

ESTRATEGIAS BIOTECNOLÓGICAS PARA LA PRODUCCIÓN DE BIODIESEL A PARTIR DE *YARROWIA LIPOLYTICA*.

Samuel Noriega Zavala (1), Adán Topiltzin Morales Vargas (2), César Álvarez Mejía (3)

¹ [Ingeniería ambiental, Instituto Tecnológico Superior de Abasolo] | [samuel-norzav@hotmail.com]

² [Ingeniería Bioquímica, Instituto Tecnológico Superior de Irapuato] | [admorales@itesi.edu.mx]

³ [Ingeniería Ambiental, Instituto Tecnológico Superior de Abasolo] | [cesar.alvarez@tecabasolo.edu.mx]

Resumen

La contaminación ambiental es una problemática que atañe y afecta a la sociedad, una de las principales fuentes de origen es de carácter antropogénico, que fueron desencadenados a partir de la revolución industrial con las enormes emisiones generadas por la combustión de hidrocarburos. Por ello se han desarrollado nuevas estrategias para una producción viable que favorezca la preservación de los recursos naturales y evitar a su vez el incremento de la contaminación. Un fuerte candidato que cuenta con las características adecuadas para ello son las levaduras, particularmente *Yarrowia lipolytica* que se caracteriza por poseer un alto contenido lipídico y enzimático, explotando éstas características, se podrá producir un componente primordial del biodiesel además de optimizar su proceso de producción. En éste trabajo, evaluamos diferentes aislados *Yarrowia lipolytica*, para determinar la producción de lipasas extracelular LP2, y la acumulación de lípidos, ambas características estratégicas en la producción de biodiesel. Se está desarrollando un protocolo para la determinación de la actividad lipolítica extracelular en un medio experimental llamado medio esquilmo, así como el análisis de cepas acumuladoras de lípidos por medio de una tinción específica con negro de Sudán. Propondremos la producción de ácidos grasos libres, como las principales materias primas para la producción de biodiesel.

Abstract

Environmental pollution is an issue that concerns and affects our society, human being is the main responsible for contamination, which began after the industrial revolution with emissions from the combustion of fuels. Therefore, we have developed new strategies for a sustainable production that favors the preservation of natural resources and in turn, controls the pollution increase. A candidate who has the right features for this are the yeasts, *Yarrowia lipolytica* is characterized by accumulate a high lipid content and lipase enzyme activities, using these features, we can produce a primary component of biodiesel as a fatty acids and optimize their production process using lipases. In this work, we evaluate different isolates of *Yarrowia lipolytica*, to determine the production of extracellular lipases LP2, and lipid accumulation, both strategic characteristics in the production of biodiesel. We are developing a protocol for determining the extracellular lipolytic activity in an experimental growth medium called medium esquilmo and analyzing lipid accumulating strains by specific staining with Sudan black. We propose the production of free fatty acids, as the main raw materials for the production of biodiesel.

Palabras Clave

Yarrowia lipolytica, lipasa extracelular, ácidos grasos, biodiesel, biocombustible

INTRODUCCIÓN

Biocombustibles

Los biocombustibles son comburentes orgánicos primarios y/o secundarios derivados de la biomasa. Estos pueden ser sólidos, gaseosos o líquidos.

Para que los biocombustibles de origen agrícola sean una alternativa energética real, se necesita que estos productos, compartan características equivalentes a los de procedencia fósil.

Biodiesel

El biodiesel es un biocombustible líquido que se obtiene a partir de lípidos naturales como aceites vegetales o grasas animales; limpias o usadas, mediante procesos industriales de transesterificación.

En los procesos de producción del biodiesel se produce un subproducto como la glicerina, la cual después de ser purificada se le pueden dar otros usos en las industrias farmacéuticas y cosmética.

