



Evaluación de la capacidad de producción de lipasas en cepas de *Yarrowia lipolytica*.

Gloria Dhení Guaní Sánchez y Adán Topiltzin Morales Vargas
Universidad de Guanajuato, Campus Celaya-Salvatierra, Sede Mutualismo.
CP. 38060, Mutualismo S/N, 38060 Celaya, Gto.

Resumen

Yarrowia lipolytica ha surgido como una importante levadura no convencional con relevancia biológica y aplicaciones biotecnológicas significativas. Entre los metabolitos producidos por *Y. lipolytica*, uno de los más importantes es una lipasa extracelular, una novedad que ha aumentado el interés de los científicos por sus aplicaciones tecnológicas en las áreas de producción de alimentos, farmacéuticos y detergentes. (Spencer 2002, Barth 1997 & Nicaud 2012).

Actualmente el desarrollo tecnológico en el campo de energías alternativas ha cobrado relevancia dadas las desventajas que presentan los combustibles fósiles. Esto ha generado la necesidad de desarrollar alternativas energéticas que sean renovables, económicas y menos nocivas para el medio ambiente. Una de estas alternativas es el uso de biocombustibles. El biodiésel es una fuente de energía limpia, que es renovable, de calidad, económicamente viable, y que contribuye a la conservación del medio ambiente, razón por la cual representa una alternativa a los combustibles fósiles.

Hasta ahora los estudios en *Y. lipolytica* para la producción de biodiesel están enfocados en el uso de cepas tipo, dejando de lado la diversidad natural de los aislados y el potencial que esta podría alojar, en el presente estudio se pretende caracterizar esta diversidad metabólica en una población de cepas desde un punto de vista enzimático, lo cual permitirá sentar las bases para la generación de estrategias de selección para aislados con altas capacidades para la producción de biodiesel.



Introducción

Y. lipolytica tiene la habilidad de crecer en sustratos como lípidos o grasas. El primer paso para que esta levadura pueda metabolizar los sustratos hidrofóbicos requiere de la acción de enzimas lipolíticas [2]. Esta levadura puede producir varios tipos de lipasas, como son lipasas intracelulares y extracelulares. Las lipasas tienen la capacidad de catalizar reacciones de interés industrial y no solo llevan a cabo la hidrólisis, también pueden realizar reacciones de esterificación, interesterificación y transesterificación. Una aplicación prometedora para las lipasas es la producción de biodiesel. Las ventajas del uso de lipasas en la producción de biocombustibles es la posibilidad de la regeneración y reutilización de la lipasa cuando esta se encuentra inmovilizada, una estabilidad térmica mayor, una mejor separación del producto y la producción de un glicerol más limpio [2-4]. Un estudio genómico amplio de *Y. lipolytica* CLIB122 reveló 25 lipasas putativas distribuidas en los seis cromosomas (A-F); de estos, 16 parálogos han sido ya reportados por Fickers, Marty [4]. Se ha reportado en algunos artículos donde la glucosa, el glicerol y los compuestos minerales nitrogenados reprimen la producción de lipasas; sin embargo, se han realizado varios estudios en los cuales se utiliza el glicerol (subproducto formado en la producción de biodiesel) como fuente de carbono. Esta última es una de las fuentes más prometedoras, puesto que ayudaría en el reciclo de este subproducto. A la fecha no se ha reportado un análisis de la variación nucleotídica de la secuencia del gen Lip2 el cual codifica para la principal lipasa de *Y. lipolytica* la cual podría correlacionar con la alta heterogeneidad de la actividad enzimática en aislados de esta levadura. Ni se cuenta con suficientes secuencias del gen Lip2 y análisis de la actividad enzimática de este microorganismo para realizar un análisis *in silico*.

Objetivos

El objetivo del presente trabajo es la evaluación de la capacidad de producción de lipasas en una colección de aislados de *Yarrowia lipolytica*.



Teniendo como objetivos específicos el comparar de manera cualitativa las capacidades de producción de lipasas de la colección de aislados y determinar el efecto del glicerol sobre la capacidad lipolítica de los aislados

Justificación

Actualmente el desarrollo tecnológico en el campo de energías alternativas ha cobrado relevancia dadas las desventajas que presentan los combustibles fósiles. Esto ha generado interés en la producción de biodiesel, el cual puede obtenerse a través de microorganismos oleaginosos. Se ha observado que el uso de levaduras para la producción de lípidos tiene diversas ventajas tales como, un ciclo de vida muy rápido, alto contenido de lípidos y perfil de ácidos grasos idóneo para la producción de biodiesel. En el presente trabajo se propone la identificación de cepas de *Yarrowia lipolytica* con alto potencial para la producción lipasas.

