



Selección y caracterización de levaduras oleaginosas aisladas a partir de sistemas acuáticos de la ciudad de Cali

Lizeth Vanessa Arcos Velasco

Director:
Mauricio Ramírez Castrillón, M.Sc., Ph.D.
Codirector:
Esteban Osorio Cadavid, Ph.D.

Universidad Santiago de Cali
Facultad de Ciencias Básicas
Programa de Microbiología
Cali, Colombia
2020





Selección y caracterización de levaduras oleaginosas aisladas a partir de sistemas acuáticos de la ciudad de Cali

Lizeth Vanessa Arcos Velasco

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de:
Microbióloga**

**Director:
Mauricio Ramírez Castrillón, M.Sc., Ph.D.
Codirector:
Esteban Osorio Cadavid, Ph.D.**

**Línea de Investigación:
Biotecnología
Grupo de Investigación:
Micología**

**Universidad Santiago de Cali
Facultad de Ciencias Básicas
Programa de Microbiología
Cali, Colombia
2020**



IMPACTOS

IMPACTO	PRODUCTO	BENEFICIARIO(S)
Económico	Obtención de levaduras acumuladoras de lípidos	Comunidad en general
Científico	1 artículo científico, 1 presentación en congreso	Comunidad científica
Ambiental	El uso de levaduras oleaginosas para la producción de biodiésel ayudará a reducir la emisión de grandes cantidades de gases efecto invernadero	Universidad Santiago de Cali
Social	Experiencia de pasantía en Cenicaña	Programa de Microbiología USC

SELECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LEVADURAS OLEAGINOSAS AISLADAS A PARTIR DE SISTEMAS ACUÁTICOS DE LA CIUDAD DE CALI

Lizeth Vanessa Arcos Velasco^{1*}, Esteban Osorio-Cadavid², Luz Dary Caicedo¹, Mauricio Ramírez-Castrillón¹

¹Programa de Microbiología, Facultad de Ciencias Básicas, Universidad Santiago de Cali, Cali, Colombia.

²Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad del Valle, Cali, Colombia.

*E-mail: lizeth.arcos00@usc.edu.co

RESUMEN

Las levaduras han sido reportadas como fuente de aceite microbiano de interés industrial, pues la acumulación y perfil lipídico de cada cepa, puede presentar potencial uso como materia prima para la generación de biodiesel (ácidos grasos monoinsaturados) o alimentos (ácidos grasos poliinsaturados). Por su parte, las levaduras oleaginosas representan una opción promisoría para este fin, ya que acumulan lípidos neutros, principalmente triglicéridos, en una elevada proporción de la biomasa (20% - 70%, p/p). Así, el objetivo de este proyecto fue evaluar la capacidad acumuladora de lípidos en una colección de levaduras previamente aisladas de sistemas acuáticos de la ciudad de Cali. Se analizaron 25 cepas para determinar su posible carácter oleaginoso y se realizó un *screening* de producción de lípidos por gravimetría (peso de lípidos totales respecto a su biomasa seca), siendo seleccionadas las levaduras con mayor porcentaje de lípidos. Estas cepas se identificaron a nivel de especie usando secuenciación de regiones ribosómicas y se compararon con las secuencias de cepas tipo depositadas en las bases de datos Genbank y Mycobank. Se seleccionaron cinco cepas de levaduras que presentaron un rendimiento igual o superior al 20% g/g para la producción de lípidos.

Palabras clave: lípidos microbianos; levaduras oleaginosas; rendimiento; biodiesel

SELECTION AND CHARACTERIZATION OF OLEAGINOUS YEASTS ISOLATED FROM AQUATIC SYSTEMS IN CALI, COLOMBIA

ABSTRACT

Yeasts have been reported as a source of microbial oil of industrial interest, since the accumulation and lipid profile of each strain can present potential use as a raw material for the generation of biodiesel (monounsaturated fatty acids) or food (polyunsaturated fatty acids). Furthermore, oleaginous yeasts represent a promising option for this purpose, because they accumulate neutral lipids, mainly triglycerides, in a high proportion of biomass (20%-70%, w/w). So, the objective of this project was to evaluate the lipid accumulating capacity in a yeast collection previously isolated from aquatic systems in Cali, Colombia. 25 strains were analyzed to determine their possible oleaginous nature and a lipid production *screening* was performed by gravimetry (weight of total lipids with respect to their dry biomass), being selected the yeasts with higher percentage of lipids. These strains were identified at the species level using ribosomal regions sequencing and were compared with the sequences of type strains deposited in the Genbank and Mycobank databases. Five strains of yeasts with a yield of 20% g/g or more were selected for lipid production.

