verticillioides</i> (161) y <i>F. oxysporum</i> (203).....	32
Figura 13. Evaluación de actividad lipolítica en agar base tributirina suplementado con aceite de oliva después de 120 h de incubación. a) <i>F. solani</i> (108), b) <i>F. oxysporum</i> (203), c) <i>F. oxysporum</i> (310) y d) <i>F. solani</i> (404).....	33
Figura 14. Evaluación de actividad lipolítica en agar base tributirina suplementado con aceite de oliva después de 120 h de incubación. a) <i>F. sporotrichioides</i> (201) y b) <i>F. solani</i> (319) con formación de precipitado y fluorescencia.....	34
Gráfica 4. Evaluación de actividad lipolítica en agar base tributirina suplementado con aceite de oliva, expresada en longitud (cm) del halo de hidrólisis.....	34
Figura 15. Evaluación de actividad lipolítica en agar base tributirina suplementado con margarina después de 120 h de incubación. a) <i>F. solani</i> (108), b) <i>F.oxysporum</i> (203), c) <i>F. solani</i> (319), d) <i>F. oxysporum</i> (409) y e) <i>Geotrichum</i> sp. con formación de precipitado y fluorescencia.....	35
Gráfica 5. Evaluación de actividad lipolítica en agar base tributirina suplementado con margarina, expresada en diámetro (cm) de precipitación.....	36

Figura 16. Evaluación de actividad lipolítica en agar base tributirina suplementado con mantequilla después de 120 h de incubación. a) <i>F. solani</i> (108), b) <i>F. verticillioides</i> (205), c) <i>F. oxysporum</i> (310), d) <i>F. solani</i> (404) y e) <i>Geotrichum</i> sp. con formación de precipitado y fluorescencia.....	37
Gráfica 6. Evaluación de actividad lipolítica en medio base tributirina suplementado con mantequilla, expresada en diámetro (cm) de precipitación.....	37
Gráfica 7. Cuantificación de actividad de lipasas extracelulares en suplementado con mantequilla, después de 5 días de incubación.....	38
Figura 17. Cuantificación de actividad de lipasas extracelulares en suplementado con mantequilla, aislamiento <i>F. oxysporum</i> (314) liberación de p nitrofenil palmitato en las diferentes réplicas y el blanco.....	38
Figura 18. Estructura química de un ácido graso, en este caso ácido esteárico (Santiago 2003)....	40
Figura 19. Las estructuras químicas de EPA y DHA (Kralovec <i>et al.</i> 2012).....	40
Figura 20. Síntesis de prostaglandinas y tromboxanos (Kummerow 2009).....	41
Figura 21. Estructura del ácido elaídico y el ácido vaccénico.....	42
Figura 22. La estructura geométrica de ácido linoleico a vaccénico y ácido oleico a elaídico (Kummerow. 2009).....	42
Figura 23. Hidrogenación del ácido linoleico (C18:2) a ácido oleico (C18:1) (Singh <i>et al.</i> 2010)....	48
Figura 24. Esquema general de la hidrólisis completa de los triglicéridos catalizada por RML para producir ácidos grasos libres (Rodríguez <i>et al.</i> 2010).....	51
Figura 25. Esquema general de la interesterificación catalizada por RML (Rodríguez <i>et al.</i> 2010)..	51
Figura 26. Tipos de interesterificación con lipasas (Sanchez 2007).....	52

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Medios de cultivo.....	65
Anexo 2. Curva de Calibración P nitrofenol.....	66
Anexo 3. Resultados prueba enzimática lipolítica semicuantitativa	67
3.1 Sustrato yema de huevo	
3.2 Sustrato Tributirina	
3.3 Sustrato Aceite de Oliva.....	68
3.4 Sustrato Margarina	
3.5 Sustrato Mantequilla.....	69
3.6 Tablas resumen de resultados por orden de actividad presentada en la prueba semicuantitativa.....	70
Anexo 4. Resultados prueba enzimática lipolítica cuantitativa.....	71
4.1 Sustrato yema de huevo	
4.2 Sustrato Tributirina.....	71
Resultados de todos los aislamientos a los 30 min de incubación.....	72
4.3 Sustrato Mantequilla	
Anexo 5. Análisis estadístico prueba enzimáticas semicuantitativas.....	73
5.1 Sustrato Yema de huevo	
5.2 Sustrato Tributirina.....	74
5.3 Sustrato margarina.....	76
5.4 Sustrato Mantequilla.....	78
Anexo 6. Análisis estadístico prueba enzimáticas cuantitativa.....	80
6.1 Sustrato tributirina	
6.2 Sustrato mantequilla.....	81
6.3 Tabla resumen Resultados por orden de actividad presentada en la prueba cuantitativa.....	82

RESUMEN

Fusarium es un género que comprende un grupo de hongos ubicuos, de distribución universal, parásitos facultativos de numerosos hospederos (plantas, animales y humanos) (Giani 1997, Summerell *et al.* 2001). En plantas causa marchitamiento vascular (Manshor *et al.* 2012, Xian *et al.* 2012), en humanos es considerado un patógeno oportunista para pacientes inmunocompetentes e inmunocomprometidos, representando la segunda causa más frecuente de infecciones fúngicas invasivas (Coleman *et al.* 2011, Sautour *et al.* 2012), y en el caso de animales se relaciona con micotoxicosis (Coleman *et al.* 2011) y lesiones superficiales en perros, bovinos, tortugas (Goujard *et al.* 2009, Canaria 2007). Como mecanismos de patogenicidad se han reportado la adhesión a tejidos y la producción de enzimas líticas que favorecen el proceso de colonización de sus diferentes hospederos, como es el caso de las lipasas (fosfolipasas, estererasas y lipasas verdaderas). Para poder realizar el control de este patógeno es necesario conocer muy bien sus mecanismos de patogenicidad, especialmente enzimas que permiten la penetración y colonización del hospedero. Es por esta razón que este estudio buscó evaluar el potencial lipolítico de 12 aislamientos de *Fusarium*, provenientes de infecciones en humanos (lesiones superficiales e infecciones sistémicas), animales (lesiones superficiales) y plantas (haces vasculares de plantas de tomate, clavel y gulupa), con el fin de proporcionar información de las lipasas asociadas como factores de patogenicidad que permita entender el potencial *Fusarium* como patógeno multihospedero. En la primera fase del estudio se probaron diferentes fuentes de lípidos para evaluar los diferentes tipos de enzimas lipolíticas, yema de huevo (fosfolipasas), estererasas (tributirina) y acetite de oliva, mantequilla y margarina (lipasas verdaderas). Los resultados obtenidos permitieron evidenciar que *F. oxysporum* (162) procedente de lesión cutánea de canino presentó la mayor actividad fosfolipasa, *F. solani* (108) procedente de lesión en ojo de vaca presentó actividad fosfolipasa y esterasa, además de la mejor de actividad lipasa en los dos sustratos empleados, *F. oxysporum*, *F. solani* y *F. verticillioides*, independientemente del origen de aislamiento, presentaron actividad lipolítica. Los resultados obtenidos de especies procedentes de diferentes orígenes de aislamiento pueden ser correlacionados con la posible capacidad que tienen estos aislamientos de producir infección cruzada en los diferentes hospederos.

Por otro lado, las lipasas aparte de ser consideradas factores de patogenicidad, son empleadas en la industria ya que tienen la capacidad de catalizar reacciones de esterificación, interesterificación y transesterificación de grasas (Sharma *et al.* 2001, Nguyen *et al.* 2010, Colla *et al.* 2012). La industria de aceites actualmente cuenta con la opción de emplear estas enzimas para la reducción del contenido de grasas trans, las cuales se sabe ocasionan problemas cardiovasculares (Perk *et al.* 2012) y la producción de alimentos funcionales con altos contenidos de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), tales como ácido araquidónico (AA), ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA). Se ha demostrado clínicamente que estos ácidos grasos disminuyen el riesgo de enfermedades cardíacas, gracias a la capacidad de reducir los niveles de triglicéridos en suero y también ayudan a prevenir infarto agudo de miocardio (IAM) (Okada & Morrissey 2007). Teniendo en cuenta las diversas aplicaciones de las enzimas lipolíticas y su importancia a nivel clínico, se llevó a cabo una revisión bibliográfica para explicar su potencial biotecnológico en el mejoramiento de procesos que evitan la formación o acumulación de compuestos con un impacto negativo para la salud como las de grasas trans, además de la obtención de nuevos productos con efectos beneficios sobre la salud.

1. INTRODUCCIÓN, PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Fusarium es un género que comprende un grupo de hongos ubicuos de distribución universal, se encuentra comúnmente en suelo y es capaz de crecer en una amplia gama de sustratos, asociados a materia orgánica en descomposición. Las diferentes especies también pueden ser parásitos facultativos de numerosos hospederos tales como plantas, animales y humanos (Summerell *et al.* 2001). En el caso de las plantas representan importantes patógenos que ocasionan diversas enfermedades, especialmente pudriciones de tallo y marchitez vascular (Manshor *et al.* 2012, Xian *et al.* 2012).

Actualmente, *Fusarium* es considerado como patógeno oportunista en humanos inmunocompetentes, ocasionando infecciones superficiales en la piel y uñas, además de ser la segunda causa más frecuente de infecciones fúngicas invasivas en pacientes inmunocomprometidos, especialmente aquellos con neutropenia (Coleman *et al.* 2011, Sautour *et al.* 2012). Adicionalmente, se ha reportado la producción de metabolitos secundarios tóxicos conocidos como micotoxinas, las cuales al ser consumidas en bajas concentraciones por largo tiempo pueden llegar a tener efectos cancerígenos en seres humanos, además de ser asociados con efectos negativos sobre el crecimiento y desarrollo de animales domésticos y ganado en su mayoría (Glenn 2007).

Como mecanismos de patogenicidad del género *Fusarium* se reporta la adhesión a tejidos y la producción de enzimas líticas, que favorecen el proceso de colonización de sus diferentes hospederos. Para el caso de las plantas cuenta con enzimas como pectinasas, celulasas, xilanasas y amilasas (Roncero *et al.* 2000). Frente a las infecciones superficiales generadas en humanos y animales, también se encuentran la adhesión a tejidos y la producción de enzimas líticas, como es las queratinasas (Muhsin *et al.* 2001) y las lipasas dentro de las cuales se encuentran, las esterases y fosfolipasas (Chairperson *et al.* 2012). Estas enzimas permiten la ruptura de las barreras de protección del hospedero, además de la liberación de ácidos grasos para la nutrición del hongo y juegan un papel en el crecimiento celular y formación de hifas para favorecer la colonización (Stehr *et al.* 2003).

Para poder llegar a controlar este patógeno es importante conocer muy bien sus factores de patogenicidad, como lo es el caso de su batería enzimática, donde se conocen métodos para el estudio de estas. En el caso particular de *Fusarium*, se han realizado diferentes estudios probando algunos sustratos inductores de la actividad lipolítica como trimistirina, ácido oleico y varios aceites de origen vegetal, los cuales permiten evidenciar la actividad lipolítica de este microorganismo (Sautour *et al.* 2012), sin embargo, en la evaluación de la producción de lipasas en hongos filamentosos no se reporta un sustrato específico que permita la mayor expresión de estas (Goujard 2009). Dado que las lipasas juegan un papel importante durante las infecciones fúngicas y su estudio es esencial para poder entender los mecanismos que usa *Fusarium* para infectar diferentes hospederos, con este estudio se pretende establecer los mejores sustratos lipídicos que permita la inducción de las diferentes enzimas lipolíticas en 12 aislamientos de *Fusarium*, provenientes de humanos (lesiones superficiales e infecciones sistémicas), animales (lesiones superficiales) y plantas (haces vasculares de plantas de tomate, clavel y gulupa), con el fin de proporcionar información de las lipasas asociadas como factores de patogenicidad que permitirán entender su potencial como patógeno multihospedero.

No obstante las lipasas aparte de ser consideradas factores de patogenicidad, son empleadas en la industria ya que pueden catalizar reacciones de esterificación, interesterificación y transesterificación de grasas (Sharma *et al.* 2001, Nguyen *et al.* 2010, Colla *et al.* 2012), siendo la más comúnmente empleada en la industria de aceites y grasas la 1,3-lipasa de *Rhizomucor miehei*. La industria de aceites actualmente cuenta con la opción de emplear estas enzimas para la reducción del contenido de grasas trans, las cuales se sabe ocasionan problemas cardiovasculares ya que afectan las concentraciones de colesterol (Perket *et al.* 2012) y la producción de alimentos funcionales con altos contenidos de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), tales como el araquidónico (AA), el eicosapentaenoico (EPA) y el docosahexaenoico (DHA), que han demostrado reducir la mortalidad coronaria y en menor medida el riesgo a sufrir un accidente cerebrovascular (Ishida 2012). Teniendo en cuenta esto, se realizó una revisión bibliográfica enfocada en grasas trans, ácidos grasos esenciales y la influencia sobre enfermedades cardiovasculares para que los nutricionistas, la industria de alimentos y la comunidad en general conozcan cómo los procesos biotecnológicos y el uso de las lipasas microbianas permiten el mejoramiento de alimentos contribuyendo a la salud y la prevención de enfermedades.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Generalidades del género *Fusarium*

Fusarium ha sido clasificado informalmente dentro del phylum Deuteromycota, aunque a las especies que se les conoce el teleomorfo se clasifican dentro del phylum Ascomycota (Heras 2009). Comprende un grupo de hongos hialinos filamentosos, que presentan macrorconidios y microconidios como propágulos, y clamidosporas como estructuras de resistencia (Hasan *et al.* 2006). Las especies de este género producen colonias blancas, rosadas, moradas y rojizas de textura algodonosa (Leslie & Summerell 2006). Es un hongo saprófito, cosmopolita y ubicuo en la naturaleza, se encuentra comúnmente en suelo y es capaz de crecer en una amplia gama de sustratos. Se ha aislado a partir de diversas condiciones climáticas, pero es frecuente en zonas templadas y entornos tropicales (Ishida *et al.* 2012). Recientemente ha sido considerado como modelo de patogénesis multihospedero, por su capacidad de infectar tanto plantas como animales y humanos (Bushelman *et al.* 1995, Ortoneda *et al.* 2004).

2.2 *Fusarium* spp. como fitopatógeno

La especie más común, que causa marchitamiento vascular en una amplia variedad de cultivos económicamente importantes es *F. oxysporum* (Dong *et al.* 2012), otras especies que afectan a las plantas son *F. solani* (Frank *et al.* 2010) y *F. verticillioides* (Covarelli *et al.* 2012). Estos son capaces de persistir en el suelo durante años, colonizando hospederos alternativos que pueden funcionar como asintomáticos transportistas, por estructuras persistentes como clamidosporas; por lo tanto, la rotación de cultivos ha proporcionado éxitos limitados para controlar las fusariosis (Coleman *et al.* 2011).

Para colonizar la planta hospedero, los hongos deben adaptarse a ambientes hostiles y ajustar su morfología, fisiología y el metabolismo (Dong *et al.* 2012). El mecanismo de este patógeno frente a la planta consta de una serie de procesos tales como señalización temprana planta-hospedero, unión a la superficie de la raíz, degradación de las barreras físicas mediante enzimas líticas, resistencia a compuestos antifúngicos y la producción de fitotoxinas (Dong *et al.* 2012)

2.3 *Fusarium* spp. como patógeno de animales

Los principales reportes de este patógeno en animales se han relacionado con la producción de micotoxinas, que son responsables de varias enfermedades en el ganado después de consumir alimentos contaminados (Coleman *et al.* 2011); dentro de éstas, las más reportadas son tricotecenos, zearalenona y fumonisinas, las cuales afectan la síntesis de proteínas (Glenn 2007). Sin embargo, se han reportado infecciones en la córnea en conejos de laboratorio (Torres 2000), al igual que en ratones donde se realizó la exposición de *F. oxysporum* proveniente de tomate sobre ratones inmunocompetentes presentándose la infección (Guarro *et al.* 2004), además de ser reportado en infecciones superficiales en tortugas en las islas canarias (Canaria 2007).

2.4 *Fusarium* spp. como patógeno de humanos

En humanos *Fusarium* puede causar infecciones oportunistas localizadas o generalizadas. La puerta de entrada del patógeno está constituida por heridas abiertas, uñas, ojos y vía aérea, donde se da el contacto directamente con propágulos del hongo. Por otra parte, la enfermedad generalizada se inicia frecuentemente con la colonización de heridas de la piel, como sitios de

inserción de catéteres, quemaduras y ulceraciones. Cuando la respuesta inmune de los pacientes es defectuosa, la reacción inflamatoria en el sitio inicial de la infección es limitada y el hongo crece y se disemina (Díaz de Castro *et al* 2007). El crecimiento de las hifas puede resultar en lesiones granulomatosas y alcanzar la luz de los vasos sanguíneos, produciendo émbolos infecciosos con necrosis de los tejidos o formación de abscesos. En la interacción del sistema inmune con *Fusarium*, los granulocitos y macrófagos son la base de la respuesta de defensa, donde los granulocitos inhiben el crecimiento de las hifas, mientras que los macrófagos inhiben la germinación de los conidios (Olivares *et al* 2005).

Las especies de *Fusarium* están cada vez más asociadas con infecciones humanas y se han constituido en la segunda causa más frecuente de infecciones fúngicas invasivas en pacientes inmunocomprometidos, e infecciones localizadas en inmunocompetentes (Olivares *et al.* 2005). El género en la actualidad incluye más de 50 especies, pero pocos han sido reportadas como causantes de infecciones en humanos; *F.solani* es el más frecuente (50% de los casos), seguido de *F. oxysporum* (20%) y *F. verticillioides* y *F. moniliforme* (10% cada uno). Este género es resistente a la mayoría de los compuestos antifúngicos utilizados para tratar infecciones por hongos y el manejo de la fusariosis no está bien definido (Sautour *et al.* 2012).

2.5 Factores de patogenicidad de *Fusarium*

Fusarium presenta como factores de patogenicidad la adherencia a la superficie de tejidos y su relación con la germinación, donde los receptores de las células del hospedero para las adhesinas de algunos hongos juegan un papel importante, este es el caso de la fibronectina, trombina, lectinas y factor G, esenciales para que el microorganismo se establezca en el tejido (Maia *et al.* 2001). Por otro lado, se conoce su capacidad para adherirse al material plástico como catéteres y lentes de contacto, donde además de adherirse a los lentes tiene la capacidad de penetrarlos y proliferar, contrario a lo que pasa con los catéteres donde solo se adhiere considerándose así vehículos del patógeno (Hoog *et al.* 2003).

La producción de micotoxinas presentada por diferentes especies de este hongo se ha asociado con un alto índice de intoxicaciones por su presencia en alimentos en Europa, Asia, África, Nueva Zelanda y América del Sur. Las micotoxinas más importantes que afectan la salud de humanos y animales son deoxinivalenol (DON), zearalenona (ZEN), fumonisina B1 (FB1) y moniliformina (MON) (Cetin & Bullerman 2005). Estas toxinas pueden causar sensibilidad de los tejidos o necrosis y producir efectos mutagénicos y cancerígenos (Castells *et al.* 2008). Las especies productoras más reportadas, *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. semitectum*, *F. soporotrichioides* y *F. tricinctum*, se encuentran en cereales, *F. verticillioides* en maíz y *F. chlamydosporum* en sorgo (Kumar *et al.* 2008, Gutleb *et al.* 2002). Adicionalmente, en el proceso de colonización en las plantas, *F. oxysporum* puede secretar una toxina conocida como ácido fusárico, que disminuye la actividad vital de las células de plantas o causar su muerte en concentraciones bajas (Dong *et al.* 2012).

Por otro lado, *Fusarium* tiene la capacidad de producir enzimas líticas tales como pectinasas, celulasas, arabinasas, xilanasas, y queratinasas, entre otras (Roncero *et al.* 2000, Giani 1997, Perk *et al.* 2012, Muhsin & Hadi 2001). Este complejo enzimático constituye un importante factor de virulencia, ya que permite no solo penetrar el tejido del hospedero al mediar la maceración tisular y la disgregación de la estructura de la pared, sino que es un mecanismo necesario para la obtención de nutrientes (Roncero & Di Pietro 2005). Dentro del grupo de enzimas líticas se

encuentran las lipasas, fosfolipasas y estererasas, las cuales hidrolizan sustratos lipídicos y proporcionan residuos de ácidos grasos para la nutrición del hongo, principalmente en el tejido subcutáneo (Roncero *et al.* 2009); además de facilitar la adhesión a la cutícula en el caso de insectos o epidermis en animales y humanos, debido a interacciones hidrofóbicas ocasionadas por la liberación de esos ácidos grasos (Beys da Silva *et al.* 2010).

2.6 Actividad lipolítica

Los microorganismos producen diferentes clases de éster carboxílico hidrolasas (EC 3.1.1) como son las lipasas, estererasas, y fosfolipasas (Lee *et al.* 2013). Debido a la β -oxidación de los ácidos grasos, es de suponer que la entrada de estos al ciclo de los ácidos tricarboxílicos permite que los hongos usen los intermediarios del ciclo para que actúen como fuente de carbono (Carlile *et al.* 1994)

La producción de fosfolipasas se asocia con el daño de la membrana celular del hospedero, que puede promover daños a la célula y/o exponer a receptores para facilitar la adhesión y la invasión del hongo (Ishida *et al.* 2012), además que permite la desorganización de las proteínas de membrana y otros componentes de la célula (Carlile *et al.* 1994), por lo que esta actividad puede ser un importante factor de virulencia en humanos y animales. Las estererasas (monoacilglicerol lipasas) hidrolizan acilglicéridos de cadena corta (Ishida *et al.* 2012). La reacción principal es la ruptura del triacilglicerol a diacilglicerol y a monoacilglicerol, ácidos grasos y glicerol, pero también participan en reacciones de síntesis y transesterificación de acilglicéridos y fosfoglicéridos. Estas enzimas en general pueden tener actividad intracelular o extracelular y su actividad óptima se encuentra a temperaturas cercanas a los 30°C, pH neutro y en presencia de aireación (Nguyen *et al.* 2010). Por otro lado están las lipasas verdaderas (EC 3.1.1.3), que catalizan la hidrólisis en medios insolubles al agua triglicéridos de cadena larga (Lee *et al.* 2013, Liu *et al.* 2009, Sharma *et al.* 2001).

Stehr y colaboradores (2003), describieron las diferentes interacciones de estas enzimas microbianas con su hospedero mencionando su posible empleo en el crecimiento del hongo, donde la lipólisis podría proporcionar fuentes de carbono que el microorganismo podría utilizar. Además los ácidos grasos liberados por la actividad lipolítica pueden contribuir a la adhesión a células o tejidos del –hospedero. Los autores también mencionan que se puede presentar sinergismo con otras enzimas para optimizar su actividad. Por otro lado se puede presentar hidrólisis inespecífica que igualmente contribuye la colonización de tejidos del hospedero. En relación con el sistema inmune, estas enzimas y sus productos finales pueden tener un efecto sobre diferentes células inmunes y pueden iniciar procesos inflamatorios. Finalmente, los microorganismos lipolíticos pueden tener ventaja competitiva sobre la microbiota asociada al hospedero.