Metodología

Reactivación y mantenimiento de la colección de cepas de Yarrowia lipolytica.

Las 31 cepas fueron sembradas a partir de tubos que mantenían las cepas en condiciones de crio - preservación, la reactivación se llevó a cabo en medio mínimo sólido YNB (Yeast Nitrogen Base Without Amino Acids) 0.67 % YNB sin aminoácidos y sulfato de amonio (DIFCO), adicionado con 1% glucosa, y 0.5% sulfato de amonio, inoculando por estriado de una sola unidad formadora de colonia (UFC). Las cajas Petri inoculadas fueron incubadas a 28 °C hasta que se observó crecimiento.

Posteriormente, con la finalidad de preservar la colección de cepas activa, éstas son conservadas a temperatura de 4 °C, en caja Petri con medio sólido, realizando una resiembra de la colección total cada tres meses para motivos de preservación.



Producción de biomasa:

Cultivos provenientes de una sola colonia fueron incubados por 48 horas en agitación constante a 150 rpm y temperatura de 28 °C en medio líquido YEPD (Yeast Extract Peptone-Dextrose). Las células fueron cosechadas por centrifugación y resuspendidas en el mismo volumen de agua destilada estéril, posteriormente las células se lavaron 2 veces con agua destilada estéril y por último resuspendidas en un pequeño volumen de agua destilada (1/4 del volumen original) y almacenadas a 4 °C durante toda la noche.

Para determinar la concentración de células de los cultivos en medio líquido, se midió de la densidad óptica (OD_{600nm}), para lo cual se usó un espectrofotómetro marca HACH modelo DR 3900

La suspensión de células colectadas y lavadas fueron ajustadas a una OD_{600nm} de 0.1, lo que corresponde a 1 x 10⁸ cel/mL aproximadamente.

Evaluación y producción de lipasas

Con la finalidad de evaluar la producción de lipasas en las cepas de *Y. lipolytica*, se implementaron las siguientes fuentes de carbono o nitrógeno en el medio YNB (Yeast Nitrogen Base Without Amino Acids – Sigma Aldrich) de acuerdo con la metodología propuesta por Fickers et al. 2003: YNBT, 10 ml de tributirina; YNBTD, 10 ml de tributirina y 10 g de glucosa; YNDTG, 10 ml de tributirina y 10 ml de glicerol.

Los medios YNB, YNBT, YNBTD y YNBTDG fueron inoculados con 15 µl de esta suspensión con inoculación por triplicado para cada cepa. En el medio sólido el crecimiento microbiano se midió de manera cualitativa de acuerdo con el diámetro de la colonia.



Resultados

En la figura 1 se muestra cajas Petri con medio YNBT, YNBTD, YNBTG y YNB inoculadas con las cepas 21, 22, 23 Y 24 por triplicado. Se observa que aquellos medios adicionados con tributirina presenta la formación de un halo, esto debido a la hidrólisis de la tributirina por la lipasa, por el contrario, para el medio YNB adicionado con glucosa, no es posible apreciar la hidrólisis de las respectivas fuentes de carbono para las mismas cepas.