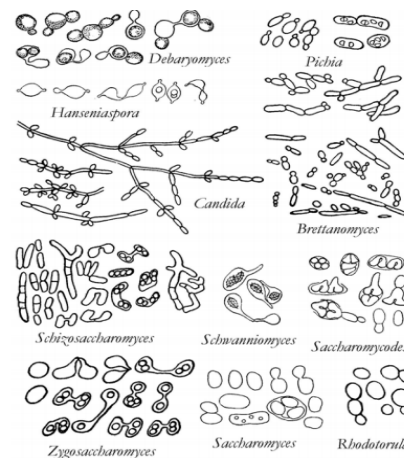
El biodiesel es el único combustible alternativo que puede usarse directamente en cualquier motor diésel, sin ser necesario ningún tipo de modificación.

El biodiesel posee las mismas características que el diésel común y puede ser empleado como combustible para automóviles u otros medios de transporte que lo utilicen. Se mezcla en proporciones cualquiera con el diésel y se obtiene como resultado de la refinación del petróleo. Algunos beneficios del biodiesel es que contiene poca concentración de azufre, debido a que contiene oxígeno en su composición química, la combustión del biodiesel reduce la emisión de monóxido de carbono e hidrocarburos no quemados al igual que con otros contaminantes [1].

Levaduras

Las levaduras son una especie de microorganismo eucariota pertenecientes al reino fungí y se caracterizan principalmente por un crecimiento vegetativo unicelular. Cuentan con diversas ventajas tales como: la fácil manipulación durante su aislamiento, presentan una tasa de crecimiento alta con requerimientos nutricionales mínimos además de no ser susceptibles a las infecciones virales. En la figura 1 se presenta los géneros más utilizados en aplicaciones tecnológicas.

Figura 1. Principales levaduras aplicadas en procesos biotecnológicos.



Yarrowia lipolytica

Yarrowia lipolytica tiene una gran importancia en estudios biotecnológicos y con amplios campos de investigación como la secreción de proteínas, biogénesis de peroxisomas, dimorfismo, altas cantidades de almacenamiento de lípidos y degradación de sustratos hidrofóbicos.

Principales características

Debido a su naturaleza aerobia estricta, *Yarrowia lipolytica* comúnmente se encuentra creciendo como contaminante en los alimentos ricos en lípidos y proteínas que habitualmente consumimos, por ejemplo: queso, yogurt, salchicha o ensaladas que contengan camarón o carnes, además, en sustratos como los alcoholes y los acetatos. Esta levadura también es comúnmente encontrada en sustratos hidrofóbicos, tales como los ácidos grasos, alcanos y parafinas, sin embargo no es capaz de crecer en sacarosa como única fuente carbón.

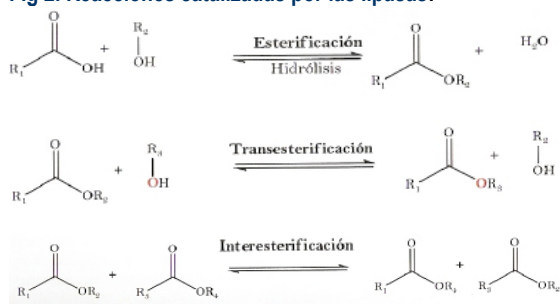
Producción de lípidos

La principal aplicación de esta especie de levadura es en la producción de biomasa que puede ser utilizada desde una levadura individual. Recientemente existe un gran interés en la habilidad de *Yarrowia lipolytica* para producir y almacenar lípidos los cuales pueden ser utilizados en la producción de biocombustibles o en la producción de aceites enriquecidos con ácidos grasos esenciales, los cuales tienen una amplia aplicación en la industria farmacéutica y alimentaria [2].

Lipasas

Las lipasas son una de las familias de enzimas más estudiadas y empleadas en los procesos industriales. Además de las reacciones de hidrólisis que catalizan, en condiciones de baja actividad de agua, son capaces de llevar a cabo reacciones no hidrolíticas: esterificaciones, transesterificaciones o interesterificaciones (Figura 2) [3].

Fig 2. Reacciones catalizadas por las lipasas.