Keywords: *microbial lipids; oleaginous yeasts; yield; biodiesel*

1. INTRODUCCIÓN

Hoy en día, entre los principales problemas que enfrenta la humanidad, destacan el deterioro ambiental y la crisis energética. Una de las principales causas de la contaminación del aire es la quema de combustibles fósiles, ya que emiten grandes cantidades de gases efecto invernadero. Además, este recurso natural es una fuente energética no renovable y, a últimas fechas, se ha informado que las reservas mundiales tarde o temprano se agotarán. Por lo tanto, Colombia no puede ser ajena a las tendencias mundiales en materia de recursos energéticos y en especial, en lo que respecta a los combustibles líquidos. Como una posible solución a la problemática anterior, el uso de levaduras oleaginosas para la producción de biodiesel es una fuente atractiva para el futuro de la industria y una alternativa bastante promisoría y ambientalmente sustentable para cubrir parte de la demanda energética de combustibles derivados del petróleo destinados al transporte [1].

Todas las células vivas están constituidas por un cierto contenido de lípidos, como componente estructural o de reserva, pero no todos los microorganismos pueden ser considerados como fuente de aceites y grasas. Dentro de los microorganismos oleaginosos se incluyen las levaduras, capaces de producir y acumular por lo menos el 20% de su peso seco en lípidos, generalmente en forma de triglicéridos (TGC). Por otro lado, bajo condiciones adecuadas de cultivo los rendimientos de algunas levaduras (naturales o modificados genéticamente) pueden alcanzar valores entre 40% y 70% o más de lípidos en su composición celular en base seca [2].

El aceite microbiano, también conocido como SCO (por sus siglas en inglés *Single Cell Oil*), es aquel obtenido por los microorganismos; su composición es similar a la de aceites vegetales y animales. En comparación con los aceites de origen vegetal, los microorganismos presentan ventajas potenciales como fuentes de lípidos por su gran velocidad de generación, gran variedad de materias primas y un bajo costo al ser utilizadas como sustrato. Además, requieren menores áreas de producción para la misma cantidad de lípidos y controles más simples para la producción, son independientes de los cambios climáticos o estacionales y son aptos para la fermentación a gran escala [3].

Dentro de las levaduras más prometedoras para la producción de lípidos se encuentran los siguientes géneros: *Candida*, *Lipomyces*, *Rhodospiridium*, *Rhodotorula*, *Torulopsis*, *Trichosporon* y *Yarrowia* [4]. Aunque algunas cepas son consideradas oleaginosas, también pueden ser subdivididas en altas productoras de lípidos y bajas productoras de lípidos. Cabe resaltar que, debido a la característica natural no oleaginosa de *Saccharomyces*, la cual sólo acumula hasta el 10% de su biomasa celular en lípidos, se han realizado esfuerzos para modificarla genéticamente y así conseguir acumular mayor porcentaje de lípidos, mientras que géneros como *Rhodotorula* y *Lipomyces* son capaces de acumular hasta un 70%. Los lípidos producidos por levaduras están constituidos principalmente por ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados, tales como ácido mirístico (C14:0), palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oleico (C18:1), linoleico (C18:2) y linolénico (C18:3), los cuales son empleados como materia prima para la producción de biodiesel [5].

El rendimiento de la síntesis lipídica depende de la presencia de nutrientes en el medio de cultivo para atender la demanda nutricional del microorganismo. La composición nutricional es un parámetro importante para la producción de lípidos, pues una vez que existe un desequilibrio entre los componentes nutricionales, es decir, cuando la célula agota un nutriente clave, usualmente el nitrógeno, la asimilación de la fuente de carbono en exceso es destinada para la producción de grasa en forma de triglicéridos. De esta forma, el factor principal que determina la acumulación de lípidos en microorganismos es la relación C/N [2]. Muchos compuestos, especialmente los azúcares, pueden causar represión catabólica de varias enzimas y disminuir la velocidad de crecimiento de algunos microorganismos. Para fines económicos, es necesario encontrar fuentes de carbono diferentes de la glucosa para obtener un aceite con mayor competitividad económica. Algunas fuentes de carbono posibles son la xilosa, el almidón, la arabinosa, la manosa y residuos orgánicos industriales como el glicerol [6].