2.7 Evaluación de actividad lipolítica

Existen diferentes métodos que permiten evaluar la actividad lipolítica de diferentes microorganismos que tienen esta facultad, incluyendo los basados en titulación, fluorescencia y colorimetrías, que usan cromógenos como los p-nitrofenil ésteres (Hasan *et al.* 2009). En general, el uso sustratos solubles en agua (generalmente, derivados de acilo de longitud de cadena más corta) se considera diagnóstico de estererasas, y el uso de sustratos insolubles en agua (derivados de acilo de cadena más larga) se considera diagnóstico de lipasas.

De los ensayos más utilizados, dos permiten evidenciar la capacidad de medir el ácido carboxílico libre o residuos del ácido graso liberado durante la hidrólisis, ya sea mediante titulación del ácido liberado o la detección de los ácidos grasos por la formación de un complejo ácido-reactivo colorimétrico de acetato cúprico. Alternativamente, el uso de p-nitrofenilo como ésteres de acilo análogo de sustrato cromogénico proporciona un ensayo espectrofotométrico, el cual es el más empleado (Goujard *et al.* 2009). Como detección rápida de microorganismos lipolíticos se realizan pruebas cualitativas empleando medios sólidos con sustratos inductores, donde la lipólisis es observada por medio de formación de halos claros alrededor de la colonia, se pueden emplear indicadores como el azul Victoria B, Spirit azul, azul Nilo sulfato y azul de la noche (Kojima *et al.* 2006). La caída en el pH debido a los ácidos liberados se observa por el cambio de color de los indicadores utilizados. Colorantes fluorescentes como la Rodamina B también son empleados; en este caso la hidrólisis del sustrato provoca la formación de color naranja al reverso de la colonia o fluorescencia de las colonias visibles tras la irradiación con luz ultra violeta de onda larga (350nm) (Hasan *et al.* 2009, Muhsi & Hadi 2001).

2.8 Lipasas en la industria

Las lipasas son consideradas como factor de virulencia, sin embargo son extremadamente versátiles porque catalizan numerosas reacciones, siendo ampliamente utilizadas en aplicaciones industriales, tales como en la fabricación de alimentos (productos lácteos), industria del cuero y detergentes, la producción de cosméticos y productos farmacéuticos y reacciones de síntesis orgánica, especialmente reacciones en medios no acuosos. Las lipasas microbianas representan la principal fuente comercial de estas enzimas, por lo que la investigación de estas se ha incrementado debido a su gran potencial industrial (Beys da Silva *et al.* 2010, Beys *et al.* 2005).

Estas enzimas son capaces de catalizar una gran variedad de reacciones, tales como hidrólisis parcial o completa de los triglicéridos y las reacciones de esterificación, transesterificación e interesterificación de lípidos (Colla *et al.* 2010). Los lípidos están compuestos aproximadamente de 95% de triglicéridos o triacilglicéridos. El 5% restante incluye trazas de monoglicéridos y diglicéridos, ácidos grasos libres, fosfolípidos y esteroides. Los ácidos grasos se pueden clasificar según la saturación en poliinsaturados, saturados e insaturados; dentro del grupo de insaturados encontramos los ácidos grasos trans, los cuales se ha demostrado que aumentan el colesterol total y disminuyen los niveles de colesterol HDL, estos se encuentran en la margarina y productos de panadería (Perk *et al.* 2012). En la industria de grasas y aceites, las grasas se modifican químicamente por hidrogenación parcial para obtener una composición de alta estabilidad oxidativa y un punto de fusión más adecuado para una aplicación en particular. Existe otro proceso que es la interesterificación, la cual puede ser química o enzimática, donde se modifica la composición de triacilglicerol del aceite o la grasa en todas las posiciones indistamente y por lo tanto sus propiedades físicas, la cristalización y el comportamiento de fusión (Glenn 2007), caso contrario a lo sucede en la interesterificación enzimática ya que con el empleo de lipasas microbianas, las modificaciones se hacen selectivamente, lo que modifica el punto de fusión, facilitando el empleo de las grasas para la industria. El proceso enzimático es mucho más sencillo que el químico además que no es necesario emplear un tratamiento posterior (Nguyen *et al.* 2010).

Adicionalmente, las lipasas pueden contribuir al enriquecimiento de aceites y derivados, con ácidos poliinsaturados tales como el ácido araquidónico, eicosapentaenoico (EPA) y los ácidos docosahexaenoicos (DHA), permitiendo así la producción de alimentos que contribuyan a la reducción de enfermedades cardiovasculares, control del colesterol, cáncer, diabetes, trastornos de salud mental y asma, entre otros, debido a su alto contenido en ácidos grasos esenciales (Nguyen *et al.* 2010).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

- ✓ Evaluar la producción de lipasas extracelulares de diferentes aislamientos de *Fusarium* spp.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Implementar un ensayo para determinar actividad lipolítica a nivel semicuantitativo y cuantitativo.
- ✓ Evaluar la actividad lipolítica de aislamientos de *Fusarium* spp. a nivel semicuantitativo y cuantitativo.
- ✓ Realizar una revisión bibliográfica sobre la aplicación de lipasas microbianas en la industria alimentaria de interés nutricional y su influencia en enfermedades cardiovasculares.

4. METODOLOGÍA

4.1 Microorganismos

Los aislamientos pertenecientes al género *Fusarium* que se utilizaron en este estudio provienen de la colección de microorganismos de los grupos de Enfermedades Infecciosas y Unidad de Investigaciones Agropecuarias de la Pontificia Universidad Javeriana, los cuales se encuentran conservados en papel filtro a 4°C. Se utilizaron tres aislamientos de cuatro orígenes diferentes (Tabla 1).

Tabla 1. Aislamientos de *Fusarium* seleccionados para la evaluación lipolítica con su respectivo origen

Aislamiento	Especie	Origen
108	<i>F. solani</i>	Lesión en ojo de vaca
161	<i>F. verticillioides</i>	Lesión cutánea en cola, canino raza Pitbull
162	<i>F. oxysporum</i>	Lesión cutánea en lomo superior de canino
201	<i>F. sporotrichoides</i>	Onicomycosis
203	<i>F. oxysporum</i>	Queratitis
205	<i>F. verticillioides</i>	Onicomycosis
310	<i>F. oxysporum</i>	Haces vasculares de planta de tomate
314	<i>F. oxysporum</i>	Haces vasculares de planta de clavel
319	<i>F. solani</i>	Haces vasculares de planta de gulupa
404	<i>F. solani</i>	Hemocultivo de pacientes neutropénicos
406	<i>F. oxysporum</i>	Hemocultivo de pacientes neutropénicos
409	<i>F. oxysporum</i>	Hemocultivo de pacientes neutropénicos

La identificación a nivel de especie está basada en el factor de elongación 1 α , según los resultados obtenidos por Vega 2010 y Linares 2010. Fuente: Camacho y Gil (2008).

4.2 Reconstitución de los microorganismos

La reconstitución de los aislamientos se realizó en medio Sabouraud suplementado con cloranfenicol (Peptona de caseína 5 g/L, peptona de carne 5 g/L, D glucosa 40 g/L, cloranfenicol 0,5 g/L, agar 15 g/L). Los aislamientos se incubaron a 25°C durante 3 días. Luego se pasaron a medio Sabouraud suplementado con cloranfenicol y mantequilla para inducir la actividad lipolítica (Peptona de caseína 5 g/L, peptona de carne 5 g/L, D glucosa 40 g/L, cloranfenicol 0,5 g/L, mantequilla 20 g/L, agar 15 g/L). Los aislamientos se incubaron a 25 °C durante 5 días.

4.3 Pruebas de caracterización enzimática semicuantitativa

Se realizó la selección de un control positivo de actividad haciendo una búsqueda entre bacterias, levaduras y hongos filamentosos reportados con actividad lipolítica, dentro de los cuales se trabajaron *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida krusei*, *Malassezia sympodialis*, *Asperillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *Acremonium sp.*, *Bauveria bassiana* y *Geotrichum sp.* (Hasan *et al.* 2006, Sharma *et al.* 2001) probando las diferentes fuentes lipídicas.

Las diferentes fuentes lipídicas fueron evaluadas en agar base tributirina (Extracto de levadura 3 g/L, peptona 5 g/L, agar 20 g/L, Rodamina B 1mg /mL). Se probaron como sustratos lipídicos margarina, mantequilla, lecitina de soya (20 g/l), yema de huevo (100ml/L), aceite de oliva, aceite

de canola, ácido oleico y tributirina (1ml/100 ml) (Tabla 2). Estos sustratos fueron sonicados por 30 minutos (Ultrasonido Branson 2510), excepto la yema de huevo (Anexo 1). Los sustratos se seleccionaron con los controles para la evaluación definitiva con los aislamientos de *Fusarium*.

Los inóculos se prepararon a partir de cultivos en el medio de reconstitución, se preparó una suspensión de 10^6 conidios/mL en solución salina. Posteriormente, 20 μ L de la suspensión de conidios se mezcló con agar agua para sembrar en pozos en el medio de cultivo suplementado con las diferentes fuentes lipídicas escogidas en las pruebas realizadas con la selección del control. La incubación se llevó a cabo a 25°C por 5 días.

La actividad lipolítica semicuantitativa se determinó directamente por la visualización y medición de halos de hidrólisis alrededor de la colonia y por fluorescencia de color naranja con luz UV de onda larga (365nm), efecto producido por la Rodamina B (Hasan *et al.* 2006, Muhsin & Hadi 2001, Jarvis & Thiele 1999). La actividad fosfolipasa determinada con yema de huevo se interpretó por observación de zonas de precipitación. Las determinaciones para cada medio y cada aislamiento se realizaron en cuatro réplicas, con lecturas a las 48, 72, 96, 120 horas, pero para el caso del medio con yema de huevo tomando registros hasta las 144 horas.

4.4 Pruebas de evaluación de actividad enzimática cuantitativa

Con el fin de confirmar las actividades enzimáticas observadas en las pruebas semicuantitativas, se determinó la actividad enzimática cuantitativa para cada uno de los aislamientos. Todas las pruebas se realizaron en 4 réplicas. Se utilizó un inóculo 10^7 conidios/mL y se inocularon 10 mL de caldo de igual composición al medio seleccionando con la evaluación semicuantitativa en erlenmeyers con capacidad de 50 mL. Estos cultivos se llevaron a condiciones de agitación constante a 150 rpm durante cinco días a 30 °C (agitador orbital termostataado Innova 44). Pasado el periodo de incubación, se centrifugó 20 min a 10000 rpm para recuperar la fracción extracelular (Microcentrífua Thermoscientific). Para la reacción enzimática se tomaron 25 μ l del extracto crudo enzimático proveniente de cada uno de los aislamientos y se adicionaron 225 μ L de p-nitrofenil-butirato (PNPB) para cuantificar esterases y p-nitrofenil-palmitato (PNPP) para fosfolipasas y lipasas (Tabla 2), a una concentración de 0,5 mM, disuelto en acetonitrilo (Hardeman *et al.* 2007, Grisol *et al.* 2005). Posteriormente se incubó a 30°C durante 30 min, y para el caso del p-nitrofenil-palmitato la lectura se realizó en intervalos de 30 min durante 3 horas, debido a que el comportamiento de todos los aislamientos fue diferente y no se pudo determinar un solo tiempo de muestreo. Las lecturas se hicieron en un lector de placas de Elisa (Microplate Reader BioradiMark) a una longitud de onda de 405nm (Ülker & Karaoğlu 2012). La actividad lipolítica se evaluó mediante la reacción del extracto crudo, teniendo en cuenta una curva de calibración con p-nitrofenol (Anexo 2). Una unidad lipolítica (UL) se definió como la cantidad de enzima capaz de liberar 1 μ mol de p-nitrofenol por minuto bajo las condiciones de la prueba.

Tabla 2. Sustratos evaluados teniendo en cuenta la actividad enzimática.

Sustrato	Actividad enzimática a evaluar	Sustrato para realizar la cuantificación
Ácido oleico	Lipasa	p- nitrofenil- palmitato
Aceite de canola		
Mantequilla		
Margarina		
Aceite de oliva		
Lecitina de soya	Fosfolipasa	p- nitrofenil- butirato
Yema de huevo	Esterasa	p- nitrofenil- butirato
Tributirina		

4.5 Análisis estadístico

Para este análisis se utilizaron medidas de tendencia central como promedio y desviación estándar. Teniendo en cuenta los resultados de las pruebas enzimáticas semicuantitativas y cuantitativas, se realizó un análisis estadístico de varianza (ANOVA) con una prueba de comparaciones de medias de Duncan, con el fin de seleccionar los aislamientos que presentaron mayor actividad enzimática por cada sustrato.

4.6 Revisión bibliográfica de aplicación de lipasas microbianas en industria alimentaria

4.6.1 Recolección de la información:

Para el desarrollo revisión bibliográfica se revisaron artículos en las bases de datos ISI Web of Science, Scopus, ScienceDirect, Springerlink, Journals@Ovid y Medline.

4.6.2 Criterios de selección de la información:

Criterios de inclusión: Para la revisión bibliográfica se tuvieron en cuenta los siguientes parámetros:

- Años de publicación: 2003-2013.
- Idioma de publicación: español/inglés
- Tipo de artículo: Investigación y revisiones bibliográficas.

Criterios de exclusión: No se revisaron artículos con las siguientes características:

- Artículos en idiomas diferentes a inglés y español.
- Artículos publicados fuera del periodo de tiempo seleccionado
- Resúmenes de artículos o comentarios personales tipo editor.

4.6.2 Estrategia de búsqueda:

Se realizó una búsqueda mediante encabezados temáticos y palabras de texto relacionados con el tema.

- ✓ Conectores entre los diferentes temas: Y (AND), O (OR), NO (NOT) CON (WITH), CERCA (NEAR).
- Palabras claves: Lipasas de origen fúngico, alimentos, enfermedades cardiovasculares, grasas trans, PUFA's, nutrición, triglicéridos, Bio- interesterificación.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Selección del control positivo

Para asegurar la calidad de los medios de cultivo empleados, se seleccionó un control positivo de microorganismos lipolíticos; Teniendo en cuenta lo reportado en literatura se seleccionaron *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 como bacterias; *Candida krusei* y *Malassezia sympodialis*, como levaduras lipolíticas, y como hongos filamentosos lipolíticos *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *Acremonium* sp., *Bauveria bassiana*, *Geotrichum* sp. (Sharma R *et al.* 2001), y *F. oxysporum* (204) aislado de heridas superficiales en humanos como organismos de prueba. Las cepas fueron proporcionadas por la Colección de Microorganismos de la Pontificia Universidad Javeriana y del laboratorio de Genómica y Bioinformática de Ambientes Extremos (GEBIX) de la Pontificia Universidad Javeriana.

Para la selección de bacterias se probaron como sustratos inductores margarina por su contenido diferentes ácidos grasos (Pareyt *et al.* 2011) y lecitina de soya como prueba de sustrato alternativo a la lecitina o fosfatidilcolina en medio base tributirina. Se escogió como control positivo de bacterias a *P. aeruginosa* ya que mostró formación de halo de hidrólisis a las 24 h y fluorescencia a las 48 h en el medio con margarina (figura 1), a diferencia del resto de bacterias que no presentaron actividad lipolítica en ninguno de los dos sustratos.



Figura 1. *P. aeruginosa* en medio margarina después de 48 h de incubación, fluorescencia con luz uv

En cuanto a las levaduras, ninguna presentó actividad lipolítica frente a estos sustratos. Esto puede deberse a que lo reportado para *C. krusei* y *M. sympodialis* es la evaluación en medio yema de huevo, conociéndose como mecanismo de patogenicidad la producción de una fosfolipasa extracelular (Haynes 2001, Pini 2011).

Para el caso de los hongos filamentosos los resultados evidenciaron actividad por parte de *A. niger* y *Geotrichum* sp. con formación de halo de hidrólisis a las 96 h y 48h, respectivamente, y fluorescencia a las 72h para el caso de los dos hongos, pero esto solo en el medio de margarina (figura 2), razón por la cual se seleccionó como control positivo a *Geotrichum* sp. (evidencia de halo y fluorescencia en el menor tiempo), además de que se reporta no solo actividad lipolítica, sino fosfolipasa también (Burkert *et al.* 2005, Helisto & Korpela 1998).



Figura 2. Medio base tributirina con mantequilla como sustrato. *Geotrichum* sp., formación de halo de hidrólisis a las 48 h y fluorescencia a las 72h

5.2 Selección de sustratos

Posteriormente se realizó un ensayo con el control positivo seleccionado (*Geotrichum* sp.) y un aislamiento de *F. oxysporum* (204), probando como sustratos la margarina y lecitina de soya. *Geotrichum* sp. presentó de nuevo la formación de halo y la fluorescencia mientras que el aislamiento de *F. oxysporum* no presentó halo de hidrólisis pero si fluorescencia a las 72 h en el medio con margarina. En el medio con lecitina de soya no se observó hidrólisis en ninguno de los dos microorganismos, lo que pudo deberse a que en la estructura química de este sustrato, a parte de la fosfatidilcolina y el fosfatidilinositol, sitios donde actúan las fosfolipasas, se encuentra una fosfatidiletanolamina no hidrolizable por estas enzimas (Tamargo *et al.* 2011), impidiendo la hidrólisis completa del sustrato. Teniendo en cuenta estos resultados, la lecitina de soya no fue empleada para el estudio como sustrato lipídico.

Posteriormente se realizó un nuevo ensayo con el medio margarina, probando a la concentración completa (20g/L) y a la mitad de este sustrato (10g/L). Además se probó si el proceso de sonicación permitía la obtención de un medio más homogéneo ayudando a la disponibilidad del sustrato, por lo que unos medios fueron sonicados y otros no; como resultado de esto, se observó que el medio sonicado facilita la disponibilidad del sustrato para el microorganismo por estar homogenizado. La concentración del sustrato no presentó diferencia ya que la formación de halo y fluorescencia se presentó en el mismo tiempo para las dos concentraciones en los dos microorganismos, sin embargo el medio con concentración completa por ser un poco más denso que el de mitad de concentración, permitió observar mejor la formación del halo y la fluorescencia (figuras 3 y 4).

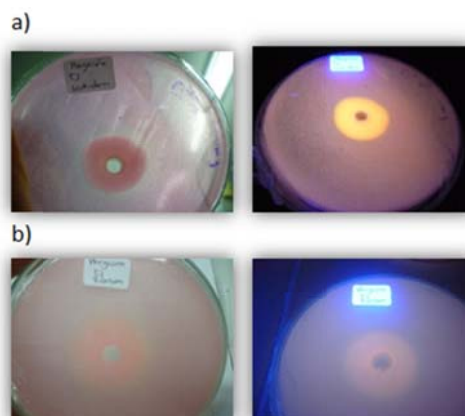


Figura 3. Medio base tributirina con margarina a concentración completa y sonicado. a) *Geotrichum* sp. - formación de halo de hidrólisis y fluorescencia después de 72h de incubación. b) *F. oxysporum* (204)- formación de halo de hidrólisis y fluorescencia después de 96h de incubación.

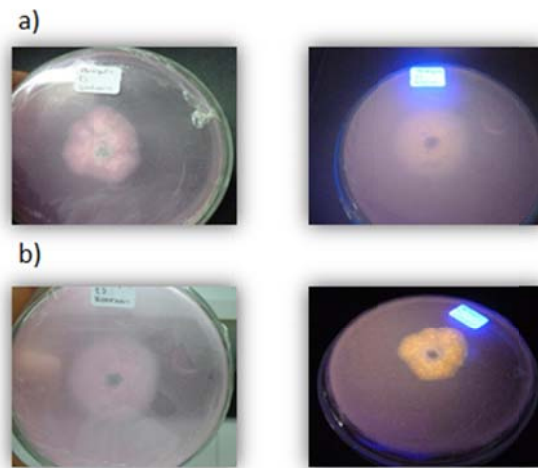


Figura 4. Medio base tributirina con mantequilla a media concentración y sonicado. a) *Geotrichum* sp. formación de halo y fluorescencia después de 72h. b) *F. oxysporum* formación de halo y fluorescencia después 96h.

Seguido a esto, se probaron otros sustratos como ácido oleico, aceite de canola y aceite de oliva con estos dos microorganismos, sin encontrar actividad por parte de *Geotrichum* sp.(figura 5), mientras que *F. oxysporum* (204) (figura 6) presentó halo de hidrólisis y fluorescencia únicamente en aceite de oliva después de 96 h de incubación, por lo que se descartaron ácido oleico y aceite de canola como sustratos para evaluar los aislamientos de *Fusarium* del estudio.

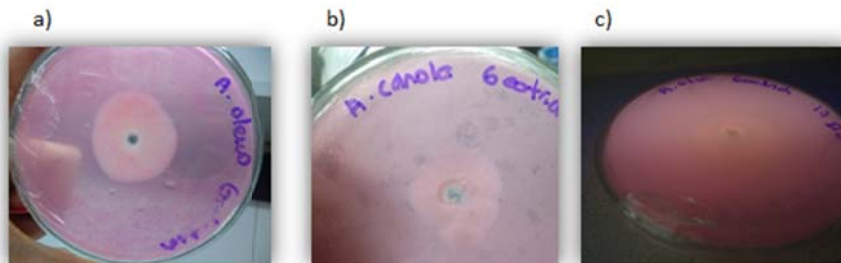


Figura 5. *Geotrichum* sp. en medio base tributirina con a) ácido oleico, b) aceite de canola y c) aceite de oliva después de 96 h de incubación.

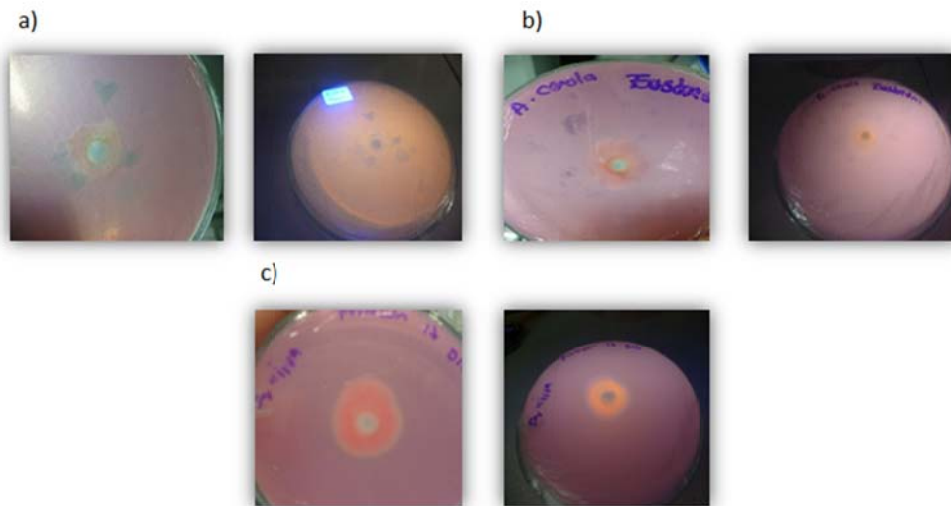


Figura 6. *F. oxysporum* (204) en medio base tributirina con a) ácido oleico, b) aceite de canola y c) aceite de oliva después de 96 h de incubación.