Justificación

La implementación de un proceso de producción de materia prima para biocombustibles tales como ácidos grasos es mediante la generación de biomasa a partir de la levadura *Yarrowia lipolytica* que se caracteriza por tener un alto contenido lipídico, es por esto que es indispensable conocer otro tipo de obtención de aceites que no es el alimentario, aprovechando el potencial biotecnológico de ésta levadura podrán utilizarse las enzimas extracelulares para realizar una producción más eficiente sin la condicionante de realizar lavados del biocombustible para retirar vestigios de jabón que surgen en el proceso de elaboración. Este proyecto contribuirá al uso de combustibles ecológicamente amigables, los cuales puedan competir con los combustibles de procedencia fósil, compartiendo características energéticas similares.

MATERIALES Y MÉTODOS

Caracterización de diversos aislados de cepas de *Yarrowia lipolytica*

Las cepas de *Yarrowia lipolytica* que se utilizaron para este trabajo fueron obtenidas del cepario del Itesi Irapuato, se utilizaron 19 cepas aisladas e identificadas. La caracterización se realizó por su morfología macroscópica considerando la morfología colonial, tamaño, color, consistencia y morfología microscópica en forma levaduriforme, evaluado por el proceso de gemación.

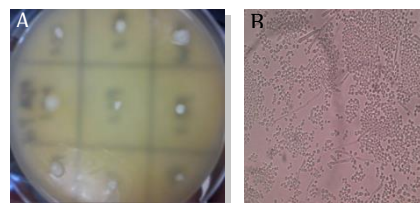


Fig. 3. (A) Análisis de la actividad lipolítica de los aislados de *Y. lipolytica* en medio agar yema de huevo. (B) Observación microscópica de estas levaduras, se observa el cambio dimórfico.

Evaluación de diversas condiciones de cultivo para las cepas de *Yarrowia lipolytica*

A las cepas de *Yarrowia lipolytica* se evaluaron las formulaciones adecuadas para la producción de biomasa, considerando los medios de cultivo líquidos tradicionales y el uso de medios preparados a partir de residuos, como el agua gris y un medio basado en esquilmo de paja de sorgo como una alternativa barata para su producción. Se cultivaron 50 ml de cada cultivo en agitación constante hasta alcanzar la fase estacionaria, con este propósito se realizó una cinética de crecimiento utilizando empleando na cámara de Neubauer contabilizando en los cuadrantes externos, se evaluó el medio óptimo para el crecimiento de *Yarrowia lipolytica* [4].

Determinación de las cepas acumuladoras de lípidos de *Yarrowia lipolytica*

La observación de los lípidos en las levaduras se realizará con la tinción Negro de Sudán, inicialmente se realizará una fijación de las cepas cultivadas en los diferentes medios de cultivo en un portaobjetos, posteriormente se fijaran al calor para ser tratadas con una mezcla de éter-etanol (1:1) y posteriormente con Negro de Sudán, el colorante de contraste será safranina. Las cepas acumuladoras mostrarán una coloración negra en las vacuolas que contengan lípidos [5].

Determinación de la actividad lipolítica de la lipasa extracelular LP2.

Para la producción de la lipasa se realizará en los medios anteriormente mencionados, en cultivos a saturación de 2 a 5 días, se centrifugará el medio retirando el paquete celular, el sobrenadante será evaluado por la actividad de lipasa al degradar una mezcla de aceite de oliva y tributirina, cuyos productos de degradación serán visualizados por cromatografía de capa fina. Se realizará posteriormente una precipitación fraccionada con sulfato de amonio para su posterior reconstitución

en regulador de fosfatos, se determinará la concentración de proteína así como la actividad enzimática [6].

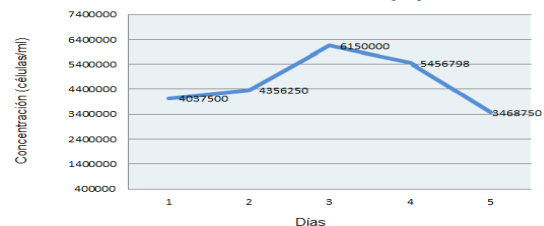
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Mediante la cámara de recuento celular, se realizaron mediciones de concentración de células en un ml de medio de cultivo. En el caso de del medio caldo dextrosa papa se utilizó un factor de dilución 1:10. Para la determinación de la concentración celular se efectuó con la siguiente formula:

$$\text{concentración} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de células} \times 10,000}{\text{N}^\circ \text{ de cuadros contados}}$$