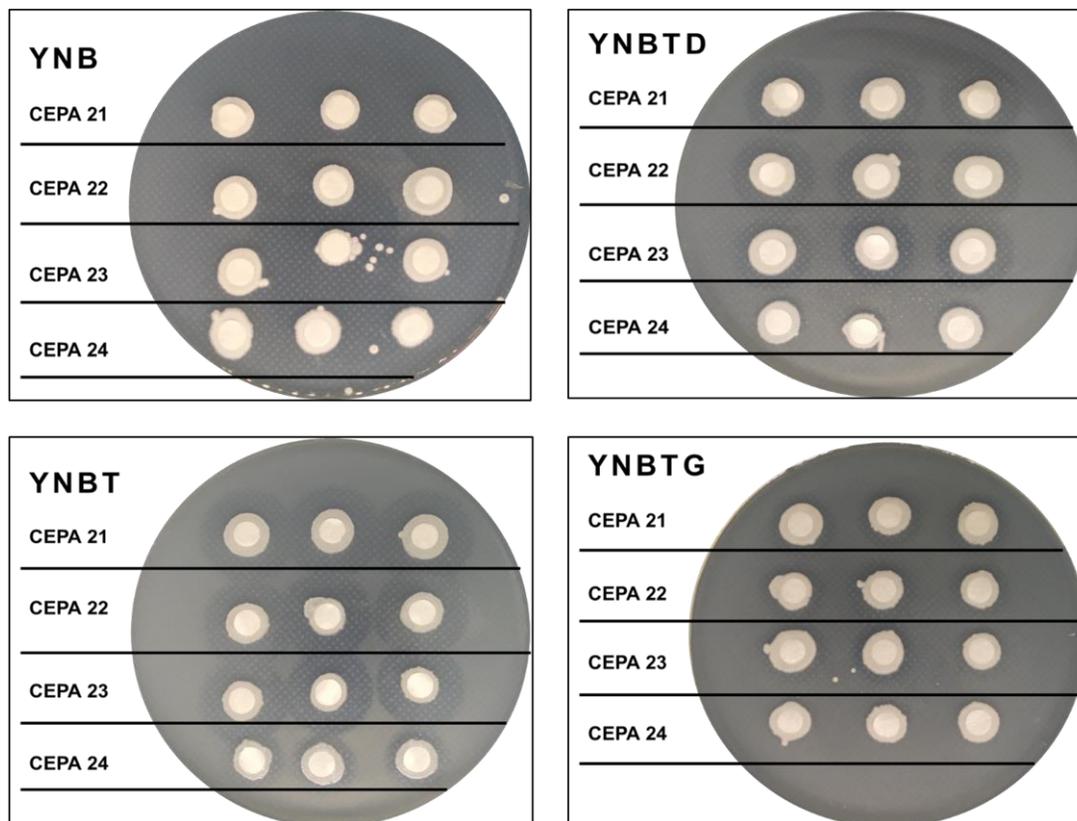


Figura 1. Cajas Petri con medio YNBT, YNBTD, YNBTDG y YNB inoculadas con las cepas 21, 22, 23 Y 24 por triplicado



Conclusiones

Las fuentes de carbono como glucosa y glicerol generan un mecanismo de represión para la lipasa LIP2, mientras que para fuentes de carbono como tributirina se mostró favorecedor para una mayor producción de lipasa.

Existen cepas dentro de la colección que presentan un mecanismo diferente al efecto del glicerol sobre la capacidad lipolítica de los aislados, teniendo la capacidad de producir la enzima en medio adicionado con glicerol. Esto indica que la represión de LIP2 por glucosa y glicerol no comparten el mismo mecanismo.

Referencias

1. Barth G. and Gaillardin C. (1997). *Physiology and genetics of the dimorphic fungus Yarrowia lipolytica*. FEMS Microbiology Reviews, 19(4), pp. 219–237. DOI: [10.1111/j.1574-6976.1997.tb00299.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1997.tb00299.x)
2. Brígida, A.I.S., et al. (2014). *Lipase from Yarrowia lipolytica: Production, characterization and application as an industrial biocatalyst*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 101: pp. 148-158. DOI: 10.1016/j.molcatb.2013.11.016
3. Fickers, P., A. Marty, and J.M. Nicaud. (2011) *The lipases from Yarrowia lipolytica: Genetics, production, regulation, biochemical characterization and biotechnological applications*. Biotechnology Advances, 29(6): pp. 632-644. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2011.04.005
4. Fukuda, R. and A. Ohta, (2013). *Utilization of Hydrophobic Substrate by Yarrowia lipolytica*, en G. Barth, Editor 2013, *Yarrowia lipolytica: Genetics, Genomics, and Physiology*. pp. 111-119. Berlin Heidelberg: Springer.
5. Nicaud J. M. (2012). *Yarrowia lipolytica*. Yeast. 29(10), 409–418. DOI: 10.1002/yea.2921
6. Spencer J. F. T., Ragout de Spencer A. L., and Laluece C. (2002). *Non-conventional yeasts*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58(2),147–156. DOI: 10.1007/s00253-001-0834-2