Por último se realizó el ensayo con tributirina, para el cual *F. oxysporum* (204) presentó halo de hidrólisis después de 5 días de incubación y fluorescencia después de días de incubación, mientras que el control positivo *Geotrichum* sp. presentó un área de aclaramiento en el centro de la colonia sin fluorescencia (Figuras 7 y 8). Teniendo en cuenta los resultados, este sustrato se utilizó en la investigación.

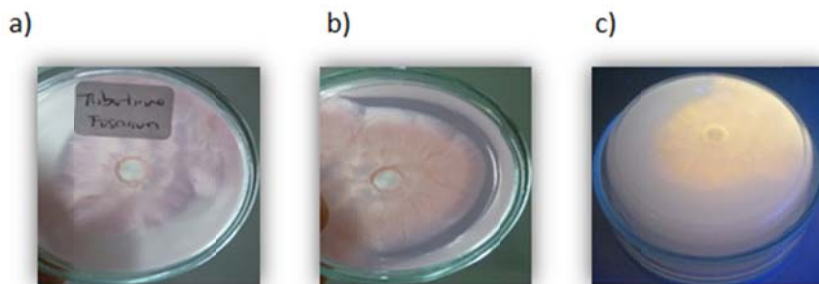


Figura 7. *F. oxysporum* (204) en medio tributirina, a) halo de hidrólisis a las 5 días de incubación, b) halo de hidrólisis y c) fluorescencia después de 6 días de incubación.

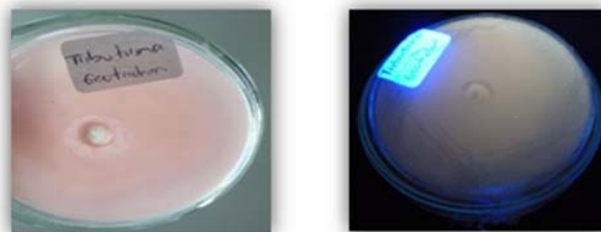


Figura 8. *Geotrichum* sp. en agar tributirina, área de aclaramiento en el centro de la colonia después de 144 h de cultivo, sin fluorescencia.

5.3 Pruebas de caracterización enzimática semicuantitativas y cuantitativas

Una vez seleccionado los sustratos, se realizaron las pruebas con los 12 aislamientos de *Fusarium* seleccionados. Se ha reportado que este género tiene la capacidad de producir diferentes clases de lipasas entre ellas están las fosfolipasas, las estererasas y las lipasas verdaderas (Ishida *et al.* 2012, Lee *et al.* 2013), por lo que se evaluaron medios con sustratos específicos que permitieran evaluar la producción de estas tres clases de enzimas.

5.3.1 Sustrato yema de huevo

En el medio yema de huevo se observó en la mayoría de los aislamientos la formación de un precipitado en el centro de la colonia (figura 9), similar al que forma *Candida* spp. y *Malassezia pachydermatis* en el mismo medio (Kadir *et al.* 2007, Hurtado 2012). Generalmente la actividad lipolítica se reporta con el coeficiente de actividad enzimática (Pz) en levaduras (Hurtado 2012), que se obtiene al dividir el diámetro de crecimiento de la colonia por el diámetro de la zona de producción enzimática (Price *et al.* 2005), para este caso en particular y en hongos filamentosos que presentan un crecimiento radial, el precipitado se presentó en el centro de la colonia (figura 9) por lo que se hizo una relación del diámetro del precipitado y el diámetro de la colonia, donde los valores mayores fueron asociados con una mayor producción de fosfolipasas. La prueba se evaluó por seis días, observándose que en los primeros cuatro días no se evidenció actividad enzimática, sin embargo, en el tiempo restante se pudo observar que la gran mayoría de los aislamientos mostraron formación de precipitado (gráfica 1), siendo *F. oxysporum* (162), aislado de una lesión cutánea de un canino, el que presentó mayor actividad, contrario a *F. oxysporum* aislado de clavel (314) y *F. solani* (404) aislado de un paciente neutropénico que no lo presentaron. La producción de fosfolipasas ha sido reportada en *Fusarium* por Ishida y colaboradores (2012), en un estudio con muestras clínicas en medio Sabouraud con emulsión de yema de huevo al 8%, presentándose la formación de precipitado después de 15 días. En este estudio la formación de precipitado se presentó en menor tiempo.

En los aislamientos que presentaron la formación de precipitado se encontró una diferencia significativa de ($p = 1,19 \times 10^{-7}$) (Anexo 5.1) entre ellos, independientemente del origen o la especie, estos mostraron actividad fosfolipasa, lo que se puede asociar al papel de estas enzimas como factores de patogenicidad, pues actúan sobre los glicerofosfolípidos presentes en las membranas celulares afectando su estabilidad y consecuentemente ocasionando lisis celular y permitiendo la entrada del patógeno a los tejidos. Como se describió anteriormente esta actividad es esencial para el inicio de la colonización, independientemente del tipo de hospedero, lo que se pudo evidenciar en este estudio con la actividad de *F. oxysporum* (409), (162) y (319), aislamientos de la misma especie pero de origen humano, animal y vegetal, respectivamente.

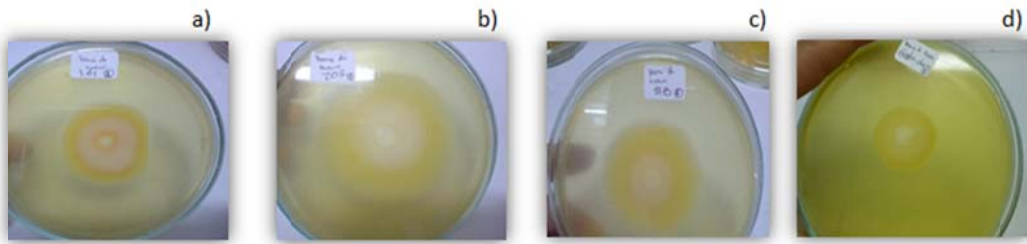
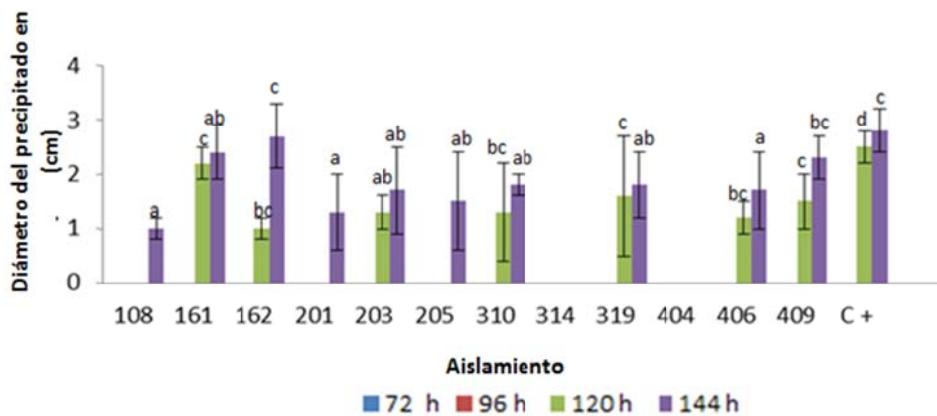


Figura 9. Evaluación de actividad fosfolipasa en en agar base tributirina con yema de huevo después de 144h de incubación. a) *F. verticillioides* (161), b) *F. oxysporum* (203), c) *F. oxysporum* (310) y d) *Geotrichum* sp. - control positivo.



Gráfica 1. Evaluación de actividad lipolítica en medio base tributirina con yema de huevo, expresada en diámetro del precipitado (cm).

Para la prueba enzimática a nivel cuantitativo se utilizó p-nitrofenil palmitato. Basándose en los resultados de prueba a nivel semicuantitativo, la lectura se realizó después de 5 días de incubación. Luego de obtener el extracto crudo y mezclar con p-nitrofenil palmitato se midió absorbancia a 405 nm durante 3 horas en intervalos de 30 min, en incubación a 35°C. Pasadas las 3 horas de reacción enzimática no se evidenció actividad para ninguno de los aislamientos de *Fusarium* (Anexo 4.1). Como se puede observar en la figura 10, no se presentó formación de color amarillo indicando que no hubo liberación del p-nitrofenol (Fariha *et al.* 2009). Este resultado es válido desde el punto de vista de la selección del sustrato para evidenciar actividad fosfolipasa, pues el palmitato no es un fosfolípido, es un lípido de cadena larga específicamente reportado para cuantificar lipasas (Ishida *et al.* 2012, Kaushik *et al.* 2006, Nguyen *et al.* 2010). Sin embargo, se quería observar la posibilidad de evaluar cuantitativamente dados los resultados de la prueba en placa y, además, no se encontró reporte de algún método colorimétrico para esta enzima, simplemente se sabe que se realiza la evaluación en placa con formación de precipitación (Kadir *et al.* 2007).

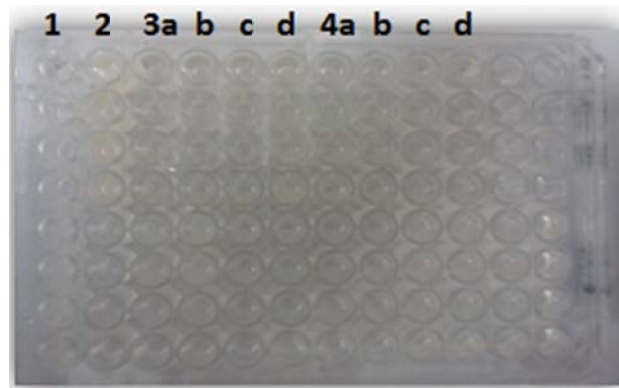


Figura 10. Prueba de actividad fosfolipasa a nivel cuantitativo. Placa de Elisa con extractos de los diferentes aislamientos en cultivo suplementado con yema de huevo después de 5 días de incubación y 3 horas de reacción enzimática con p-nitrofenil palmitato. 1) Blanco, 2) Control Abiótico, 3) *F. solani* (108) con sus réplicas (a-d) y 4) *F. oxysporum* (203) con sus réplicas (a-d).

5.3.2 Sustrato tributirina

Para evaluar la presencia de esterases se llevaron a cabo las pruebas a nivel semicuantitativo en medio base tributirina suplementado con tributirina (C4) como sustrato lipídico (Rapp 1995, Jarvis *et al.* 1997), ya que se sabe que estas enzimas rompen enlaces éster de ácidos grasos de cadena corta (<10 carbonos) (Fojan *et al.* 2005). Los resultados obtenidos permitieron evidenciar que todos los aislamientos presentaron la actividad con una diferencia significativa ($p= 3,7 \times 10^{-8}$) (Anexo 5.2), incluso presentando halos de hidrólisis mayores a los del control positivo (figura 11, gráfica 2). La mayor actividad se presentó a los cinco días de evaluación (figura 10). Algunos estudios han demostrado la producción de esterases por diferentes levaduras (Kumar *et al.* 2006), donde se describen especies de *Candida* aisladas de pacientes inmunocomprometidos, tales como *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. lipolytica*, y *C. inconspicua*. Palmeira y colaboradores (2010), discuten que los altos niveles de esterases se relacionan con la adherencia a las células de mamíferos, lo que en este estudio se puede verificar con la actividad presentada por los aislamientos de origen animal, siendo el de mayor actividad *F. solani* (108), de origen bovino (gráfica 2), seguido por *F. verticillioides* (205) y *F. oxysporum* (406), de origen humano superficial y humano sistémico, respectivamente (gráfica 2). Estos resultados se pueden relacionar con los reportados por Ishida (2012), quien menciona a *Malassezia furfur*, importante agente etiológico de micosis humanas, como un microorganismo con altos niveles de actividad esterasa extracelular. Además, evalúa la actividad esterasa de *Fusarium* en un medio de cultivo suplementado con tween 80, como sustrato lipídico. Después de 30 días de incubación, se encontró que aislamientos con alta producción de esterases presentaban baja producción de fosfolipasas y viceversa. Estos resultados coinciden con los de este estudio, específicamente con *F. solani* (108) (gráfica 2), presentando mayor formación de halo de hidrólisis en medio tributirina, pero menor formación de precipitado en medio yema de huevo, o *F. oxysporum* (162) con mayor formación de precipitado en yema de huevo (gráfica 1) y menor halo de hidrólisis en tributirina (gráfica 2). Luo y colaboradores (2012), también reportan actividad esterasa en las mismas especies, pero no la relacionan con actividad fosfolipasa.

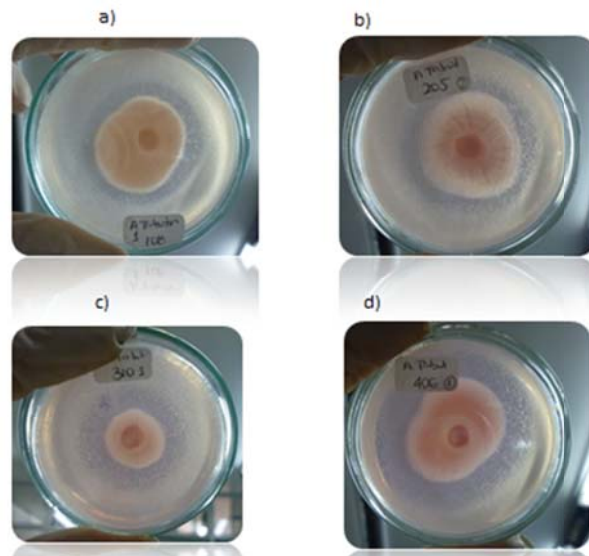
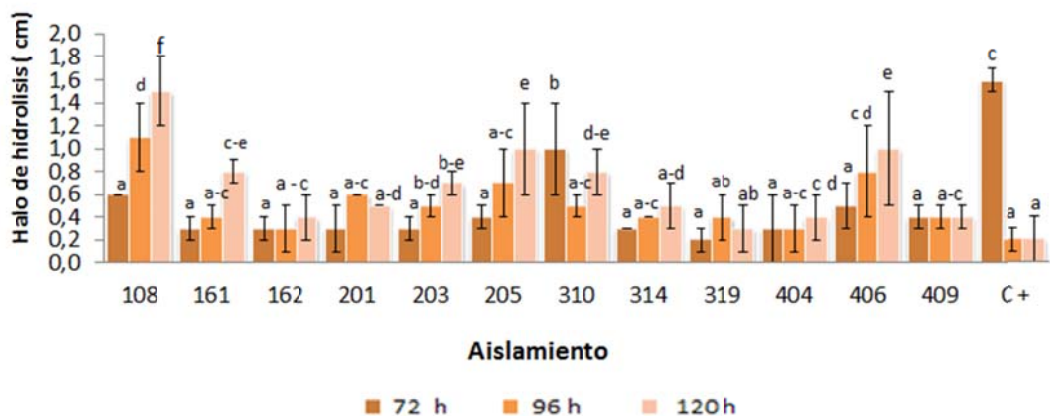


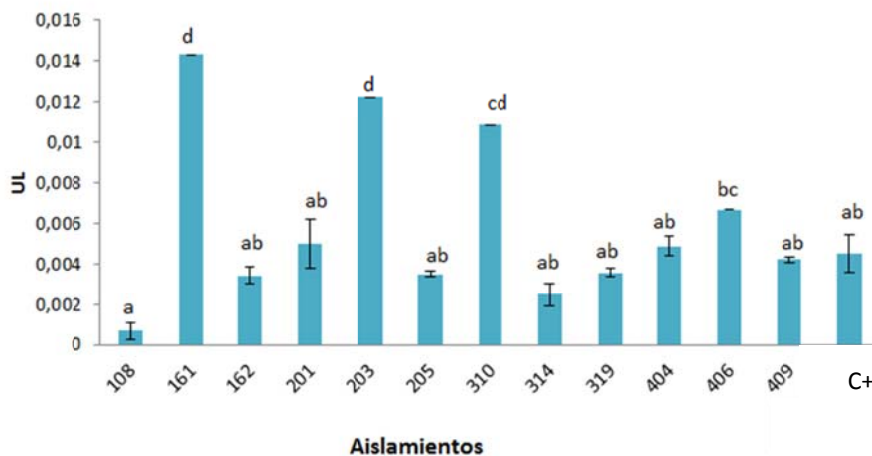
Figura 11. Evaluación de actividad esterasa en agar base tributirina suplementado con tributirina. a) *F. solani* (108) después de 96h de incubación, b) *F. verticillioides* (205) después de 120 h de incubación, c) *F. oxysporum* (310) después de 120 h de incubación, d) *F. oxysporum* (406) después de 120 h de incubación.



Gráfica 2. Evaluación de actividad esterasa en medio base tributirina suplementado con tributirina, expresada en longitud (cm) del halo de hidrólisis.

La prueba de actividad esterasa a nivel cuantitativo se determinó a los 30 min de reacción, aunque la prueba se monitoreó durante 3 horas, encontrándose la fase de ascenso de liberación de p-nitrofenol a partir del p-nitrofenil butirato en ese tiempo (Anexo 4). En comparación con los resultados obtenidos de forma semicuantitativa, se pudo observar que el aislamiento 108, presentó mayor actividad en dicha evaluación pero la menor en el ensayo a nivel cuantitativo (gráfica 3), posiblemente porque la actividad se presentó los primeros días y fue cuantificada a los cinco días de incubación, utilizando los ácidos grasos de cadena corta para su crecimiento

(Palmeira *et al.* 2010) En general todos los aislamientos presentaron actividad esterasas con una diferencia significativa de $p= 1,6 \times 10^{-6}$ (Anexo 6.1) siendo *F. verticillioides* (161) y *F. oxysporum* (203) los que presentaron mayor actividad esterasa (figura 12). Los valores de actividad enzimática de este estudio no son comparables con los de otros estudios, por ejemplo el aislamiento 203 presentó 0,012 UL/mL (gráfica 3) y en el estudio de Rapp (1995), se reportan 25,3 UL/mL en *F. oxysporum* usando tributitina como sustrato de inducción después de seis días de incubación. La diferencia pudo deberse a que el medio que ellos utilizaron contenía glucosa como fuente de carbono inicial, la cual puede ser asimilada por el hongo para iniciar rápidamente su crecimiento y posteriormente utilizarlas fuentes lipídicas, además el medio contaba con sales que pueden favorecer la actividad de la enzima (Maia *et al.* 2001). Por otro lado, según Tamerler y colaboradores (2000), demostraron que *F. oxysporum* presenta una actividad esterasa máxima después de 120 horas en fermentación discontinua, sin embargo realiza una comparación con la producción de la enzima en fermentación con lote alimentado, mostrando un 30% más en la producción de la enzima con respecto a la primera, indicando que posiblemente esta enzima es inducida por concentraciones constantes del sustrato en el medio.



Gráfica 3. Cuantificación de actividad de estererasas extracelulares en medio suplementado con tributirina, después de 5 días de incubación.

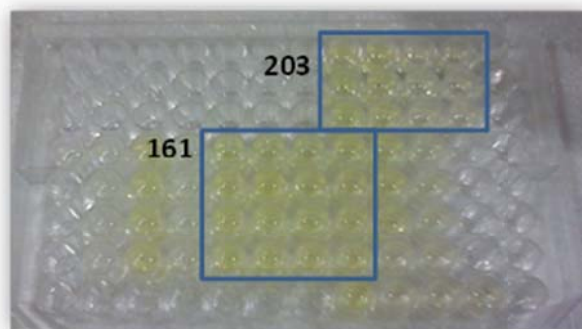


Figura 12. Cuantificación de actividad de estererasas extracelulares en medio suplementado con tributirina, aislamiento *F. verticillioides* (161) y *F. oxysporum* (203).

5.3.3 Sustrato aceite de oliva

Las lipasas se distinguen de las esterases por el sustrato en el que actúan, hidrolizando acilglicérols de cadenas largas (≥ 10 átomos de carbono) (Fuciños *et al.* 2005), por lo que se evaluaron sustratos que contenían ácidos grasos de cadena larga, como aceite de oliva (Baccouriet *al.* 2008), margarina y mantequilla (Bolívar *et al.* 2010, Bourlieu *et al.* 2009).

Según varios reportes los mejores sustratos para evaluar la capacidad lipolítica de los microorganismos son los aceites y el más mencionado es el aceite de oliva (Nunes *et al.* 2011, Rapp 1995, Sugihara *et al.* 1996, Tamerler *et al.* 2000, Nguyen *et al.* 2010), por su alto contenido de ácidos grasos de cadena larga, como lo son el ácido oleico (C18:1), ácido palmítico (C16:0) y ácido linoléico (C18:2) (Baccouri *et al.* 2008). Sin embargo, en el estudio solo dos aislamientos presentaron actividad lipolítica, *F. sporotrichioides* (201) y *F. solani* (319), que mostraron un leve precipitado (figura 14 y gráfica 4) en comparación con los demás (figura 3). Actualmente se reporta la actividad lipolítica de *F. solani* (Maia *et al.* 2001), sin embargo *F. sporotrichioides*, no es muy reportado, por lo que sería importante volver a realizar el ensayo con algunas modificaciones, para poder confirmar la actividad lipolítica de este género.

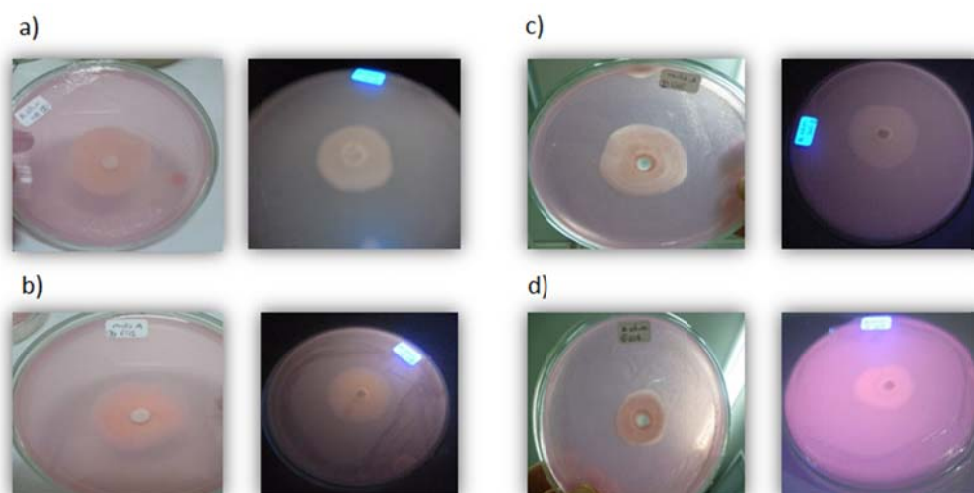


Figura 13. Evaluación de actividad lipolítica en agar base tributirina suplementado con aceite de oliva después de 120 h de incubación. a) *F. solani* (108), b) *F. oxysporum* (203), c) *F. oxysporum* (310) y d) *F. solani* (404).