Como ya se ha mencionado, la acumulación de lípidos en microorganismos está asociada a la limitación de algún nutriente, siendo utilizada en la mayoría de los casos la limitación de nitrógeno en el medio de cultivo. Dicha limitación impide que nuevas células sean generadas mientras que el exceso de carbono asimilado por el microorganismo es convertido en lípidos, generalmente en forma de TGC [4]. Por ejemplo, la capacidad de la levadura *Cutaneotrichosporon curvatus* (antes llamado *Cryptococcus curvatus*) para sintetizar lípidos utilizando la glucosa como única fuente de carbono fue evaluada, variando la proporción de carbono y nitrógeno (C/N). Por ejemplo, el uso de nitrógeno orgánico (extracto de levadura y peptona) e inorgánico (NH₄Cl) tienen diferentes

efectos sobre el crecimiento celular y la acumulación de lípidos. El nitrógeno orgánico mejora tanto el crecimiento celular como la acumulación de lípidos mientras que el nitrógeno inorgánico es más beneficioso para la acumulación de lípidos [7].

Se ha sugerido que la limitación de sulfuro en el medio de cultivo, es efectiva para la acumulación de lípidos (58,3%) de la levadura *R. toruloides* Y4 en presencia de una fuente de nitrógeno en exceso y utilizando glucosa como sustrato, en un tiempo de fermentación de 122,5 h. Esto podría ser una estrategia valiosa para producir lípidos microbianos utilizando materias primas relativamente baratas y con sustratos ricos en nitrógeno como el hidrolizado de quitina [8]. Adicionalmente, se observó que, el agotamiento de nitrógeno promueve una mayor acumulación de lípidos en levaduras oleaginosas, obteniendo un mayor contenido de lípidos en 35 especies de las 37 levaduras evaluadas [9]. Existen otros parámetros que influyen en la síntesis de lípidos de las levaduras oleaginosas. La adición de sales, minerales y las condiciones de cultivo como temperatura, pH, suministro de oxígeno ejercen una influencia marcante en la acumulación de lípidos [10].

Por otro lado, en presencia de un exceso de carbono y después del agotamiento de un nutriente esencial en el medio (generalmente nitrógeno), las levaduras oleaginosas desvían el flujo de carbono de la producción de energía a la síntesis de lípidos. El agotamiento de nitrógeno disminuye la concentración de monofosfato de intracelularadenosina (AMP), lo que resulta en la inhibición del isocianato deshidrogenasa (ICDH) que conduce a la acumulación de citrato en la mitocondria. El citrato se exporta al citoplasma, donde es eliminado por la ATP-citrato liasa (ACL), una enzima clave para la lipogénesis presente en todos los microorganismos oleaginosos. El acetil-CoA está dirigido a la síntesis *de novo* de ácidos grasos en el complejo de ácido graso sintasa (FAS) [20].

Los productos del complejo FAS, palmitoil-CoA y estearoil-CoA se transportan al retículo endoplásmico donde se usan para producir TGA, o someterse a desaturación dependiente de NADPH o / y una prolongación de dos carbonos antes de ser dirigidos a la síntesis de triacilglicérols (TAG). La síntesis de TAG sigue la ruta de Kennedy para producir ácido lisofosfatídico (LPA), ácido fosfatídico (PA), diacilglicérol (DAG) y finalmente TAG que se almacenan en gotas de lípidos. Los ácidos grasos libres (FFA) pueden liberarse de los TAG por la acción de las lipasas intracelulares (TGL) y activarse aún más por las sintetasas de acil-CoA (FAA1) para producir acil-CoA. En condiciones de inanición, tanto el acil-CoA como el FFA pueden ingresar al peroxisoma donde son degradados por la vía de beta-oxidación. El suministro de NADPH necesario para la síntesis de lípidos en los microorganismos oleaginosos puede ser proporcionado por diferentes fuentes, incluida la isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADPH, la vía oxidativa de pentosefosfato o la enzima málica (EM) que parece ser la principal fuente de NADPH para muchos hongos oleaginosos [20].

Teniendo en cuenta que, en Colombia no se han evaluado colecciones de levaduras para evaluar su potencial oleaginoso, el objetivo de este proyecto fue evaluar la capacidad acumuladora de lípidos en una colección de levaduras previamente aisladas de sistemas acuáticos de la ciudad de Cali.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Reactivación de cepas

Las cepas de levaduras analizadas en este trabajo fueron aisladas a partir de aguas potables y residuales tomadas de diferentes zonas de la ciudad de Cali, Colombia [11] (Figura A1). A partir de las cepas de levaduras aisladas, las cuales se encontraban conservadas con glicerol al 20% (v/v) a -20°C, se tomó 100 µL, se inoculó en 900 µL de medio líquido GYT (Extracto de levadura 0,5% p/v, Triptona 1% p/v y Glucosa 2% p/v) y se incubó a temperatura ambiente durante 48 horas. Transcurrido el tiempo de incubación, se tomó una asada del medio líquido crecido y se sembró por estría en medio GYT y se incubó a temperatura ambiente por 48 horas. Todas las cepas fueron conservadas en agar inclinado GYT con aceite mineral estéril y crioconservadas con medio de cultivo GYT estéril y glicerol 30% v/v.