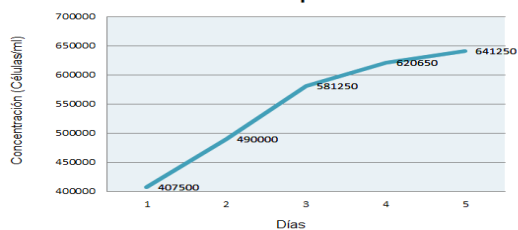
Las mediciones de recuento celular se realizaron en un periodo de 5 días hasta que las levaduras alcanzaron una fase estacionaria en la figura 4 se muestran los resultados de la cinética de crecimiento.

Fig. 4 Cinética de *Yarrowia lipolytica* en medio CDP. Medio Caldo dextrosa papa



El medio esquilmo (Figura 5) puede llegar a competir con el medio de cultivo tradicional. (Groenewald et al., 2014) recomienda emplear el medio tradicional de caldo dextrosa papa para un óptimo crecimiento, no obstante este medio puede resultar costoso en cultivos a gran escala, para ello se empleó un medio alternativo para su crecimiento.

Fig. 5 Concentración alcanzada en un periodo de 5 días por *Yarrowia lipolytica* utilizando un sustrato de medio esquilmo.



Durante la fase estacionaria del crecimiento de *Yarrowia lipolytica* en el medio esquilmo, se presentó una modificación en su estructura, denominado dimorfismo, ésta modificación puede ser resultante por cambios de pH.

CONCLUSIONES

Hemos logrado identificar las cepas adecuadas para la producción de lipasas LP2, así como las que son acumuladoras de lípidos, también hemos definido un medio alternativo al convencional, esto tiene gran importancia como base para el crecimiento de la levadura, traduciéndolo a un método más barato para la producción en masa del cultivo y así tener un mayor rendimiento de producción de ácidos grasos para la producción del biocombustible.

Sin embargo considerando éste método alternativo como sustrato, la cepa puede verse afectada por el pH del medio, produciendo una alteración en su estructura. Aún seguimos trabajando en la producción y purificación de la lipasa extracelular, así como su uso en la liberación de ácidos grasos. Estamos elaborando un protocolo para la liberación y obtención de lípidos de las cepas acumuladoras, pero inicialmente se realizará por extracción Soxhlet o extracciones con hexano en condiciones anhidras.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al laboratorio de Diversidad e Integración Microbiana del Itesi por las cepas de

Yarrowia lipolytica utilizadas en este trabajo y al laboratorio de Microbiología y Bioquímica Ambiental del Itesa por las facilidades prestadas para la realización de este trabajo.

REFERENCIAS

1. SENER, Secretaría de Energía. (2012). Energy Technology Perspectives, 2 (2), 4-6.
2. Najjar, S. Robert, C. Gu'erin, M. Violet-Asther, and F. Carri'ere. (2011). Quantitative study of lipase secretion, extracellular lipolysis, and lipid storage in the yeast *Yarrowia lipolytica* grown in the presence of olive oil: analogies with lipolysis in humans. Applied Microbiology and Biotechnology, 89 (6), 1947– 1962.
3. Verger, R. (1997). Interfacial activation of lipases: facts and artefacts. Trends in Biotechnology, 15(1), 32-38.
4. Groenewald, M., Boekhout, T., Neuvéglise, C., Gaillardin, C. (2014). *Yarrowia lipolytica*: safety assessment of an oleaginous yeast with a great industrial potential. Critical reviews in microbiology, 40 (1), 187-206.
5. Jape, A., Harsulkar, A., Sapre, V.R (2014). Modified Sudan Black B staining method for rapid screening of oleaginous marine yeasts. International journal of current microbiology and applied sciences 3 (9), 41-46.
6. Rajan, A., Kumar, S., Nair, J (2011). Isolation of a novel alkaline lipase producing fungus *Aspergillus fumigatus* MTCC9657 from aged crude rice bran oil and quantification by HPTLC. International journal of biological chemistry 5 (2), 116-126.