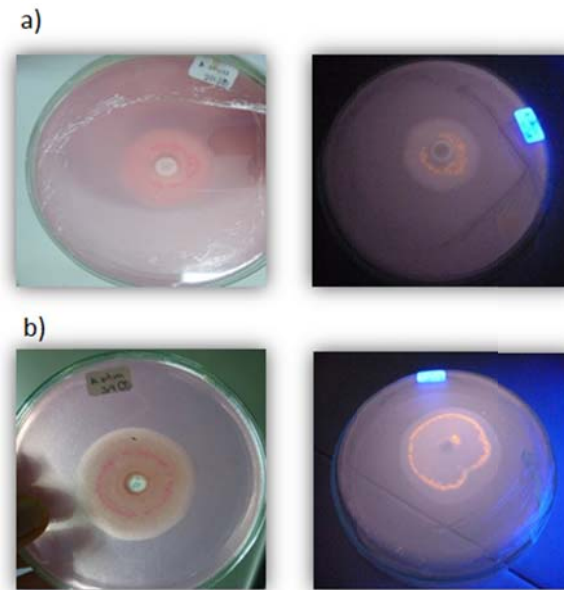
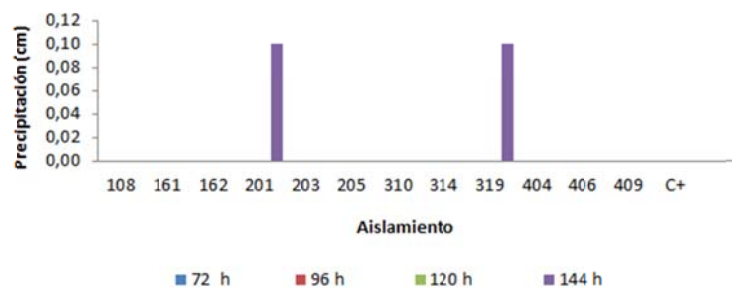


Figura 14. Evaluación de actividad lipolítica en agar base tributirina suplementado con aceite de oliva después de 120 h de incubación. a) *F. sporotrichioides* (201) y b) *F. solani* (319) con formación de precipitado y fluorescencia.



Gráfica 4. Evaluación de actividad lipolítica en agar base tributirina suplementado con aceite de oliva, expresada en longitud (cm) del halo de hidrólisis.

La baja y nula actividad en este medio posiblemente se deba a que el sustrato no estaba lo suficientemente disponible para que la lipasa se activara, ya que se reporta que hay lipasas que en su estructura tiene una forma de "tapa" que hace que sea inaccesible al sustrato, definiéndose como conformación cerrada, la cual corresponde a la lipasa que en solución acuosa, en ausencia de una interfaz o un disolvente orgánico, no se activa o se presenta una baja actividad lipolítica (Cajal *et al.* 2003), por lo que en este caso se podría decir que no se empleó el mejor emulsificante o que hizo falta otro, ya que se reporta que la producción de lipasas en medios con aceite contienen goma arábica la cual no fue utilizada en la preparación del medio, solo se utilizó Tritón X como emulsificante (Guadarrama *et al.* 2008).

5.3.4 Sustratos Margarina y Mantequilla

Como sustratos alternativos de cadena larga se probaron la margarina y la mantequilla. La margarina presenta en su mayoría ácido oleico (41,35%), seguido por el linoleico (17,25%) y ácido palmítico (15,35%) (Bolívar *et al.* 2010) iguales ácidos grasos del aceite de oliva precisamente

porque la margarina se elabora a base de aceites vegetales además que contiene una gran variedad de ácidos tales como caprílico, cáprico, láurico, mirístico, esteárico, eláidico, linoléico y araquidónico, los cuales permiten la activación de las lipasas con más facilidad por la disponibilidad de sustrato.

Para este sustrato se pudo observar que los diferentes aislamientos presentaron una formación de precipitado y fluorescencia (figura 15), sin presentar diferencia significativa ($p=0,092$) (Anexo 5.3). Esta actividad se determina ya que la liberación de ácidos grasos de cadena larga con la rodamina B forman un complejo denominado Rodamina B-LCFA el cual fluoresce a una longitud de onda de entre 350 y 365 nm (Jarvis *et al* 1997), indicando actividad lipolítica de los microorganismos, lo cual ha sido previamente reportado por autores como Nguyen *et al* 2010 para cepas de *F. graminearum*. *F. solani* (108), *F. oxysporum* (203) y *F. solani* (319) fueron los aislamientos que presentaron mayor formación de precipitado (gráfica 5, siendo dos especies las cuales se reportan con producción de lipasas (Rapp 1995, Hasan *et al.* 2006). Sin embargo, se pudo ver que los aislamientos provenientes de animales son los que presentaron mayor formación de precipitado que los demás al igual que en el caso de las fosfolipasas afirmando la expresión de estas enzimas que permite la ruptura de las membranas celulares (gráfica 5) (Ishida *et al.* 2012, Juntachai *et al.* 2009)

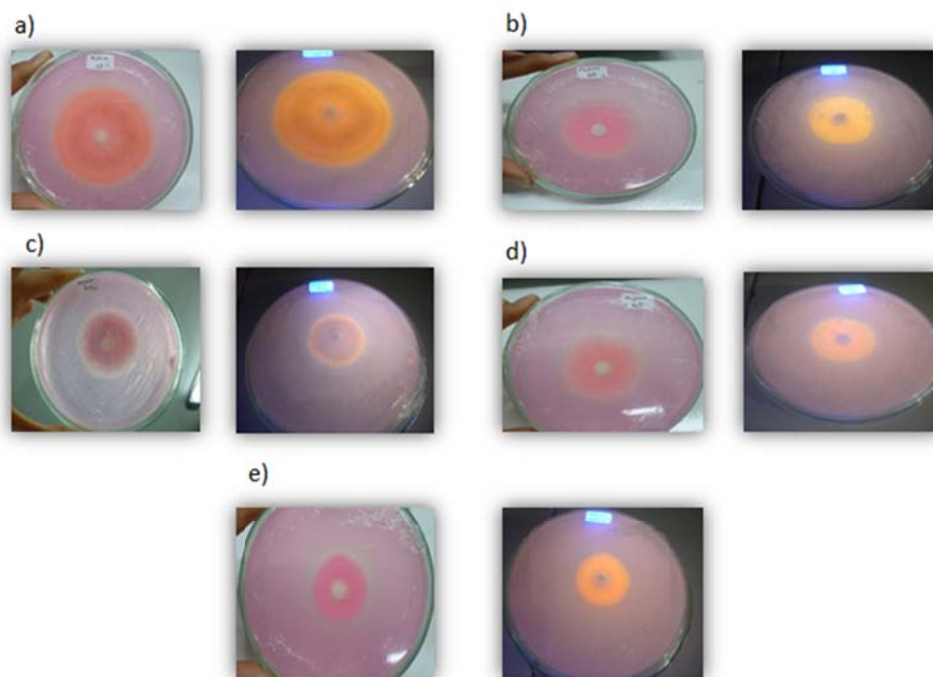
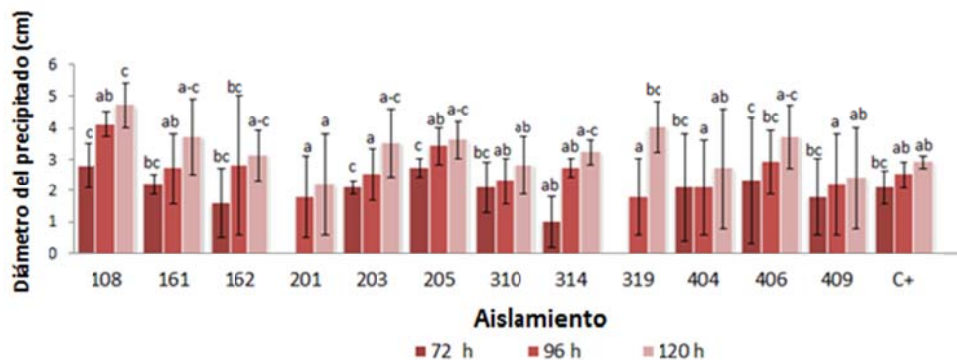


Figura 15. Evaluación de actividad lipolítica en agar base tributirina suplementado con margarina después de 120 h de incubación. a) *F. solani* (108), b) *F. oxysporum* (203), c) *F. solani* (319), d) *F. oxysporum* (409) y e) *Geotrichum* sp. con formación de precipitado y fluorescencia.



Gráfica 5. Evaluación de actividad lipolítica en agar base tributirina suplementado con margarina, expresada en diámetro (cm) de precipitación.

Por otro lado, la mantequilla que es elaborada a base de leche contiene ácido palmítico, oleico y mirístico, las concentraciones estos componentes pueden variar de acuerdo a la alimentación del ganado, también contiene entre 65 y 75% de ácidos grasos saturados de cadena corta (Bourlieu *et al.* 2009), lo que hace que la composición de la mantequilla tenga una gran variedad de ácidos grasos. En este sustrato todos los aislamientos presentaron formación de precipitado y fluorescencia presentando una diferencia significativa ($p=0,004$) (Anexo 5.4) (figura 16), muy similar al observado en margarina; sin embargo, la formación de precipitado fue mayor a los 5 días con respecto la margarina y los aislamientos de la serie 300, procedentes de plantas, mostraron mayor formación de precipitado frente a los otros aislamientos (gráfica 6). Nguyen y colaboradores (2010) reportan como mecanismo de patogenicidad de *F. graminearum*, en infección de plantas, la secreción de diversas lipasas en condiciones de crecimiento apropiadas. Además se ha reportado que por medio de la inhibición de estas enzimas, hay una disminución en la capacidad infectiva e incluso se puede evitar la infección de fitopatógenos como por ejemplo *Botrytis cinerea* en tomate y *Alternaria brassicicola* en hojas de coliflor (Walter *et al.* 2005), indicando que estas enzimas son esenciales para la adherencia e inicio de la colonización, como lo reportó Gottlich y colaboradores (1995), afirmando que la actividad lipolítica aumenta las interacciones hidrófobas por la liberación de ácidos grasos libres favoreciendo este proceso.

Como el comportamiento en las pruebas semicuantitativas fue similar entre margarina y mantequilla, presentándose mayor actividad en mantequilla, se realizó la cuantificación solamente en este sustrato, presentando una diferencia significativa ($p= 9 \times 10^{-12}$) (Anexo 6.2) entre los aislamientos observándose que *F. oxysporum* (314) (gráfica 7) presentó la mayor actividad lipolítica, lo cual se puede observar en la placa con la coloración amarilla intensa con respecto al blanco (figura 17). No existen reportes del empleo de estos sustratos, por lo que no se puede comparar las unidades lipolíticas obtenidas; sin embargo, se reporta la actividad lipolítica de *Fusarium* (Nguyen *et al.* 2010, Rapp 1995, Hasan *et al.* 2006, Maia *et al.* 2001) en la evaluación de actividad lipolítica con otros sustratos como aceite de sésamo, se ha obtenido mayor actividad lipolítica (0,88 UL/mL) gracias a de la presencia de hierro, potasio, magnesio y zinc, que favorecen la actividad de la lipasa (Maia *et al.* 2001), por lo que posiblemente la ausencia de estos minerales en el medio evaluado no permitió obtener una mayor actividad.

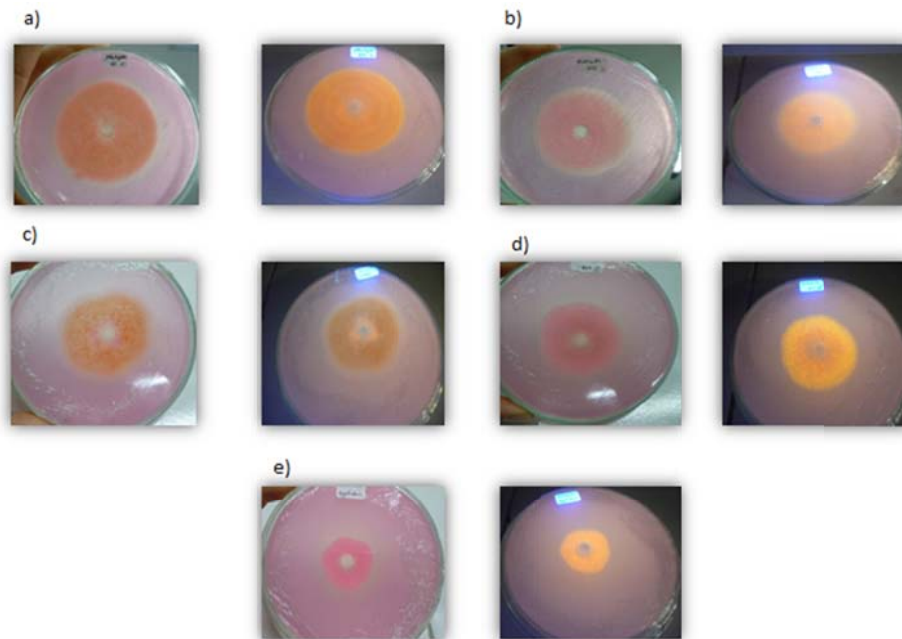
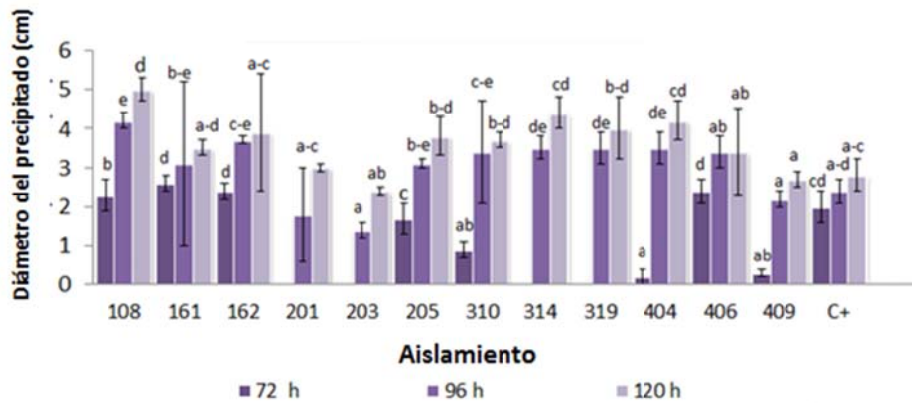


Figura 16. Evaluación de actividad lipolítica en agar base tributirina suplementado con mantequilla después de 120 h de incubación. a) *F. solani* (108), b) *F. verticillioides* (205), c) *F. oxysporum* (310), d) *F. solani* (404) y e) *Geotrichum* sp. con formación de precipitado y fluorescencia.



Gráfica 6. Evaluación de actividad lipolítica en medio base tributirina suplementado con mantequilla, expresada en diámetro (cm) de precipitación.

Gráfica 7. Cuantificación de actividad de lipasas extracelulares en suplementado con mantequilla, después de 5 días de incubación.

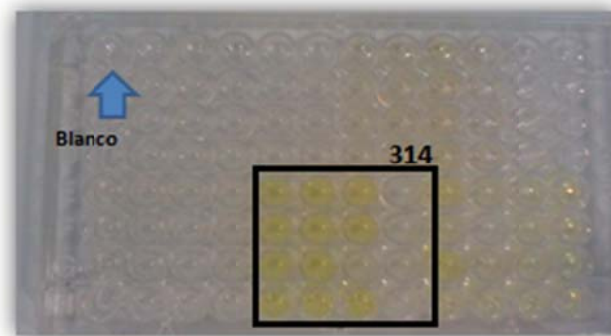


Figura 17. Cuantificación de actividad de lipasas extracelulares en suplementado con mantequilla, aislamiento *F. oxysporum* (314) liberación de p nitrofenil palmitato en las diferentes réplicas y el blanco.

5.4 Revisión bibliografía

Disminución de grasas trans y concentración de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) por lipasas microbianas en la industria alimentaria y su influencia en enfermedades cardiovasculares.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), las enfermedades cardiovasculares causan alrededor del 30% de todas las muertes en el mundo. Varios tipos de comportamientos pueden contribuir a la aparición o reducción de enfermedades cardiovasculares. La OMS considera como principal factor modificable al tabaquismo, seguido de un estilo de vida sedentario, una dieta pobre en fibra y rica en grasas saturadas y colesterol (Palomo *et al.* 2006). Actualmente las ECV son responsables del 27% de las defunciones en Colombia (Mendivil *et al.* 2004), según el DANE 54 mil personas mueren por enfermedades cardiovasculares al año y según el informe sobre salud realizado en el 2007 por el Ministerio de protección social en el país, hay 4'800.000 de hipertensos, 6'600.000 fumadores, 9'900.000 de obesos, 3'145.000 con antecedentes familiares de hipertensión y 18'500.000 de sedentarios; por otro lado la encuesta nacional de la situación

nutricional de Colombia (ENSIN) 2010 encontró que el 60,7% de jóvenes (14 a 18 años) y el 61,5% de adultos jóvenes (19 años a 30 años) consumen comida rápida al mes, el 69,6 % de la población consume alimentos de paquete y el 46,5% de la población se considera sedentaria; por lo que se está buscando inculcar adecuados hábitos alimentarios en la población por medio de la educación alimentaria, basada en información clara y científica, donde se hace necesario que el gremio de nutricionistas dietistas este actualizado en procesos tecnológicos que permiten el mejoramiento de los alimentos y por ende la protección de la salud de la población, como lo es el caso de empleo de lipasas microbianas para la disminución de grasas trans y concentración de ácidos grasos poliinsaturados en diferentes alimentos. Se partirá de los lípidos, los cuales son precisamente los que se ven modificados en estos procesos.

5.4.1 Lípidos

Un lípido es definido como cualquier grupo de compuestos orgánicos insolubles en agua pero soluble en solventes orgánicos, conformados por moléculas de ácidos grasos, fosfolípidos, esteroides, esfingolípidos y terpenos, entre otros (Fahy *et al.* 2011).

5.4.1.1 Función biológica:

- Combustible: importante productor de energía.
- Material estructural: formación de membranas celulares.

5.4.1.2 Funciones específicas:

- Moléculas señalizadores de procesos como hormonas, mediadores, segundos mensajeros.
- Cofactores en reacciones enzimáticas.

La mayor parte de los lípidos naturales están compuestos aproximadamente de 95% de triglicéridos y el 5% restante incluye trazas de monoglicéridos y diglicéridos, ácidos grasos libres, fosfolípidos y esteroides (Koolman *et al.* 2004).

5.4.2 Ácidos grasos

Desde el punto de vista químico los ácidos grasos son cadenas rectas de hidrocarburos que terminan en un grupo carboxílico en un extremo y en un grupo metilo en el otro. La mayoría de las cadenas de ácidos grasos tienen entre 4 y 22 carbonos, siendo los más prevalentes los de 16 a 18 carbonos o ácidos grasos de cadena larga (Koolman *et al.* 2004).

Los lípidos se pueden clasificar de acuerdo a su composición, componentes estructurales, función y saturación (Koolman *et al.* 2004). A continuación solo se mencionará la clasificación según saturación, ya que la revisión actual se centra en los procesos tecnológicos que la modifican.

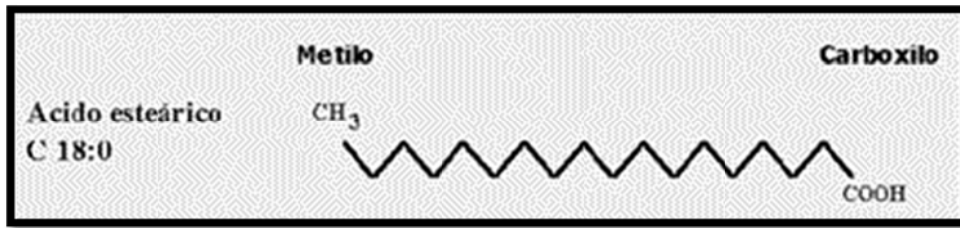


Figura 18. Estructura química de un ácido graso, en este caso ácido esteárico (Santiago 2003)

5.4.3 Clasificación de ácidos grasos según la saturación

5.4.3.1 Ácidos grasos saturados (AGS)

Contienen el número máximo de hidrogeniones que la cadena puede tener. El nivel de saturación determina la consistencia de la grasa a temperatura ambiente. En general a mayor longitud de cadena y mayor saturación mayor dureza de la grasa a temperatura ambiente.

5.4.3.2 Ácidos grasos insaturados

Contienen dobles enlaces en la cadena.

5.4.3.2.1 Ácidos grasos monoinsaturados (AGMI)

Contienen solo un doble enlace. El ácido oleico es el AGMI más común en los alimentos. En el cuerpo, se forma a partir de un estearato a través de la acción de una enzima desaturasa.

5.4.3.2.2 Ácidos grasos poliinsaturados (AGPI)

Contienen dos o más dobles enlaces. Hay dos familias de ácidos grasos poliinsaturados los omega 3 y omega 6. Estas familias no son intercambiables y tienen papeles bioquímicos muy diferentes (Koolman *et al.* 2004). Los principales ácidos grasos omega 3 son el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA) (Figura 19). El DHA es un componente estructural importante de la materia gris del cerebro y de la retina del ojo, además de ser un componente importante del tejido del corazón (Kahveci *et al.* 2011). EPA y DHA son esenciales para una alimentación sana y se ha demostrado clínicamente que disminuyen el riesgo de enfermedad cardíaca, gracias a la capacidad de reducir los niveles de triglicéridos en suero y ayudar a prevenir un infarto agudo de miocardio (IAM) (Okada & Morrissey 2007). Recientemente se demostró que EPA puede prevenir la hipertrigliceridemia, la agregación plaquetaria y disminuir el colesterol sanguíneo, reduciendo así el riesgo de la arteriosclerosis, inflamación y diversos carcinomas. Por otro lado el DHA es importante en el desarrollo del sistema nervioso central de los lactantes (Robles *et al.* 2003).

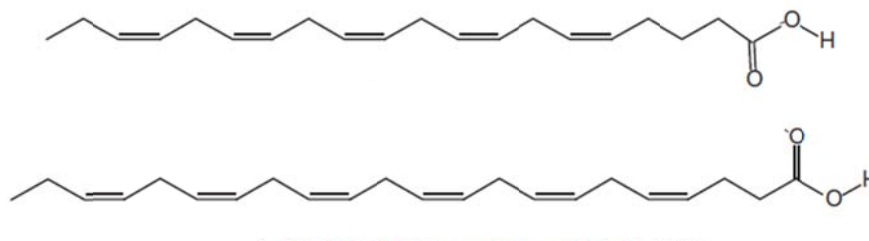


Figura 19. Las estructuras químicas de EPA y DHA (Kralovec *et al.* 2012)

El principal ácido graso ω 6 es el ácido araquidónico (AA), es el AGPI más abundante en los músculos de los seres humanos, tiene un papel principal como lípido estructural asociado principalmente con fosfolípidos de membrana (Ward & Singh 2005), es esencial en la nutrición humana y precursor de prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos con importante funciones en el sistema circulatorio y sistema nervioso central (Figura 20). El ácido linolénico es precursor metabólico del AA, donde la conversión a AA es mediada por la enzima D-6 desaturasa; la reacción es lenta además que la enzima está presente en bajos niveles en los humanos, por lo tanto, es preferible incluir en la dieta el AA en lugar del ácido linolénico (Ward & Singh 2005).

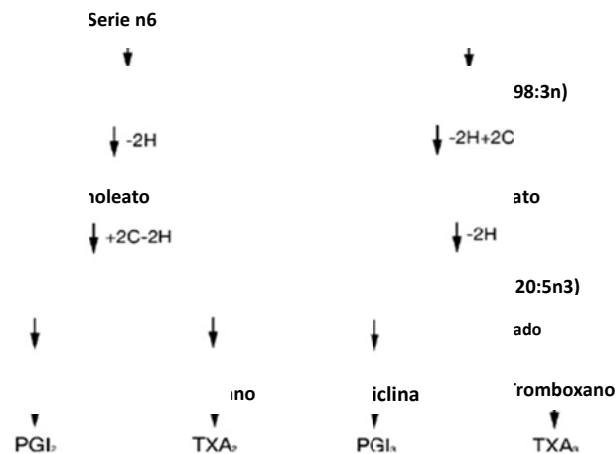


Figura 20. Síntesis de prostaglandinas y tromboxanos (Kummerow 2009).

El ácido araquidónico es necesario para mejorar la agudeza visual y desarrollo cognitivo del niño, después del nacimiento. Las únicas fuentes comerciales de EPA y DHA y AA son aceites de pescado y vísceras de animales, respectivamente (Robles *et al.* 2003).

5.4.3.2.3 Grasas trans (AGT)

Estas se originan en los alimentos, principalmente por procesos de hidrogenación en la industria cuando los fabricantes agregan hidrógenos a los aceites líquidos para hacerlos semisólidos y más estables. Por otro lado, se producen también naturalmente en pequeñas cantidades en la carne de res y los productos lácteos de rumiantes. A diferencia de otras grasas en la dieta, las grasas trans no son esenciales y no promueven la buena salud (Heinz *et al.* 2008, Park 2009). En general, los ácidos grasos trans industriales están representados por el ácido oleico trans-isómero 9 (18: 1 9 trans), también conocido como ácido elaídico, mientras que AGT naturales están representados principalmente por el ácido oleico isómero trans-11(18: 1 11 trans) y ácido vaccénico (10,11) (Figura 21).

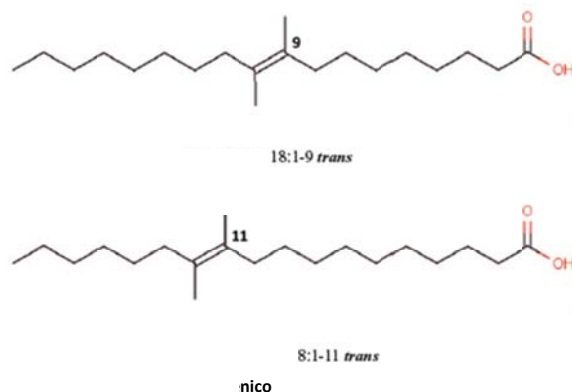


Figura 21. Estructura del ácido eláidico y el ácido vaccénico.

En los procesos industriales la formación de grasas trans se debe a transformaciones de los ácidos presentes en los productos de origen, como lo es en el caso del aceite de soja que en su forma natural contiene 52,5% de ácido linoleico ($18:2\Delta^{9,12}$), que es también conocido como omega 6, y 7,5% de ácido linolénico ($18:3\Delta^{9,12,15}$), también conocido como ácido omega 3. Estos ácidos presentan dobles enlaces en diferentes posiciones, en las que el hidrógeno puede ser añadido. Durante la hidrogenación el doble enlace en cualquiera de esas posiciones puede ser desplazado para formar isómeros cis y trans, formando nuevos ácidos grasos insaturados no presentes en el aceite vegetal. Ejemplos de esto son el ácido vaccénico que viene de la hidrogenación del ácido linoleico, y la formación del ácido eláidico partir del ácido oleico (Figura 22) (Kummerow 2009).

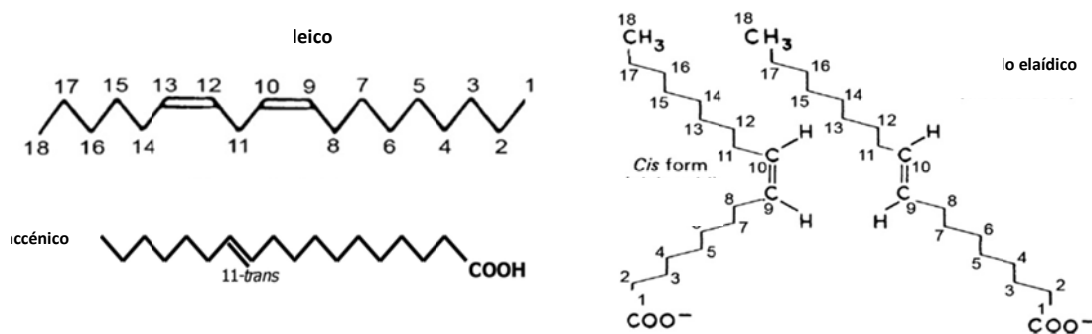


Figura 22. La estructura geométrica de ácido linoleico a vaccénico y ácido oleico a eláidico (Kummerow, 2009)

Es importante que se tenga claro que el consumo diario de AGT no depende solo de los productos industrializados, sino que algunos alimentos naturales también los contienen. Sin embargo, el mayor aporte es dado por los alimentos procesados, tanto así que en comidas rápidas, como por ejemplo una porción grande de papas fritas y una hamburguesa (200 g cada uno), pueden proporcionar entre 0,2 g hasta 5 g AGT (Heinz *et al.* 2008), además de alimentos de panadería o listos para preparar, que en su elaboración emplean componentes que contienen grasas trans; por lo tanto sería recomendable que estos productos procesados en su etiquetado nutricional se enuncie el contenido o la presencia de estas grasas, para que el consumidor pueda elegir y saber lo que está comiendo. En Colombia se realizó un estudio sobre el análisis del perfil de ácidos grasos y de vitamina E de las margarinas y esparcibles más comercializados y su situación actual de

rotulado nutricionales donde según la Resolución número 333 de 2011 que conserva los mismos gramos de grasas trans (3 g) estipulados por la resolución anterior (288 de 2008); encontró que el 90,9% de los productos aportaban menos de 0,5 g por porción de ácidos grasos trans, razón por la cual pueden ser declarados como «libre de trans» en su etiquetado nutricional; sin embargo, la margarina de canola analizada en este estudio y los tres productos de marca propia, son fuentes de trans y sólo 40% de los productos cumplen con la totalidad de la declaración de los nutrientes de carácter obligatorio: calorías totales por porción, calorías aportadas a partir de grasa, contenido de proteína, carbohidratos, grasa saturada, colesterol, ácidos grasos trans, fibra, sodio, hierro, calcio, y vitaminas A y C (Bolívar & Mora 2008).

5.4. 3.2. 3.1 Grasas trans y salud

La ingesta de ácidos grasos trans industriales de origen animal, según varios reportes, se considera que podrían estar involucrados en la disfunción endotelial y el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (Park 2009, Heinz *et al.* 2008), a través de alteraciones como:

- (i) Aumento de la actividad plasmática en transferencia de proteínas de ésteres de colesterol (CETP).
- (ii) Aumento de lipoproteína baja densidad (LDL)-colesterol, aumento de los triglicéridos (TG), y disminución de lipoproteínas de alta densidad (HDL) haciéndolos más aterogénico que los ácidos grasos saturados, puesto que estos tienen efecto solo sobre las LDL-C y HDL-c.
- (iii) Estimulación de moléculas proinflamatorias (por ejemplo, el factor de necrosis alfa (TNF- α), interleucina-6 (IL-6), proteína C-reactiva (C-RP), el factor nuclear activador de células B (NF-kB), especies reactivas de oxígeno (ROS), así como la reducción de óxido nítrico (NO), biodisponibilidad importante para la vasodilatación (Mena *et al.* 2013).
- (iv) Elevan los niveles de triglicéridos en sangre y la hipertrigliceridemia está asociada independientemente con el riesgo de enfermedad cardiovascular.
- (v) Pueden afectar el metabolismo de los ácidos grasos esenciales y el balance de prostaglandinas a través de la inhibición de la enzima delta-6-desaturasa y como resultado pueden provocar trombogénesis.
- (vi) La ingestión elevada de grasas trans puede ocasionar resistencia a la insulina (Castro *et al.* 2010).

a) Enfermedades cardiovasculares

Existe una fuerte relación entre el consumo de los AGT y el riesgo de enfermedad cardiovascular. Kromhout y colaboradores (2005) confirmaron en siete diferentes poblaciones que existe una relación entre el riesgo de muerte por enfermedad cardiovascular y la ingestión de ácidos grasos saturados ($r = 0.88$, $p < 0.001$) y de AGT ($r = 0.78$, $p < 0.001$) (Katan *et al.* 1995). Adicionalmente, existen tres estudios prospectivos que muestran evidencia entre la relación de la alimentación y el riesgo de enfermedad cardiovascular. En el Estudio de Seguimiento de Profesionales de la Salud se encontró un riesgo relativo (RR) de 1.36 (IC 95 % = 1.03-1.81) asociado con un aumento del 2% en la ingestión de AGT; en el Estudio de Prevención de Cáncer con α -tocoferol y β -Caroteno el RR fue de 1.14 (IC 95 % = 0.96-1.35)(45); y en el Estudio de Salud de las Enfermeras el RR fue de 1.93 (IC 95 % = 1.43-2.61)(Kromhout *et al.* 2005)

b) Resistencia a la insulina y diabetes mellitus

Los ácidos grasos de la dieta parecen influir en la fisiopatología de la diabetes mellitus, a través de su incorporación en la estructura de los lípidos en el músculo esquelético y el tejido adiposo, que puede llevar a alteraciones en la función de los receptores de insulina. Se ha planteado la hipótesis que los AGT reducen la sensibilidad a la insulina mediante sus efectos en el incremento de las concentraciones de la interleucina-6 (IL6), el factor de necrosis tumoral- α (TNF α) y las prostaglandinas. Estudios en ratas sugieren que una alimentación elevada en AGT (17 % del total de kilocalorías) por nueve semanas altera la tolerancia a la glucosa y provoca resistencia a la insulina (Axe *et al.* 2003). En pacientes con sobrepeso y diabetes mellitus tipo 2, al comparar tres dietas con diferente tipo de ácidos grasos (trans, saturados y monoinsaturados), encontraron diferencias en la respuesta a la insulina posprandial entre las dietas con AGT y con ácidos grasos monoinsaturados; sin embargo, no hubo diferencias significativas entre las dietas con AGT y con ácidos grasos saturados (Axe *et al.* 2007, Christiansen *et al.* 1997). Además, en un estudio con 84.941 mujeres por más de 15 años, la ingestión elevada de AGT aumentó en 40 % el riesgo de diabetes (Hu *et al.* 2001). Todos estos resultados en conjunto sugieren que los AGT alteran la sensibilidad a la insulina e incrementan el riesgo de diabetes en sujetos con mayor adiposidad y con mayor predisposición de resistencia a la insulina (Mozaffarian *et al.* 2009).

c) Inflamación

Los AGT se han asociado con niveles elevados de marcadores circulantes de inflamación sistémica. En mujeres con sobrepeso se ha determinado que la ingestión de AGT aumenta los niveles del receptor-2 soluble del factor de necrosis tumoral (sTNFR2), de la IL6 y de la proteína C reactiva (PCR) (López *et al.* 2005). Los mecanismos por los cuales las grasas trans actúan sobre la inflamación sistémica o la función endotelial no están bien establecidos. Parece ser, por estudios *in vitro*, que los AGT son incorporados en las membranas de células endoteliales (Kummerow *et al.* 1997) y en las membranas de monocitos/macrófagos y adipocitos, donde podrían afectar directamente la vía de señalización relacionada con la inflamación (Mozaffarian 2006). Sin embargo, los estudios con los que se cuenta a la fecha sugieren que los AGT son proinflamatorios y alteran la función endotelial (Mozaffarian *et al.* 2009).

5.4. 3.2. 3. 2 Recomendaciones de la ingesta de ácidos grasos

Las directrices dietéticas del USDA recomiendan que la ingestión de ácidos grasos trans debe ser menor del 1% de calorías totales (USHHS / USDA 2005) (Laurian & Jagmanait 2008). Sin embargo, Heinz y colaboradores (2008), determinaron que el consumo de AGT debe ser de 8 g día para evitar la elevación de la relación LDL-C y HDL-C. Esta recomendación se hace con base a una dieta de 1800 kcal (Heinz *et al.* 2008). Este meta-análisis de cuatro grandes estudios prospectivos, igualmente reportó que el umbral de ingesta diaria asociada con mayor riesgo EVC fue de 5 g de AGT (Heinz *et al.* 2008).

Por otro lado, el estudio de Tarrego y colaboradores en 2006 estimó que la sustitución del 5% de la ingesta de ácidos grasos saturados por cis-insaturados, reduce el riesgo de cardiopatía en un 42%, mientras que la sustitución de un 2% de ácidos grasos trans por grasa cis-insaturado da lugar a una reducción de 53% de riesgo de cardiopatía coronaria. Estos datos sugirieron que pequeñas disminuciones de los AGT en la dieta probablemente generara una reducción en el riesgo de sufrir una cardiopatía (Tarrago *et al.* 2006).

La agencia Food and Drug Administration (FDA) en el 2003 evaluó el consumo de AGT por alimentos e informó que los productos que contienen aceites parcialmente hidrogenados

constituyen la principal fuente de AGT (79,4%), encontrándose entre los alimentos que contienen aceites parcialmente hidrogenados, la margarina (16,56%), los pasteles y productos relacionados (23,82%), galletas dulces y saladas (9,78%), papas fritas (8,32%), aperitivos (4,81%) y preparaciones en el hogar (4,28%). Por otro lado, la ingesta asociada con productos de origen animal representó tan sólo el 20,6% (Zaliha *et al.* 2004, Singhet *al.* 2010).

En 1999, la FDA emitió una propuesta para que los AGT se incluyan en las etiquetas de los productos, después de comentarios y deliberación, en el 2003 la FDA emitió la resolución final que requiere que los AGT y AGS se consignen por separado. Explícitamente, la norma final estipula que ésta inclusión en el rotulado nutricional es obligatoria a partir del 1 de enero del 2006. Sin embargo, aunque la divulgación del contenido de AGT no incluyó el máximo límite admisible, y la imagen poco saludable asociada con AGT, esto ha llevado a que los fabricantes de alimentos evalúen sus productos y busquen alternativas más saludables (Tarrago *et al.* 2006).

5.4. 3.2. 3.3 Procesos tecnológicos y su impacto en la salud

Dependiendo del proceso empleado en la elaboración de los distintos productos, estos alimentos pueden ocasionar alteraciones en la salud del consumidor (tabla 3). Procesos como la hidrogenación alteran las concentraciones de lipoproteínas y afectan el proceso de inflamación, el proceso de reformulación, es empleado para disminuir las concentraciones de AGT, por medio del aumento de grasas saturadas, sin embargo presenta un mayor cambio en las concentraciones de lipoproteínas, además de presentar mayor riesgo de enfermedades cardiovasculares, por lo que no es muy recomendado este proceso. La interesterificación y las modificaciones genéticas, presentan beneficios para la salud, estrategias más recomendadas para las empresas.

Tabla 3. Principales aspectos biomédicos de las estrategias alternativas a la hidrogenación (Adaptada de Mena *et al.* 2013)

Procesamiento de la grasa	Nivel de producción de AGT	Aspectos biomédicos	Referencias
Hidrogenación	Altos	Eleva las LDL- C Disminuye las HDL Inflamación	Eckel and others (2007) Katan and others (1995) Lichtenstein and others (1999) Mozaffarian (2006) Harvey and others (2008)
Reformulación	Bajos (Riesgo de altos niveles AGS)	Riesgo ECV < hidrogenación Eleva las LDL- C Eleva las HDL Alto riesgo de ECV	Iwata and others (2011) Risk CVDs < hydrogenation Mozaffarian (2006) Mozaffarian (2009) Stender and others (2009)
Interesterificación Química	Bajos	No presenta cambios significativos en el perfil lipídico.	Zock and Katan (1992) Nestel and others (1995) Meijer and Weststrate (1997) Sundram and others (2007)
Interesterificación Enzimática	Bajos	Riesgo independiente de ECV No presenta cambios significativos en el perfil lipídico.	Zock and others (1995) Lee and others (2007a) Kim and others (2008)
Modificación Genética	Bajos	Riesgo independiente de ECV Desconocido	Adhikari and others (2010) Tang and others (2012) Wilson (2012a)

5.4. 3.2. 3.4 Tecnologías alternas para la disminución de AGT

Con la obligación del etiquetado de AGT, la industria de aceites comestibles ha sido motivada a explorar alternativas para disminuir los AGT en sus productos. Técnicamente, la reformulación de grasas con exclusión de estas y la conservación de características estructurales y de sabor agradable del producto alimenticio (por ejemplo sensación en la boca, la plasticidad y sabor), no es fácil.

Dentro de las técnicas que se han desarrollado y están actualmente en uso por industrias de alimentos en productos para generar un mínimo de AGT, se encuentran las siguientes:

- Modificación del procedimiento de hidrogenación química jugando con variables como temperatura y tiempo.
- La producción de semillas oleaginosas con modificaciones en la composición de ácidos grasos mediante fitomejoramiento e ingeniería genética.
- Uso de los aceites tropicales (por ejemplo aceites de palma, aceite de almendra de palma y aceite de coco) y fraccionamiento de estos.
- Interesterificación de mezclas de grasas.

Algunas de estas tecnologías han estado disponibles para la industria alimentaria desde hace algún tiempo, sin embargo, por varias razones, incluyendo problemas de costos y técnicos, la industria no las implementa (Tarrago *et al.* 2006), por lo que se plantea el empleo de lipasas que presentan beneficios y reducción del contenido de grasas trans después de exponer los procesos que emplean la industria de aceites.

5.5 Industria de aceites y grasas

Los aceites refinados, pueden embotellarse y así venderse directamente, o bien, pueden someterse a otras reacciones físicas y químicas que modifican sus propiedades para hacerlos más funcionales y apropiados para la fabricación de alimentos; en algunos se requiere que los lípidos tengan una cierta tendencia a la cristalización, en otros un determinado punto de fusión o ciertas propiedades de resistencia a la oxidación. Las aplicaciones tecnológicas de las grasas dependen de sus propiedades físicas y químicas. Estas propiedades están limitadas por la composición de ácidos grasos y la estereoquímica de los triglicéridos (TG) (Ribeiro *et al.* 2009).

Los métodos que se emplean para modificar y diseñar las grasas y los aceites van desde la simple mezcla física de dos o más grasas o aceites, hasta otros muy laboriosos como el fraccionamiento, la hidrogenación y la interesterificación (Farfán *et al.* 2013, Ribeiro *et al.* 2009). El método más empleado por la industria para lograr la consistencia semisólida deseada, es la hidrogenación, siendo la más utilizada a través del tiempo, sin embargo, esta puede conducir a la producción de ácidos grasos trans (Farfán *et al.* 2013). A continuación se explican estos tres métodos.

5.5.1 Fraccionamiento

Es la separación de un aceite en dos o más de sus fracciones constitutivas mediante un enfriamiento controlado, que se puede o no efectuar con disolventes (acetona o hexano) o con agentes tensoactivos (jabones y detergentes) (Zaliha *et al.* 2004).

El proceso de fraccionamiento consiste en:

- a) Enfriamiento controlado del aceite decolorado.
- b) Reposo para permitir el crecimiento de los cristales.
- c) Separación por filtración o centrifugación en frío, lo que se facilita si los cristales son grandes.

El fraccionamiento húmedo (con disolventes) es más efectivo que el seco, pero implica una mayor inversión en equipos y en controles. Las fracciones obtenidas de esta manera tienen diversos usos en la industria de alimentos; por ejemplo la separación del aceite de palma genera la “estearina” de alto punto de fusión y la “oleína”, que es un excelente aceite para freír, mientras que una fracción del palmiste se emplea como sustituto de la manteca de cacao (Zaliha *et al.* 2004).

5.5.2 Hidrogenación

La hidrogenación parcial de aceites vegetales es una reacción importante en la industria alimentaria, que se utiliza para la producción de margarinas y grasas a partir de aceites. Químicamente, la hidrogenación de aceites es la reducción de los dobles enlaces de los ácidos grasos insaturados a enlaces simples saturados, por la reacción de un hidrógeno en presencia de un catalizador metálico (Tarrago *et al.* 2006).

La hidrogenación convencional de aceites vegetales se lleva a cabo en un autoclave discontinuo agitado (típicamente 30,000-90,000 libras de aceite). Como catalizador se usa el níquel (0,01-0,15% en peso), a 110-190 °C, 30-70 psi de presión de hidrógeno, soportado sobre tierra de diatomeas, sílice-alúmina o de carbono. Las diversas reacciones que ocurren durante la hidrogenación pueden ser descritas por el mecanismo Horiuti-Polanyi, el hidrógeno difunde a través del aceite líquido y se adsorbe en el catalizador de superficie donde se disocia en el hidrógeno adsorbido y reaccionan con la molécula de ácido graso adsorbido para formar un medio hidrogenado intermedio inestable (Singh *et al.* 2010). Dependiendo de la concentración de hidrógeno en la superficie del catalizador, este complejo puede ganar un átomo de hidrógeno y de ese modo hidrogenar o perder un átomo y se puede isomerizar (Singh *et al.* 2010).

Durante la hidrogenación los ácidos grasos insaturados están sujetos fundamentalmente a tres transformaciones químicas:

- a) Saturación de una proporción determinada de los dobles enlaces.
- b) Isomerización *cis-trans* de otra parte de dichos ácidos.
- c) Isomerización posicional de algunas insaturaciones, que se lleva a cabo en menor intensidad que en los otros dos cambios.

Durante este proceso, debido a los mecanismos de reacción, el doble enlace *cis* se puede abrir y se reforma en un doble enlace *trans*, además de generar cambio de posiciones a lo largo de la cadena del ácido graso. Mediante el ajuste de los parámetros de reacción de la hidrogenación, tales como concentración de catalizador, presión de hidrógeno, temperatura y agitación, la producción de dobles enlaces *trans* puede ser modulada. Por ejemplo, la formación máxima de isómeros de AGT se consigue a presiones de hidrógeno bajas (100 a 200 kPa), altas temperaturas (200 °C a 215 °C), y una concentración de catalizador de 0,005% de níquel / aceite (Tarrago *et al.* 2006).

Los principales objetivos de la hidrogenación son reducir al mínimo el ácido linolénico (C18: 3), debido a su pobre estabilidad a la oxidación, manteniendo el ácido linoleico (C18: 2), ya que forma una parte valiosa de la dieta humana, y minimizando la formación del ácido graso saturado ácido esteárico (C18: 0) (Singh *et al.* 2010). Adicionalmente la hidrogenación cambia la temperatura de fusión de los aceites vegetales, de modo que queden sólidos o semi-sólidos a temperatura ambiente, aumenta su tiempo de conservación, estabilidad oxidativa, además de proporciona estabilidad, sabor y textura (Laurian & Jagmanaitė 2008, Tarrago *et al.* 2006).



Figura 23. Hidrogenación del ácido linoleico (C18:2) a ácido oleico (C18:1) (Singh *et al.* 2010).

Aunque se ha usado durante mucho tiempo, la hidrogenación parcial permite la formación de grasas trans, que como se mencionó anteriormente son consideradas como factor de riesgo para padecer enfermedad coronaria, por lo que se han buscado métodos que reduzcan la formación de las grasas trans en los alimentos. En respuesta a esto, la interesterificación química ha demostrado ser la principal alternativa para la obtención de grasas con bajo contenido de isómero trans. A diferencia de la hidrogenación parcial, este proceso no isomeriza el doble enlace de los ácidos grasos y no afecta su grado de saturación (Ribeiro *et al.* 2009).

5.5.3 Interesterificación

La interesterificación es la hidrólisis del enlace éster entre el ácido graso y glicerol y posterior reformación del enlace éster entre los ácidos grasos mixtos libres y glicerol. La mezcla resultante de triglicéridos está formada por ácidos grasos distribuidos de diferente manera. La interesterificación se puede realizar utilizando una mezcla compuesta por varios aceites o por un solo aceite con uno o diferentes ácidos grasos. Esta puede ser química o enzimática y ha sido especialmente utilizada en la formulación de margarinas y grasas (Ribeiro *et al.* 2009, Rasera *et al.* 2012).

5.5.3.1 Interesterificación química

La reacción de interesterificación se refiere a una movilización de los radicales acilos de los acilglicéridos y una subsiguiente reorganización. Existen tres mecanismos de reacción (Klinkesorn 2004):

- La acidólisis que se lleva a cabo entre un ácido y un éster.
- La alcoholólisis entre un éster y un alcohol y se usa en la producción de mono y diacilglicérido cuando reaccionan triacilglicéridos con glicerina.
- La trans-esterificación efectuada entre dos esteres, que es la más empleada para modificar las grasas y aceites,

Originalmente la transesterificación se llevaba a cabo calentando la grasa a temperaturas hasta de 250°C durante varias horas, pero esto, además de provocar reacciones secundarias de polimerización y de descomposición muy indeseable, tiene el inconveniente del largo tiempo que se requiere. La Interesterificación química implica a menudo el uso de catalizadores metales alcalinos (Rasera *et al.* 2012), muy efectivos que hacen posible que proceda aún a temperaturas de refrigeración. Sin embargo, la mayoría de los procesos industriales trabajan en el intervalo de 55 a 135°C. Los catalizadores empleados son zinc, estaño, ácido sulfúrico y sulfónico, acetatos, carbonatos, cloruros y nitratos de sales metálicas, hidróxidos de sodio, litio y potasio, aleaciones de sodio y potasio, amidas de sodio y, finalmente, metóxido de sodio, este último es el más común y se utiliza generalmente a temperaturas de 50 a 120°C en una concentración de 0.05 a 0.5%, y se requiere un tiempo máximo de reacción de dos horas. La cantidad del catalizador alcalino no debe ser excesiva ya

que de otra manera provoca la saponificación de las grasas y la formación de muchos jabones. Además, hay que tener cuenta que algunos productos, como el metóxido de sodio, son muy propensos a la inactivación o al envenenamiento causado por el agua (0.01% es suficiente), por ácidos grasos libres (0.05%) y por peróxidos (0.5%); una pequeña cantidad de agua es suficiente para detener el proceso ya que ésta reacciona muy fácilmente con el catalizador y lo descompone. Por estas razones, el lípido que se use como materia prima debe estar bien refinado y muy seco (Maria *et al.* 2009).

La interesterificación química modifica la composición de triacilglicerol del aceite o la grasa y por lo tanto sus propiedades físicas, la cristalización y el comportamiento de fusión, el contenido de grasa sólida y la textura, contribuyendo a una mayor disponibilidad de las fracciones de aceite para las diferentes aplicaciones en los productos alimenticios (Rasera *et al.* 2012). Este proceso presenta varias desventajas, dentro de las cuales incluye el intercambio aleatorio de grupos acilo, la contaminación del producto final con el catalizador residual y la formación de jabones (sales de sodio de ácidos grasos, monoacilgliceroles y diacilgliceroles) (Rasera *et al.* 2012).

5.5.3.2 Interesterificación enzimática

Se realiza mediante el uso de lipasas microbianas, es un proceso selectivo ya que las lipasas interactúan con ciertos enlaces éster de triglicéridos específicos (por ejemplo, 1,3-lipasas). Esta se prefiere sobre la interesterificación química cuando se requiere una composición de triglicéridos más precisa (Tarrago *et al.* 2006), ya que actúa sobre una región específica donde se realiza el intercambio de ácidos grasos y evita reacciones secundarias (Rasera *et al.* 2012).

La industria de aceites en Colombia aun no emplea este proceso tecnológico; sin embargo se han realizado varios estudios intentando establecer las mejores condiciones de estas enzimas con aceite de palma y ácido esteárico, para obtener grasas con diversas aplicaciones entre las que se resaltan los equivalentes a la manteca de cacao la cual es empleada en la elaboración de varios productos otorgando estabilidad y suavidad (Moreno *et al.* 2006, Carrera *et al.* 2002)

5.5.4 Aplicaciones de las lipasas

La producción de papel, textiles, alimentos, productos químicos y farmacéuticos consume grandes cantidades de materias primas y energía, y generan grandes cantidades de residuos con un impacto negativo sobre el medio ambiente y la calidad de vida. Es bien sabido que hay una necesidad urgente de reducir el impacto por unidad de producto producido para sostener las necesidades humanas sin comprometer los recursos naturales, es por esto que las industrias de todo el mundo deben buscar tecnologías alternativas que puede ayudar a producir el creciente número de productos que se demandan cada año, consumiendo menos recursos y generando un impacto menor sobre el ambiente.

El uso de materiales de origen biológico y producción de procesos, conocidos como la biotecnología industrial, es una tecnología alternativa tal que se podría utilizar para reemplazar o complementar las tecnologías convencionales para avanzar hacia procesos de producción más limpios. Entre las biotecnologías, la transformación enzimática es vista como una de las alternativas más prometedoras y sostenibles a los procesos convencionales. El uso de enzimas para la elaboración de productos de consumo humano se ha empleado desde hace al menos 2000 años, cuando los microorganismos se utilizaron en procesos tales como la elaboración de pan con levaduras y la sacarificación del arroz en producción de koji. Actualmente hay alrededor de 5500

enzimas conocidas, que se clasifican según el tipo de reacción que catalizan (oxidorreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas) (Jegannathan & Nielsen 2013).

Las lipasas se encuentran entre las enzimas más ampliamente utilizadas en la tecnología con enzimas, porque reconocen una amplia variedad de sustratos y pueden catalizar muchas reacciones diferentes, hidrólisis o síntesis de los enlaces ésteres, alcoholisis, aminolisis, peroxidaciones, interesterificación, etc (Rodrigues *et al.* 2010). La versatilidad hace que estas enzimas sean de amplia elección para aplicaciones potenciales en alimentos, detergentes, productos farmacéuticos, cuero, textil, cosmética y papel (Kapoor & Nath 2012, Colla *et al.* 2010).

5.5.4.1 Generalidades de las lipasas

Las lipasas (EC 3.1.1.3, triacilglicerol lipasa) son enzimas que catalizan la hidrólisis de grasas y aceites actuando sobre el grupo carboxílico en enlaces éster, con la liberación de ácidos grasos, diglicéridos, monoglicéridos y glicerol y forman parte de la familia de las hidrolasas (Kapoor & Nath 2012, Hasan *et al.* 2006). Se pueden dividir en dos grupos principales sobre la base de su capacidad para hidrolizar glicéridos, no específicas que catalizan reacciones en todos los grupos hidroxilo y por lo tanto pueden eliminar el ácido graso de todas las posiciones del triglicérido, como por ejemplo, lipasas producidas por *Candida cylindracea*, *Staphylococcus aureus*, *Chromobacterium viscosum* y *Pseudomonas* spp.) y las 1,3-específicas, que catalizan reacciones sólo en las posiciones externas es decir, sn-1 y sn-3 de la cadena principal de glicerol, por ejemplo, las lipasas de *Aspergillus niger*, *Mucor javanicus*, *Humicola lanuginosa*, *Rhizopus oryzae*, *R. niveus* y *Penicillium roquefortii* (Kapoor & Nath. 2012, Sharma *et al.* 2001).

Estas enzimas pueden ser de origen vegetal, animal y microbiano, aunque por estabilidad y producción a gran escala y bajo costo, la industria prefiere enzimas de origen microbiano. Actualmente han sido ampliamente estudiadas las lipasas extracelulares procedentes de *Candida*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizopus* y *Candida rugosa*, quienes expresan estas enzimas como factores de virulencia (Nguyen *et al.* 2010).

Además de su función natural de hidrolizar enlaces éster carboxílico, las lipasas son capaces de catalizar una gran variedad de reacciones, tales como hidrólisis parcial o completa de los triglicéridos, reacciones de esterificación, transesterificación e interesterificación de lípidos (Kapoor & Nath. 2012, Colla *et al.* 2010).

5.5.4.2 Las lipasas en la industria de grasas

Las lipasas son usadas en dos distintos ámbitos, en la catálisis para la manufactura de otros productos (como ingredientes alimentarios) y con fines de aplicaciones (producción de químicos). Dentro de la industria alimentaria, las lipasas, como su nombre lo indica, básicamente hidrolizan lípidos produciendo ácidos grasos y glicerol, y además participan en la acidólisis, como en la transesterificación (Rivera & García 2007).

La primera enzima estudiada fue la lipasa de *Rhizomucor* (previamente *Mucor miehei* RML), la cual se describió por primera vez en 1973. Pocos años más tarde, se describió su uso en la transformación de alimentos, siendo una esterasa capaz de actuar sobre una serie de grasas naturales tales como aceites vegetales, carne de res, manteca de cerdo y un número de sustratos sintéticos incluyendo ésteres de sorbitol de ácidos grasos. El primer informe del uso de RML fue

hidrólisis de grasa animal y aceite vegetal para mejorar el sabor característico del queso italiano cuando la enzima se añadió a la leche (Rodrigues *et al.* 2010).

5.5.4.2.1 Hidrolisis- interesterificación

Al realizar la interesterificación con lipasas microbianas se busca en muchos casos mejorar las propiedades físicas de los aceites, como lo es su fluidez y el punto de fusión, permitiendo la elaboración de productos más saludables (Rodrigues *et al.* 2010). Tomando el ejemplo de la lipasa de *Rhizomucor* se presentan las diferentes reacciones que pueden ser catalizadas por dicha enzima. La hidrólisis de aceites es la función natural de las lipasas, por esta razón una aplicación de RML, es la hidrólisis parcial de glicéridos en diferentes aceites vegetales (Figura 24).

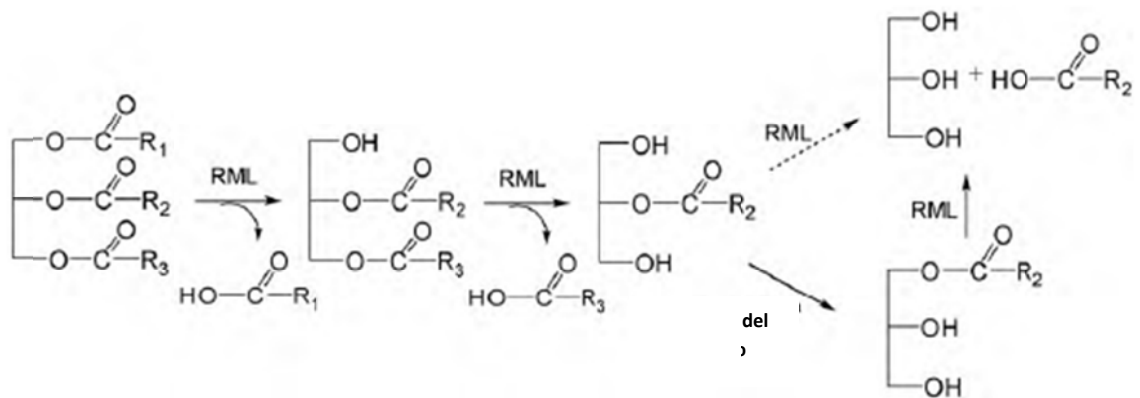


Figura 24. Esquema general de la hidrólisis completa de los triglicéridos catalizada por RML para producir ácidos grasos libres (Rodríguez *et al.* 2010).

La interesterificación es otra reacción que pueden catalizar dichas enzimas, que se puede realizar utilizando una mezcla compuesta por varios aceites, sólo un aceite con diferentes ácidos grasos o un aceite de un solo ácido graso y ésteres determinados (Figura 25).

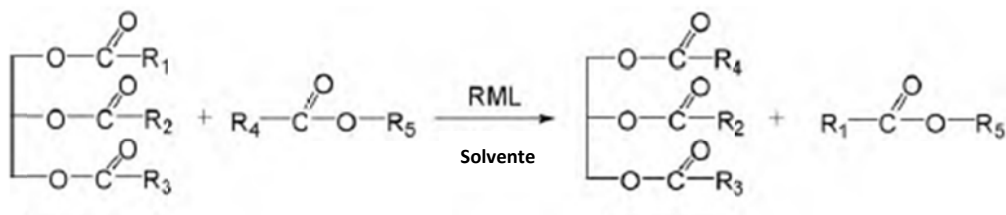


Figura 25. Esquema general de la interesterificación catalizada por RML (Rodríguez *et al.* 2010)

La acidólisis es una reacción ampliamente empleada como estrategia para producir lípidos estructurados mediante RML, es útil para cambiar la composición de ácidos grasos en un enlace éster, en el cual el grupo acil se intercambia entre un éster y un ácido graso o entre dos esteres (Figura 26) (Sanchez 2007).

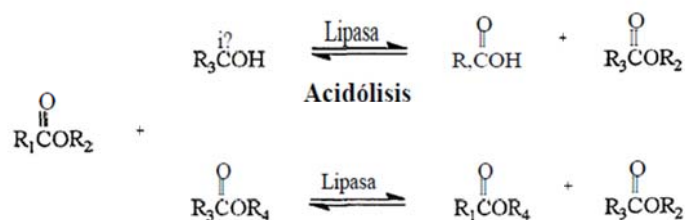


Figura 26. Tipos de interesterificación con lipasas (Sanchez 2007)

5.5.5 Mecanismos para la concentración de AGPI

Los principales métodos para la concentración de ácidos grasos omega 3 con ácidos grasos poliinsaturados son separación cromatografía, destilación fraccionada o molecular y la cristalización a baja temperatura, sin embargo actualmente se plantea la hidrólisis catalizada por las lipasas, la cual se ha demostrado ser un proceso sencillo y selectivo para la producción de ácidos grasos omega 3 concentrados con AGPI (Kahveci & Xuebing 2011, Kralovec *et al.* 2012, Rubio *et al.* 2010). Generalmente se lleva a cabo por hidrólisis o por interesterificación (Rubio *et al.* 2010). La preparación de aceites enriquecidos en ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) es uno de los principales objetivos en la tecnología de los alimentos, debido a las propiedades beneficiosas de estos compuestos.

En los últimos años la producción de alimentos funcionales enriquecidos con n-3 ácidos grasos, ha aumentado en Europa y EE.UU, donde hoy en día existe una gran variedad de productos comerciales como el pan, productos de panadería, leche y derivados, grasas para untar, huevos, jugos, refrescos, productos de carne y aves de corral. Algunos investigadores han informado que los ácidos grasos omega-3 son mejor absorbidos por el organismo humano además de ser más estables frente a la oxidación cuando están en forma de acilglicéridos que como ésteres y cuando se limita a la posición sn-2 de la estructura del glicerol. Por lo tanto, la producción de concentrados con acilglicéridos omega-3 en la posición sn-2 ha adquirido un gran interés (Rubio *et al.* 2010).

Actualmente existen varios estudios que describen el empleo lipasas, como lo es el caso del empleo de la lipasa de *Candida rugosa* con el fin de aumentar los ácidos grasos omega 3 en aceite de salmón, lo cual permitió un incremento del contenido de EPA de 5,46% a 10%, el contenido de DHA el cual se concentró 2,8 veces de su nivel original, para un total de 38,71% del contenido de omega 3 en el aceite, siendo el doble del contenido inicial (Kahveci & Xuebing 2011). En otro estudio con la misma enzima, el EPA aumentó 34% y el DHA 30% en aceite de atún (Rubio *et al.* 2010). Con el empleo de la lipasa de *Candida antarctic*, otra levadura, se obtuvo 26 % EPA y 45% DHA (Robles *et al.* 2000). Por otro lado, con el empleo de la lipasa bacteriana de *Pseudomonas fluorescens* se obtuvo 56 % más de contenido de EPA y DHA (Pawongrat *et al.* 2007). En general se realizan estudios en los cuales se busca determinar las mejores condiciones para obtener mejores rendimientos en la concentración de estos ácidos grasos (Torres *et al.* 2005, Kojima *et al.* 2006, Jaroslav *et al.* 2012). Como se puede ver se están llevando a cabo estudios que permitan el empleo de estas enzimas para mejorar productos y así contribuir a la salud de la población, por lo que es importante conocer estos procesos.

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 CONCLUSIONES

- ✓ *F. oxysporum* (162) procedente de lesión cutánea de canino presentó la mayor actividad fosfolipasa.
- ✓ *F. solani* (108) procedente de lesión en ojo de vaca presentó actividades fosfolipasa y esterasa, además de la mejor de actividad lipasa en los dos sustratos empleados.
- ✓ Se observó que *F. oxysporum*, *F. solani* y *F. verticillioides*, independientemente del origen de aislamiento, presentaron actividad lipasa en mantequilla y margarina, siendo *F. solani* la especie presente tanto en aislamientos de plantas como de animales y de humanos, la que mostró mejor actividad lipolítica en los diferentes sustratos evaluados.
- ✓ De los sustratos empleados se podría decir que entre la mantequilla y la margarina, en la mantequilla se presentó mayor actividad, por lo que se sugiere utilizar este sustrato a la hora de evaluar actividad lipasa y realizar su cuantificación con p nitrofenil-palmitato.
- ✓ Tanto la yema de huevo como la tributirina permitieron evidenciar la actividad fosfolipasa y esterasa, respectivamente, pero para realizar la cuantificación se sugiere buscar otro sustrato o método para la actividad lipasas y el uso de p nitrofenil- butirato para esterasa.
- ✓ La industria de aceites debe buscar alternativas que disminuyan la concentración de grasas trans en sus productos ya que estas son perjudiciales para la salud, pues modifican las concentraciones de lipoproteínas (HDL, LDL), además de alterar o afectar procesos biológicos; esto se puede realizar por medio de la interesterificación enzimática con lipasas microbianas.
- ✓ Como se pudo ver con ayuda de la biotecnología se pueden mejorar procesos para evitar compuestos perjudiciales, además de la obtención de nuevos productos con beneficios sobre la salud; todo esto mediado por lipasas microbianas, las cuales a pesar de ser consideradas mecanismo de patogenicidad se pueden emplean en beneficio de la población.

6.2 RECOMENDACIONES

- ✓ Evaluar diferentes condiciones (temperatura, pH, fuentes de carbono, nitrógeno y concentraciones de sales) que determinen una actividad lipolítica mejor.
- ✓ Cuantificar la actividad lipolítica con p-nitrofenil ésteres de diferentes números de carbonos que permita evidenciar la actividad de todas las lipasas, además de probar diferentes solventes que permitan una mejor reacción.
- ✓ Evaluar otros sustratos inductores como aceite de girasol, aceite de palma, aceite de maíz, tween de diferente composición.

- ✓ Evaluar diferentes detergentes o emulsificantes que permitan la interacción de las lipasas con los sustratos y en este caso volver a probar el aceite de oliva.
- ✓ El inicio de la reducción de grasas trans en la dieta de las personas se da desde la elección como tal de alimentos, por lo que se recomienda que las personas eviten consumir alimentos elaborados con aceites parcialmente hidrogenados (pastelería, repostería, comidas rápidas).
- ✓ Se debe exigir que los productos en su etiquetado enuncien el contenido de grasas trans y enseñar a leer las etiquetas.
- ✓ Se recomienda que la industria de aceites colombiana empiece a emplear la interesterificación enzimática, ya que no solo disminuye la formación de grasas trans, si no que con el empleo de esta tecnología con el aceite de palma siendo uno de los grandes productores de este, se obtienen derivados aprovechables por esta.

7. BIBLIOGRAFIA

Baccouri O, Guerfel M, Baccouri B, Cerretani L, Bendini A, *et al.* (2008) Chemical composition and oxidative stability of Tunisian monovarietal virgin olive oils with regard to fruit ripening. *Food Chemistry* 109(4):743–54.

Beys da silva W, Santi L, Schrank A, Vainstein M (2010) *Metarhiziumanisopliae* lipolytic activity plays a pivotal role in *Rhipicephalus* (Boophilus) microplus infection. *Fungal biology*. 114: 10–15.

Beys W, Mitidieri S, Schrank A, Vainstein M (2005) Production and extraction of an extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Metarhiziumanisopliae*. *Process Biochemistry* 40: 321–326.

Bolivar L, Mora O (2010) Fatty acids, vitamin E and nutritional labeling of margarines and spreads 17(3):106–14.

Bourlieu C, Bouhallab S, Lopez C (2009) Biocatalyzed modifications of milk lipids: applications and potentialities. *Trends in Food Science & Technology* 20(10):458–69.

Burkert JFDM, Maldonado RR, Filho FM, Rodrigues MI (2005) Comparison of lipase production by *Geotrichumcandidum* in stirring and airlift fermenters. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 80(1):61–7.

Bushelman, Callen JP, Roth DN, Cohen LM (1995) Disseminated *FusariumSolani* Infection. *Journal of the American Academy of Dermatology* 32: 346-51.

Cajal Y, Busquets MA, Carvajal H, Girona V, Alsina MA (2003) Effects of a fungal lipase on membrane organization evaluated by fluorescence polarization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 22(5-6):315–28.

Camacho N, Gil J (2008) Evaluacion preliminar de modelos de infeccion *Fusarium sp.*, Aislados de procesos patologicos en planatas, animales y humanos, trabajo de grado. Pontificia universidad Javeriana.

Canaria G (2007) Detección de compuestos organoclorados en tortugas marinas varadas en las Islas Canarias y causas de mortalidad.

Carrera JE, Clave P (2002) Production and application of industrial enzymes. *Facultad de Ciencias Agropecuarias Colombia*. 10 Vol 1 No.1

Castells M, Marín S, Sanchis V, Ramos AJ (2008) Distribution of fumonisins and aflatoxins in corn fractions during industrial cornflake processing. *International journal of food microbiology* 123(1-2):81–7.

Carlile M.J, Watkinson S.C, Graham W.G (1994) *The Fungi*. Segunda Edición. Elsevier Academic Press. Amsterdam, Holanda.

Castro M, Bolado V, Landa M, Liceaga M, Soto J, López J (2010) Ácidos grasos trans de la dieta y sus implicaciones metabólicas. *México* Vol. 146 No.

Cetin Y, Bullerman LB (2005) Cytotoxicity of Fusarium mycotoxins to mammalian cell cultures as determined by the MTT bioassay. *Food and chemical toxicology* 43(5):755–64.

Chairperson J, Belgium G, Germany H, Ireland I, Croatia Z, Verschuren M (2012) The Fifth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of nine societies and by invited experts) Developed with the special contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR). *Atherosclerosis* 223; 1-68.

Coleman J, Muhammed M, Kasperkovitz P, Vyas J, Mylonakis A (2011) Fusarium pathogenesis investigated using *Galleria mellonella* as a heterologous host. *Fungal biology* 115: 1279-1289

Colla L, Rizzardi J, Heidtmann M, Reinehr C (2010) Simultaneous production of lipases and biosurfactants by submerged and solid-state bioprocesses. *Bioresource Technology* 101: 8308–8314.

Christiansen E, Schnider S, Palmvig B, Tauber-Lassen E, Pedersen O (1997) Intake of a diet high in trans monounsaturated fatty acids or saturated fatty acids. Effects on postprandial insulinemia and glycemia in obese patients with NIDDM. *Diabetes Care*; 20:881-887.

Díaz de Castro F, Restrepo M A, Rojas W (2007) *Microbiología de las infecciones humanas*. Primera edición. Corporación para investigaciones Biológicas. Medellín Colombia.

Di Pietro A, González MI (2005) Temas de actualidad: *Fusarium oxysporum*: un modelo para el análisis de la patogénesis fúngica en plantas y humanos. *Actualidad Sem*, 37: 6-13.

Dong X, Ling N, Wang M, Shen O, Guo S (2012) Fusaric acid is a crucial factor in the disturbance of leaf water imbalance in *Fusarium*-infected banana plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 60: 171-179.

Encuesta nacional de la situación nutricional en Colombia 2012- ENSIN.

Fahy E, Cotter D, Sud M, Subramaniam S. Lipid classification, structures and tools (2011) *Biochimica et Biophysica Acta* 1811. 637–647.

Farfán M, Villalón MJ, Ortíz ME, Nieto S, Bouchon P (2013) The effect of interesterification on the bioavailability of fatty acids in structured lipids. *Food Chemistry Available*.

Frank J. Louws, Cary L. Rivarda, Chieri Kubota(2010) Grafting fruiting vegetables to manage soilborne pathogens, foliar pathogens, arthropods and weeds.*Scientia Horticulturae* 127: 127–146.

Fojan P, Jonson PH, Petersen MT, Petersen S (2000) What distinguishes an esterase from a lipase: a novel structural approach. *Biochimie* 82(11):1033–41.

Fuciños P, Abadín CM, Sanromán a, Longo M a, Pastrana L, Rúa ML (2005) Identification of extracellular lipases/esterases produced by *Thermusthermophilus* HB27: partial purification and preliminary biochemical characterisation.*Journal of biotechnology*117(3):233–41.

Glenn A (2007)Mycotoxigenic *Fusarium* species in animal feed. *Animal Feed Science and Technology*.137: 213–240.

Giani C (1997) Usual clinical features of Fingernail infection by *Fusariumoxysporum*. *Mycoses* 40: 455-459.

Grisol S, Tecnol P, Cantos T (2005) Noncommercial Microbial Lipases in Hydrolytic and Synthetic Reactions.

Guadarrama V, López O, Reyes M, Castillo J y Santos A (2008) Recubrimiento comestible basado en goma arábica y carboximetilcelulosa. *Rev. Chapingo*14 (3):235–41.

Gottlich E, de Hong GS, Yoshida S, Takeo K, Nishimura K, Miyaji M (1995) Cell-surface hydrophobicity and lipolysis as essential factors in human tinea nigra. *Mycoses* 38: 489–494.

Goujard L, Villeneuve P, Barea B, Lecomte J, Pina M *et al.* (2009) A spectrophotometric transesterification-based assay for lipases in organic solvent. *Analytical Biochemistry* 385: 161–167.

Gutleb AC, Morrison E, Murk AJ (2002) Cytotoxicity assays for mycotoxins produced by *Fusarium* strains: a review. *Environmental toxicology and pharmacology* 11(3-4):309–20.

Hårdeman F, Sjöling S (2007) Metagenomic approach for the isolation of a novel low-temperature-active lipase from uncultured bacteria of marine sediment. *Microbiology Ecology* 59(2):524-34.

Hasan F, Ali Shah A, Hameed A (2006) Industrial applications of microbial lipases.*Enzyme and Microbial Technology*. 39: 235–251.

Hasan F, Ali Shah A, Hameed A (2009) Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. *Biotechnology Advances* 27: 782–798.

Heinz Wagner K, Plasser E, Proell C, Kanzler S (2008) Comprehensive studies on the trans fatty acid content of Austrian foods: Convenience products, fast food and fats. *Food Chemistry* 108: 1054–1060.

Helisto P, Korpela T (1998) Effects of detergents on activity of microbial lipases as measured by the nitrophenylalkanoate esters method. *Enzyme and Microbial Technology* 23:113–117.

Heras M (2009) Susceptibilidad Antifúngica y Filogenia Molecular de Especies del Genero *Fusarium* de Interés Clínico. Tesis Doctoral. Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques. Universitat Rovira I Virgili, Reus, España.

Hoog GS, Guarro J, Gene J, Figueras MJ (2003) Atlas of Clinical Fungi: centraalbureau Voorshimmelcultures.

Hu FB, Stampfer MJ, Manson JE, Rimm E, Colditz GA, Rosner BA (1997) Dietary fat intake and the risk of coronary heart disease in women. *Journal Medicine*; 337:1491-1499.

Hurtado A (2012) Caracterización fenotípica de aislamientos de *malasseziasspp.* de origen canino. Tesis de pregrado. Facultad de ciencias. Pontificia universidad Javeriana. Colombia.

Ishida K, Alviano D.S, Silva B, Guerra C.R, Costa A.S *et al* (2012) Negative correlation between phospholipase and esterase activity produced by *Fusarium* isolates. *Braz J Med Biol Res* Volume 45(5) 411-416.

Jaroslav A. Kralovec A, Zhang S, Zhang W, Barrow C (2012) A review of the progress in enzymatic concentration and microencapsulation of omega-3 rich oil from fish and microbial sources. *Food Chemistry*; 131:639–644.

Jarvis GN, Thiele JH (1997) Qualitative Rhodamine B assay which uses tallow as a substrate for lipolytic obligately anaerobic bacteria. *Journal of Microbiological Methods* 29(1):41–7.

Jegannathan KR, Nielsen PH (2013) Environmental assessment of enzyme use in industrial production – a literature review. *Journal of Cleaner Production*; 42:228–40.

Juntachai W, Oura T, Yamagata S, Kajiwara S (2009) The lipolytic enzymes activities of *Malassezia* species. *Medical Mycology* 47, 477-484.

Kadir T, Gümrü B, Uygün-Can B (2007) Phospholipase activity of *Candida albicans* isolates from patients with denture stomatitis: the influence of chlorhexidine gluconate on phospholipase production. *Archives of oral biology* 52(7):691–6.

Kaushik R, Saran S, Isar J, Saxena RK (2006) Statistical optimization of medium components and growth conditions by response surface methodology to enhance lipase production by *Aspergillus carneus*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 40(3-4):121–6.

Kahveci D, Xuebing X (2011). Repeated hydrolysis process is effective for enrichment of omega 3 polyunsaturated fatty acids in salmon oil by *Candida rugosa* lipase. *Food Chemistry*. 129(4):1552–8.

Kapoor M, Nath M (2012) Lipase promiscuity and its biochemical applications. *Process Biochemistry* ;47: 555–569.

Katan MB, Zock PL, Mensink RP (1995) Trans fatty acids and their effects on lipoproteins in humans. *Annu Rev Nutrition*;15:473-493.

Klinkesorn U (2004) Chemical transesterification of tuna oil to enriched omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Food Chemistry*;87 (3):415–21.

Kojima Y, Sakuradani E, Shimizu S (2006) Acidolysis and Glyceride Synthesis Reactions Using Fatty Acids with two *Pseudomonas* lipases having different substrate Specificities. *Journal of bioscience and bioengineering*, Japan Vol. 102, No. 3, 179–183

Koolman J, Rohm K (2004) Bioquímica. Texto atlas. 3 Edición. Editorial Panamericana. Madrid. Pag 46.

Kralovec J, Zhang S, Zhang W, Barrow CJ (2012) A review of the progress in enzymatic concentration and microencapsulation of omega-3 rich oil from fish and microbial sources. *Food Chemistry*; 131(2):639–44.

Kumar V, Basu MS, Rajendran TP (2008) Mycotoxin research and mycoflora in some commercially important agricultural commodities. *Crop Protection* 27(6):891–905.

Kumar CP, Menon T, Sundararajan T, Nalini S, Thirunarayan MA, Rajasekaran S, *et al.* (2006) Esterase activity of *Candida* species isolated from immunocompromised hosts. *Rev IberoamMicol* 23: 101-103.

Kummerow F (2009) The negative effects of hydrogenated trans fats and what to do about them. *Atherosclerosis*;205(2):458–65

Kummerow FA, Zhou Q, Mahfouz MM (1997) Effect of trans fatty acids on calcium influx into human arterial endothelial cells. *Journal Clinical of Nutrition*;70:832-838.

Laurian J, Jagmanaite E (2008) Getting rid of trans fats in the US diet: Policies, incentives and progress. *Food Policy* 33: 497–503.

Lee M-H, Oh K-H, Kang C-H, Kim J-H, Oh T-K, Ryu C-M, *et al* (2013) Novel metagenome-derived, cold-adapted alkaline phospholipase with superior lipase activity as an intermediate between phospholipase and lipase. *Applied and environmental microbiology* 14:4959–66.

Leslie JF, Summerell BA (2006) *The Fusarium Laboratory Manual*. Primera edición. Editorial: 84 Blackwell Publishing. Iowa, Estados Unidos 386.

Liu R, Jiang X, Mou H, Guan H, Hwang H, Li X (2009) A novel low-temperature resistant alkaline lipase from a soda lake fungus strain *Fusarium solani* N4-2 for detergent formulation. *Biochemical Engineering Journal* 46(3):265–70.

López E, Schulze MB, Meigs JB, Manson JE, Rifai N, Stampfer MJ (2005) Consumption of trans fatty acids is related to plasma biomarkers of inflammation and endothelial dysfunction. *Journal of Nutrition*; 135:562-566.

Luo Z-H, Wu Y-R, Chow RKK, Luo J-J, Gu J-D, Vrijmoed LLP (2012) Purification and characterization of an intracellular esterase from a *Fusarium* species capable of degrading dimethyl terephthalate. *Process Biochemistry* 47(5):687–93.

Maia M, Heasley A, Camargo de Morais M, Melo E, Morais M, Ledingham W, Lima J (2001) Effect of culture conditions on lipase production by *Fusarium solani* in batch fermentation. *Bioresource Technology* 76 23-27.

Manshor N, Rosli H, Azliza Ismail N, Salleh B and Zakaria L (2012) Diversity of *Fusarium* Species from Highland Areas in Malaysia. *Tropical Life Sciences Research* 23(2), 1–15.

Maria R, Alves DB, Augusto C, Mendes JS, Silva JS, Ferreira A (2009) Simulation of Process Interesterification in Fluidized Bed Bioreactor for Production of Biodiesel. *Elsevier* 1803–8.

Menea F, Menea A, Tréton J, Menea B (2013) Technological approaches to minimize industrial trans fatty acids in foods. *Journal of food science* 78(3):R377–86.

Mendivil CO, Sierra ID, Pérez CE. Valoración del riesgo cardiovascular global y prevalencia de dislipemias según los criterios del NCEP-ATP III en una población adulta de Bogotá, Colombia. *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis*. 2004 Jan; 16(3):99–107.

Moreno N, Arango L, Perea J (2006) transformación de la oleína de palma por interesterificación enzimática con lipasas inmovilizadas- obtención de equivalentes de la manteca de cacao. *Centro de investigación en ciencia y tecnología de alimentos (CICTA)*.

Mozaffarian D, Aro A, Willett WC (2009) Health effects of trans-fatty acids: experimental and observational evidence. *Europe Journal Clinical Nutrition* ;63 S5- S21.

Mozaffarian D (2006) Trans fatty acids. Effects on systemic inflammation and endothelial function. *AtherosclerSuppl*;7:29-32.

Muhsin TM, Hadi RB (2001) Degradation of keratin substrates by fungi isolated from sewage sludge. *Mycopathologia* 154: 185 - 189.

Nunes P, Pires-Cabral P, Ferreira-Dias S (2011) Production of olive oil enriched with medium chain fatty acids catalysed by commercial immobilised lipases. *Food Chemistry*. 127(3):993–8.

Nguyen L, Thi Dao T, Zivković T, Fehrhol M, Schafer W, Salomon S (2010) Enzymatic properties and expression patterns of five extracellular lipases of *Fusarium graminearum* in vitro. *Enzyme and Microbial Technology* 46: 479–486.

Olivares R, Díaz MC, Luis J (2005) Fusariosis diseminada por *Fusarium oxysporum* en un paciente adulto con leucemia mieloide aguda y neutropenia severa febril. *Revista Chilena de Neumología y Bronquiología* 22(4):356–60.

Okada T, Morrissey M (2007) Production of n-3 polyunsaturated fatty acid concentrate from sardine oil by lipase-catalyzed hydrolysis. *Food Chemistry* 103: 1411–1419.

Ortoneda M, Guarro J, Madrid MP, Caracuel Z, Roncero MI, Mayayo E, Di Pietro A. (2004) *Fusarium oxysporum* as a Multihost Model for the Genetic Dissection of Fungal Virulence in Plants and Mammals. *Infection and Immunity* 72: 1760-66.

Palmeira VF, Kneipp LF, Alviano CS, dos Santos ALS (2010) Phospholipase and esterase production by clinical strains of *Fonsecaea pedrosoi* and their interactions with epithelial cells. *Mycopathologia* 170(1):31–7.

Palomo I, Torres G, Alarcón M, Maragaño P, Leiva E, and Mujica V (2006). High Prevalence of Classic Cardiovascular Risk Factors in a Population of University Students From South Central Chile. *Revista Española Cardiología* 59 (11):1099-105.

Park Y (2009) Conjugated linoleic acid (CLA): Good or bad trans fat?. *Journal of Food Composition and Analysis* 22: 4–12.

Pawongrat R, Xu X, Kittikun A (2007) Synthesis of monoacylglycerol rich in polyunsaturated fatty acids from tuna oil with immobilized lipase AK. *Food Chemistry*; 104: 251–258.

Price MF, Wilkinson ID, Gentry LO (1982) Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia* 20: 7-14.

Rasera K, Osório NM, Mitchell DA, Krieger N, Ferreira-Dias S (2012) Interesterification of fat blends using a fermented solid with lipolytic activity. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 76:75–81.

Rapp P (1995) Production, regulation, and some properties of lipase activity from *Fusariumoxysporum*f. sp. *vasinfectum*. *Enzyme and Microbial Technology* 17:832-838.

Ribeiro A, Grimaldi R, Gioielli L, Gonçalves L (2009) Zero trans fats from soybean oil and fully hydrogenated soybean oil: Physico-chemical properties and food applications. *Food Research International*;42(3):401–10.

Rivera Pérez C, García Carreño F (2007) Enzimas Lipolíticas y su Aplicación en la Industria del Aceite Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, A.P. 128.

Robles M, Cerdan L, Gimenez A, Camacho B, Ibañez M, Molina E (2000) Lipase-catalyzed esterification of glycerol and polyunsaturated fatty acids from fish and microalgae oils. *Journal of Biotechnology*; 70:379–391.

Rodrigues RC, Fernandez R (2010) Lipase from *Rhizomucormiehei* as a biocatalyst in fats and oils modification. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*;66(1-2):15–32.

Rodríguez A, Esteban L, Martín L, Jiménez MJ, Hita E, Castillo B (2012) Synthesis of 2-monoacylglycerols and structured triacylglycerols rich in polyunsaturated fatty acids by enzyme catalyzed reactions. *Enzyme and microbialtechnology*; 51(3):148–55.

Roncero MI, Di Pietro A, Ruíz-Roldán MC, Huertas-González MD, García-Maceira FI *et al* (2000) Papel de enzimas líticas de la pared celular en la patogenicidad de *Fusarium oxysporum*. *Revista Iberoamericana de Micología* 17: 47-53.

Roncero M, Hera C, Ruiz-Rubio M, García G, Madrid M, Caracuel Z, Calero F *et al.* (2003) *Fusarium* as a model for studying virulence in soilborne plant pathogens. *Physiological and Molecular PlantPathology* 62:87–98.

Rubio N, Beltrán S, Jaime I, de Diego SM, Sanz MT, Carballido JR (2010) Production of omega-3 polyunsaturated fatty acid concentrates: A review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*;11(1):1–12.

Sautour M, Edel-Hermann V, Steinbergc C, Sixt N,Laurentc J, *et al* (2012) *Fusarium*species recovered from the water distribution system of a French university hospital. *International Journal of Hygiene and EnvironmentalHealth*215: 286–292.

Sanchez A (2007) Recuperación, purificación y caracterización de lipasas producidas por *Candida rugosa*. Aplicación a la resolución de compuestos quirales y diseño del reactor enzimático. Programa de Doctorado. Universidad Autónoma de Barcelona.

Sharma R, Chisti Y, Chand Banerjee U (2001) Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances* 19: 627–662.

Singh. D, Rezac M.E, Pfromm P.H (2010) Partial hydrogenation of soybean oil using metal-decorated integral-asymmetric polymer membranes: Effects of morphology and membrane properties. *Journal of Membrane Science* 348: 99–108.

Stehr, M. Kretschmar, C. Kröger, B. Hube, W. Schäfer (2003) Microbial lipase as virulence factors. *Journal of molecular Catalysis B; Enzymatic* 22: 347–355.)

Sugihara A, Shimada Y, Takada N, Nagao T, Tominaga Y. *Penicillium abeanum* lipase: (1996) Purification, characterization, and its use for docosahexaenoic acid enrichment of tuna oil. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 82(5):498–501

Summerell BA, Leslie JF, Backhouse D, Bryden WL, Burgués LW. (2001) Fusarium: Paul E. Nelson Memorial symposium: *American Phytopathological Society Press*.

Tamargo B, Herrera L, Bello A, Cuéllar A, González H, Sierra G, Morales M, Ortiz L. (2011) Obtención de fosfolípidos a partir de la lecitina de soya (*Glicinimax L*), para usos biomédicos. *Revista Cubana de Química*, Vol. XXIII:5–14.

Tamerler C, Keshavarz T (2000) Lipolytic enzyme production in batch and fed-batch cultures of *Ophiostomaceae* and *Fusarium oxysporum* 790: 785–90.

Tarrago MT, Phillips KM, Lemar LE, Holden JM (2006) New and existing oils and fats used in products with reduced trans-fatty acid content. *Journal of the American Dietetic Association*.

Torres C, Lin B, Lessard L, Hill C (2005) Lipase-mediated transesterification of menhaden oil with the ethyl ester of conjugated linoleic acid: multi-response kinetics. *Biochemical Engineering Journal*; 23: 107–116.

Ülker S, Karaoğlu ŞA (2012) Purification and characterization of an extracellular lipase from *Mucor hiemalis* f. *corticola* isolated from soil. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 114(4):385–90.

Kojima Y, Sakuradani E, Sakayu S (2006) Acidolysis and Glyceride Synthesis Reactions Using Fatty Acids with Two *Pseudomonas* Lipases Having Different Substrate Specificities. *Journal of bioscience and bioengineering* Vol. 102, No. 3, 179–183.

Ward OP, Singh A (2005) Omega-3/6 fatty acids: Alternative sources of production. *Process Biochemistry*. 40(12):3627–52.

Zaliha O, Chong C, Cheow C, Norizzah, Kellens M (2004) Crystallization properties of palm oil by dry fractionation. *Food Chemistry* 86(2):245–50.

ANEXOS

Anexo 1. Medios de cultivo

Agar Sabouraud + 10% Yema de huevo

Agar Sabouraud 65 g/l

NaCl 58.4 g/l

CaCl₂ 0.05 g/l

Yema de huevo estéril 100 ml (Adicionar después de autoclavar)

Caldo 10% yema de huevo

NaCl 58.4 g/l

CaCl₂ 0.05 g/l

Yema de huevo estéril 100 ml

Agar Tributirina – Aceite de oliva

Peptona 5 g/l

Extracto de levadura 3 g/l

Agar 18 g/l

Triton x-100 0,01%

Tributirina / Aceite de oliva 1% (Se añade después de autoclavar)

Rodamina B 1ml/100 ml (Se añade después de autoclavar)

Se sonica por 30 min a la máxima temperatura agitando fuertemente cada 5 min.

Caldo Tributirina

Peptona 5 g/l

Extracto de levadura 3 g/l

Triton x-100 0,01% (Se añade después de autoclavar)

Tributirina 1% (Se añade después de autoclavar)

Se sonica por 30 min a la máxima temperatura agitando fuertemente cada 5 min.

Agar base tributirina con Mantequilla - Margarina

Peptona 5 g/l

Extracto de levadura 3 g/l

Agar 18 g/l

Mantequilla / Margarina 20 g/l

Rodamina B 1ml/100 ml (Se añade después de autoclavar)

Se sonica por 30 min a la máxima temperatura agitando fuertemente cada 5 min.

Caldo Mantequilla

Peptona 5 g/l

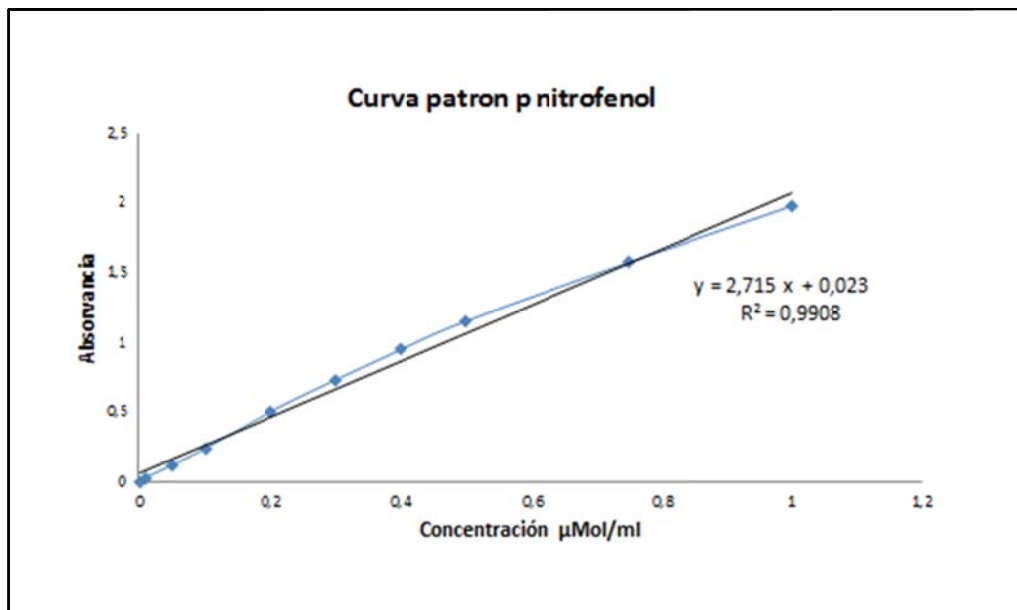
Extracto de levadura 3 g/l

Mantequilla / Margarina 20 g/l

Se sonica por 30 min a la máxima temperatura agitando fuertemente cada 5 min.

Anexo 2. Curva de Calibración P nitrofenol

Se realizó una solución de p nitrofenol fosfato a una concentración 100 $\mu\text{mol/ml}$ en buffer fosfato 0,1 M pH 7.0. A partir del stock se prepararon soluciones de 0,1 $\mu\text{mol/ml}$ a 10 $\mu\text{mol/ml}$ en buffer fosfato 0,1 M pH 7.0 volumen final 250 μl . A continuación se procedió a leer en lector de Elisa MicroplatereaderBioradImark a 405 nm utilizando como blanco buffer fosfato 0,1 M pH 7.0. Finalmente se realizó la curva patrón graficando la absorbancia en función de la concentración de p nitrofenol $\mu\text{mol/ml}$.



Anexo 3. Resultados prueba enzimática lipolítica semicuantitativa

3.1 Sustrato yema de huevo

Cepas	Precipitado cm 1 lectura (3 días)	Desviación estándar	Precipitado cm 2 lectura (4 días)	Desviación estándar	Precipitado cm 3 lectura (5 días)	Desviación estándar	Precipitado cm 4 lectura (6 días)	Desviación estándar
108	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,20
161	0,00	0,00	0,00	0,00	2,20	0,30	2,40	0,50
162	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,20	2,70	0,60
201	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,30	0,70
203	0,00	0,00	0,00	0,00	1,30	0,30	1,70	0,80
205	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,50	0,90
310	0,00	0,00	0,00	0,00	1,30	0,90	1,80	0,20
314	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
319	0,00	0,00	0,00	0,00	1,60	1,10	1,80	0,60
404	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
406	0,00	0,00	0,00	0,00	1,20	0,30	1,70	0,70
409	0,00	0,00	0,00	0,00	1,50	0,50	2,30	0,40
C+ <i>Geotrichums</i> p	0,00	0,00	0,00	0,00	2,50	0,30	2,80	0,40

3.2 Sustrato Tributirina

Cepas	Halo de hidrólisis cm 1 lectura (3 días)	Desviación estándar	Halo de hidrólisis cm 1 lectura (4 días)	Desviación estándar	Halo de hidrólisis cm 1 lectura (5 días)	Desviación estándar
108	0,60	0,00	1,10	0,30	1,50	0,30
161	0,30	0,10	0,40	0,10	0,80	0,10
162	0,30	0,10	0,30	0,20	0,40	0,20
201	0,30	0,20	0,60	0,00	0,50	0,00
203	0,30	0,10	0,50	0,10	0,70	0,10
205	0,40	0,10	0,70	0,30	1,00	0,40
310	1,00	0,40	0,50	0,10	0,80	0,20
314	0,30	0,00	0,40	0,00	0,50	0,20
319	0,20	0,10	0,40	0,20	0,30	0,20
404	0,30	0,30	0,30	0,20	0,40	0,20
406	0,50	0,20	0,80	0,40	1,00	0,50
409	0,40	0,10	0,40	0,10	0,40	0,10
C+ <i>Geotrichum</i> sp	1,60	0,10	0,20	0,10	0,20	0,20

3.3 Sustrato Aceite de Oliva

Cepas	Precipitado cm 1 lectura (3 días)	Desviación estándar	Precipitado cm 2 lectura (4 días)	Desviación estándar	Precipitado cm 3 lectura (5 días)	Desviación estándar	Precipitado cm 4 lectura (6 días)	Desviación estándar
108	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
161	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
162	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
201	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10	0,00
203	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
205	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
310	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
314	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
319	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10	0,00
404	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
406	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
409	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C+ <i>Geotrichum</i> sp.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

3.4 Sustrato Margarina

Cepas	Precipitado cm 1 lectura (3 días)	Desviación estándar	Precipitado cm 2 lectura (4 días)	Desviación estándar	Precipitado cm 3 lectura (5 días)	Desviación estándar
108	2,80	0,70	4,10	0,40	4,70	0,70
161	2,20	0,30	2,70	1,10	3,70	1,20
162	1,60	1,10	2,80	2,20	3,10	0,80
201	0,00	0,00	1,80	1,30	2,20	1,60
203	2,10	0,20	2,50	0,80	3,50	1,10
205	2,70	0,30	3,40	0,60	3,60	0,60
310	2,10	0,80	2,30	0,70	2,80	0,90
314	1,00	0,80	2,70	0,30	3,20	0,40
319	0,00	0,00	1,80	1,20	4,00	0,80
404	2,10	1,70	2,10	1,50	2,70	1,90
406	2,30	2,00	2,90	1,00	3,70	1,00
409	1,80	1,20	2,20	1,60	2,40	1,60
C+ <i>Geotrichum</i> sp	2,10	0,50	2,50	0,40	2,90	0,20

3.5 Sustrato Mantequilla

Cepas	Precipitado cm 1 lectura (3 días)	Desviación estándar	Precipitado cm 2 lectura (4 días)	Desviación estándar	Precipitado cm 3 lectura (5 días)	Desviación estándar
108	2,30	0,40	4,20	0,20	5,00	0,30
161	2,60	0,20	3,10	2,10	3,50	0,20
162	2,40	0,20	3,70	0,10	3,90	1,50
201	0,00	0,00	1,80	1,20	3,00	0,10
203	0,00	0,00	1,40	0,20	2,40	0,10
205	1,70	0,40	3,10	0,10	3,80	0,50
310	0,90	0,20	3,40	1,30	3,70	0,20
314	0,00	0,00	3,50	0,30	4,40	0,40
319	0,00	0,00	3,50	0,40	4,00	0,80
404	0,20	0,20	3,50	0,40	4,20	0,50
406	2,40	0,30	3,40	0,40	3,40	1,10
409	0,30	0,10	2,20	0,20	2,70	0,20
C+ <i>Geotrichum</i> sp.	2,00	0,40	2,40	0,30	2,80	0,40

3.6 Tabla resumen resultados por orden de actividad presentada en la prueba semicuantitativa

Aislamiento	Actividad Lipolítica (sustratos)				
	Lipasa verdadera			Fosfolipasa	Esterasa
	Mantequilla	Margarina	Aceite de oliva	Yema de huevo	Tributirina
108	2	3	-	4	1
161	1	2	-	3	4
162	2	3	-	1	4
201	1	2	5	3	4
203	1	2	-	3	4
205	1	2	-	3	4
310	1	2	-	3	4
314	1	1	-	-	3
319	1	2	5	3	4
404	1	2	-	-	3
406	1	2	-	3	4
409	2	3	-	1	4
Geotrichum	1	2	-	3	4

Anexo 4. Resultados prueba enzimática lipolítica cuantitativa

4.1 Sustrato yema de huevo

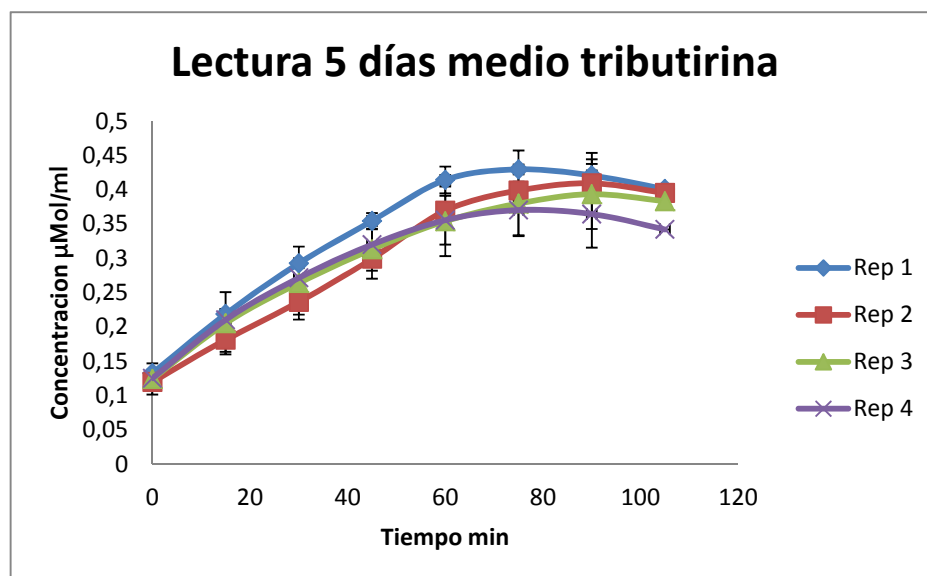
La lectura se realizó dejando incubar la placa a 35°C cada 30 min por 3 h.

Cepas	UL / ml 30 min	DS	UL / ml 1 h	DS	UL / ml 1:30 min	DS	UL / ml 2 h	DS	UL / ml 2:30 min	DS	UL / ml 3 h	DS
108	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
161	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
162	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
201	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
203	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
205	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
310	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
314	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
319	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
404	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
406	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
409	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C+Geotric hum sp.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

UL se define la cantidad de enzima capaz de liberar 1 μ mol de p nitrofenol por minuto bajo las condiciones de la prueba.

4.2 Sustrato Tributirina

Para escoger la hora de incubación para el muestre se realizó lectura dejando incubar la placa a 35°C cada 30 min por 3 h, con el aislamiento 314. Y se escogió 30 min de incubación.



Resultados de todos los aislamientos a los 30 min de incubación

Cepa	UL/ ml	Ds
108	0,001	0
161	0,014	0
162	0,003	0
201	0,005	0
203	0,012	0
205	0,004	0
310	0,011	0
314	0,003	0
319	0,004	0
404	0,005	0
406	0,007	0
409	0,004	0
<i>Geotrichum</i> sp.	0,005	0

4.3 Sustrato Mantequilla

Cepa	UL	Ds
108	0,003	0
161	0,001	0
162	0,002	0
201	0,001	0
203	0,003	0
205	0,003	0
310	0,005	0
314	0,008	0
319	0,001	0
404	0,0003	0
406	0,005	0
409	0,002	0
<i>Geotrichum</i> sp.	0,0008	0

Anexo 5. Análisis estadístico prueba enzimáticas semicuantitativas

5.1 Sustrato Yema de huevo

ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
t1	Inter-grupos	33,743	12	2,812	11,105	3,7 X10 ⁻⁹
	Intra-grupos	9,875	39	,253		
	Total	43,618	51			
t2	Inter-grupos	35,969	12	2,997	8,583	1,19X 10 ⁻⁷
	Intra-grupos	13,620	39	,349		
	Total	49,589	51			

Prueba Post hoc

120 h		n	Subconjunto para alfa = 0.05				
			1	2	3	4	
Duncana	108,00	4	,0000				
	201,00	4	,0000				
	205,00	4	,0000				
	314,00	4	,0000				
	404,00	4	,0000				
	203,00	4	,6750	,6750			
	406,00	4		,8750	,8750		
	162,00	4		1,1000	1,1000		
	310,00	4		1,2750	1,2750		
	409,00	4			1,5250		
	319,00	4			1,5750		
	161,00	4			1,6750		
	100,00	4				2,5500	
	Sig.			,103	,131	,053	1,000

144 h		Subconjunto para alfa = 0.05				
	n	1	2	3	4	
Duncana	314,00	4	,0000			
	404,00	4	,0000			
	108,00	4		1,1000		
	406,00	4		1,2750		
	201,00	4		1,3250		
	205,00	4		1,4500	1,4500	
	203,00	4		1,7250	1,7250	
	310,00	4		1,7750	1,7750	
	161,00	4		1,8250	1,8250	
	319,00	4		1,8500	1,8500	
	409,00	4			2,3250	
	162,00	4			2,7750	
	100,00	4			2,7750	
Sig.			1,000	,131	,072	,317

5.2 Sustrato Tributirina

ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
t1	Inter-grupos	6,431	12	,536	14,615	6,8X10 ⁻¹¹
	Intra-grupos	1,430	39	,037		
	Total	7,861	51			
t2	Inter-grupos	3,109	12	,259	2,952	0,005
	Intra-grupos	3,424	39	,088		
	Total	6,533	51			
t3	Inter-grupos	6,229	12	,519	9,373	3,7X10 ⁻⁸
	Intra-grupos	2,160	39	,055		
	Total	8,389	51			

Prueba post hoc

72 h			Subconjunto para alfa = 0.05		
		n	1	2	3
Duncana	319,00	4	,2250		
	161,00	4	,2750		
	162,00	4	,3000		
	203,00	4	,3000		
	314,00	4	,3250		
	201,00	4	,3250		
	404,00	4	,3250		
	409,00	4	,3500		
	205,00	4	,4250		
	406,00	4	,4500		
	108,00	4	,4750		
	310,00	4		,9250	
	100,00	4			1,5500
	Sig.		,128	1,000	1,000

96 h			Subconjunto para alfa = 0.05			
		n	1	2	3	4
Duncana	100,00	4	,1750			
	319,00	4	,2150	,2150		
	162,00	4	,3500	,3500	,3500	
	314,00	4	,3500	,3500	,3500	
	409,00	4	,3750	,3750	,3750	
	161,00	4	,4250	,4250	,4250	
	205,00	4	,4500	,4500	,4500	
	310,00	4	,5500	,5500	,5500	
	201,00	4	,6250	,6250	,6250	,6250
	203,00	4		,7000	,7000	,7000
	404,00	4			,7250	,7250
	406,00	4			,8000	,8000
	108,00	4				1,0750
	Sig.		,074	,054	,076	,061

120 h		Subconjunto para alfa = 0.05						
	n	1	2	3	4	5	6	
Duncana	100,00	4	,1750					
	319,00	4	,3250	,3250				
	162,00	4	,3500	,3500	,3500			
	404,00	4	,3750	,3750	,3750			
	409,00	4	,4000	,4000	,4000			
	314,00	4	,5250	,5250	,5250	,5250		
	201,00	4	,5500	,5500	,5500	,5500		
	203,00	4		,7000	,7000	,7000	,7000	
	161,00	4			,7250	,7250	,7250	
	310,00	4				,8250	,8250	
	205,00	4					,9750	
	406,00	4					,9750	
	108,00	4					1,5000	
Sig.			,056	,056	,056	,115	,148	1,000

5.3 Sustrato margarina

ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
t1	Inter-grupos	41,403	12	3,450	5,464	0,000
	Intra-grupos	24,625	39	,631		
	Total	66,028	51			
t2	Inter-grupos	21,017	12	1,751	1,470	0,178
	Intra-grupos	46,478	39	1,192		
	Total	67,494	51			
t3	Inter-grupos	23,045	12	1,920	1,754	0,092
	Intra-grupos	42,705	39	1,095		
	Total	65,750	51			

Pruebas post hoc

72 h		Subconjunto para alfa = 0.05			
		n	1	2	3
Duncana	201,00	4	,0000		
	319,00	4	,0000		
	314,00	4	1,0000	1,0000	
	162,00	4		1,5500	1,5500
	409,00	4		1,7250	1,7250
	404,00	4		2,1000	2,1000
	100,00	4		2,1250	2,1250
	310,00	4		2,1250	2,1250
	161,00	4		2,1750	2,1750
	406,00	4			2,3250
	203,00	4			2,5000
	205,00	4			2,7250
	108,00	4			2,8500
	Sig.		,100	,076	,056

96 h		Subconjunto para alfa = 0.05		
		n	1	2
Duncana	201,00	4	1,7500	
	319,00	4	1,7750	
	203,00	4	2,0750	
	404,00	4	2,1250	
	409,00	4	2,1750	
	310,00	4	2,3250	2,3250
	100,00	4	2,4750	2,4750
	161,00	4	2,7250	2,7250
	314,00	4	2,7250	2,7250
	162,00	4	2,8000	2,8000
	406,00	4	2,9000	2,9000
	205,00	4	3,4250	3,4250
	108,00	4		4,1000
	Sig.		,076	,054

120 h		Subconjunto para alfa = 0.05			
		n	1	2	3
Duncana	201,00	4	2,1750		
	409,00	4	2,3750	2,3750	
	404,00	4	2,6500	2,6500	
	310,00	4	2,8000	2,8000	
	100,00	4	2,9000	2,9000	
	162,00	4	3,0750	3,0750	3,0750
	314,00	4	3,1750	3,1750	3,1750
	203,00	4	3,4750	3,4750	3,4750
	205,00	4	3,5750	3,5750	3,5750
	161,00	4	3,6750	3,6750	3,6750
	406,00	4	3,7250	3,7250	3,7250
	319,00	4		3,9750	3,9750
	108,00	4			4,6750
	Sig.		,085	,075	,069

5.4 Sustrato Mantequilla

ANOVA						
		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
t1	Inter-grupos	52,897	12	4,408	25,602	8,7X10 ⁻¹⁵
	Intra-grupos	6,715	39	,172		
	Total	59,612	51			
t2	Inter-grupos	43,142	12	3,595	3,518	0,001
	Intra-grupos	39,853	39	1,022		
	Total	82,994	51			
t3	Inter-grupos	35,668	12	2,972	3,088	0,004
	Intra-grupos	37,538	39	,963		
	Total	73,205	51			

Pruebas post hoc

72 h		Subconjunto para alfa = 0.05				
		n	1	2	3	4
Duncana	201,00	4	,0000			
	203,00	4	,0000			
	314,00	4	,0000			
	319,00	4	,0000			
	404,00	4	,2250			
	409,00	4	,2500			
	310,00	4	,6500	,6500		
	108,00	4		1,1000		
	205,00	4			1,7000	
	100,00	4			1,9500	1,9500
	406,00	4				2,4000
	162,00	4				2,4500
	161,00	4				2,5750
	Sig.		,060	,133	,399	,057

96 h		Subconjunto para alfa = 0.05					
		n	1	2	3	4	5
Duncana	203,00	4	1,3250				
	409,00	4	1,6250	1,6250			
	406,00	4	1,6750	1,6750			
	201,00	4	1,7750	1,7750	1,7750		
	100,00	4	2,4250	2,4250	2,4250	2,4250	
	205,00	4		3,0750	3,0750	3,0750	3,0750
	161,00	4		3,1000	3,1000	3,1000	3,1000
	310,00	4			3,3750	3,3750	3,3750
	404,00	4				3,4750	3,4750
	319,00	4				3,5250	3,5250
	314,00	4				3,5500	3,5500
	162,00	4				3,7250	3,7250
	108,00	4					4,1750
	Sig.		,178	,076	,051	,126	,196

120 h		Subconjunto para alfa = 0.05				
		n	1	2	3	4
Duncana	409,00	4	2,0250			
	203,00	4	2,4250	2,4250		
	406,00	4	2,5750	2,5750		
	100,00	4	2,7750	2,7750	2,7750	
	162,00	4	2,9000	2,9000	2,9000	
	201,00	4	2,9750	2,9750	2,9750	
	161,00	4	3,4250	3,4250	3,4250	3,4250
	310,00	4		3,6750	3,6750	3,6750
	205,00	4		3,7750	3,7750	3,7750
	319,00	4		3,9750	3,9750	3,9750
	404,00	4			4,2500	4,2500
	314,00	4			4,3500	4,3500
	108,00	4				4,9500
	Sig.		,087	,063	,059	,062

Anexo 6. Análisis estadístico prueba enzimáticas cuantitativa

6.1 Sustrato tributirina

ANOVA

Concentracion

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	,001	12	,000	6,672	1,6X10 ⁻⁶
Intra-grupos	,000	42	,000		
Total	,001	54			

Prueba post hoc

30 min		Subconjunto para alfa = 0.05		
		n	1	2
Duncana	100,00	4	,1497	
	404,00	4	,1526	
	108,00	4	,2019	,2019
	406,00	4	,2027	,2027
	201,00	4	,2277	,2277
	310,00	4	,3232	,3232
	203,00	4	,3402	,3402
	161,00	4		,4157
	314,00	4		,4323
	Sig.		,113	,057

6.2 Sustrato mantequilla

ANOVA

Concentración

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	,000	12	,000	16,673	9X10 ⁻¹¹
Intra-grupos	,000	39	,000		
Total	,000	51			

Prueba post hoc

30 min		Subconjunto para alfa = 0.05								
		n	1	2	3	4	5	6	7	8
Duncana	404,00	4	,0004							
	100,00	4	,0007	,0007						
	161,00	4	,0012	,0012						
	319,00	4	,0014	,0014	,0014					
	201,00	4	,0016	,0016	,0016					
	162,00	4		,0022	,0022	,0022				
	409,00	4		,0022	,0022	,0022				
	203,00	4			,0030	,0030	,0030			
	108,00	4				,0038	,0038			
	205,00	4					,0040	,0040		
	310,00	4						,0054	,0054	
	406,00	4							,0057	
	314,00	4								,0076
	Sig.		,185	,090	,069	,070	,242	,062	,665	1,000

6.3 Tabla resumen Resultados por orden de actividad presentada en la prueba Cuantitativa

Aislamiento	Actividad Lipolítica (sustratos)		
	Lipasa verdadera (p-nitrofenil- palmitato)	Esterasa (p-nitrofenil- Butirato)	Fosfolipasa (p-nitrofenil- palmitato)
	Mantequilla	Tributirina	Yema de huevo
108	1	2	-
161	2	1	-
162	2	1	-
201	2	1	-
203	2	1	-
205	1	2	-
310	2	1	-
314	1	2	-
319	2	1	-
404	2	1	-
406	2	1	-
409	2	1	-
Geotrichum	2	1	-