2.2 Acumulación y extracción de lípidos

De un preinóculo crecido en medio líquido GYT, se tomó 1 mL y se inoculó en 100 mL de medio inductor para la acumulación de lípidos (o MIB) con una proporción Carbono/ Nitrógeno 100:1 (KH₂PO₄ 0,1% p/v, (NH₄)₂SO₄ 0,05% p/v, MgCl₂-6H₂O 0,05% p/v y Glucosa 5% p/v). El cultivo fue crecido a temperatura ambiente durante 72 horas en

agitación constante (150rpm). Finalizado el tiempo de crecimiento, se adicionaron 10 mL de cultivo crecido del medio inductor en tubos cónicos de 50 mL, se centrifugó a 4500 rpm durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante. Se adicionó 1 mL de hexano y 5 mL de metanol y se resuspendió en vortex (Fisher Scientific). Enseguidamente, se expuso la biomasa resuspendida en ultrasonido (50-60 kHz) (Branson) por 10 minutos. Este proceso se repitió hasta que no se observó biomasa celular precipitada. Se adicionaron 5 mL de hexano, se mezcló en vortex y se agitó a temperatura ambiente durante 25 minutos en el shaker (Thomas Scientific). Posteriormente, se centrifugaron a 4500 rpm por 5 minutos para separación de fases. Por último, se recuperó la fase superior (hexano) con ayuda de una pipeta Pasteur y se transfirió a tubos de ensayo de vidrio previamente pesados. Estos tubos se dejaron en el horno de secado a 70°C, que corresponde al punto de ebullición del hexano, durante 24 horas, después, se procedió a pesar y a registrar el peso final. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado técnico.

2.3 Determinación gravimétrica de biomasa

Inicialmente, los tubos cónicos de 15 mL se colocaron durante 10 minutos en el horno y posteriormente 10 minutos en el desecador para evitar la presencia de humedad y se pesaron en balanza analítica (Pioneer - Ohaus, USA). Luego, el cultivo se homogenizó y se distribuyó 10 mL en cada tubo, se centrifugó a 4500 rpm durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante. Seguidamente, los tubos se colocaron en el horno a 70°C por 24 horas. Pasado este tiempo, estos tubos se ubicaron en el desecador por 10 minutos, se procedió a pesar y a registrar el peso final. Con la diferencia de los pesos, se obtuvo como resultado la biomasa seca presente en un cultivo de 10 mL, por lo que, se realizó un factor de conversión para determinar la biomasa seca en g/L. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado técnico.

2.4 Identificación molecular

Se realizó la extracción de ADN genómico, de acuerdo con el protocolo propuesto por [12]. La concentración y calidad del ADN obtenido se verificaron utilizando Nanodrop 2000 (Laboratorio de Genética Molecular Humana, Universidad del Valle). Se amplificó el dominio D1/D2 de la subunidad ribosómica grande (LSU) utilizando PCR, con los cebadores NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') y NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: un ciclo inicial a 95°C durante 5 min, 30 ciclos a 95°C durante 45 s, 56°C durante 30 s, 72°C durante 1 min y un ciclo de extensión final a 72°C por 7 min. Seguidamente, los productos de PCR se verificaron por electroforesis en gel de agarosa al 1,5% p/v a 100 V durante 5 min y 50 V durante 40 min y se tiñeron con GelRed para su visualización bajo luz UV usando el fotodocumentador BioRad Geldoc 2x (Laboratorio de Biología Molecular, Universidad del Valle). Los productos de PCR se purificaron con 1 µL del reactivo ExoSAP-IT y se llevaron al termociclador durante 15 min a 37°C y 15 min a 80°C, luego, fueron enviados a secuenciación por el método de Sanger. Las secuencias obtenidas fueron editadas manualmente y comparadas con las secuencias de cepas tipo publicadas en la base de datos GenBank y Mycobank usando el algoritmo BLAST. Identidades iguales o superiores al 99,51% confirmaron la identificación a nivel taxonómico de especie. Por otra parte, fue construido un árbol filogenético usando el método Neighbor-joining con un Bootstrap de 1000 repeticiones para la confirmación de algunas identificaciones, utilizando el software Mega X.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Preselección de cepas

De una colección de levaduras previamente aisladas de aguas potables y residuales de la ciudad de Cali, se seleccionaron 25 cepas para determinar su posible carácter oleaginoso (Tabla 1). Posteriormente, se realizó un *screening* de acumulación de lípidos usando gravimetría (peso de lípidos totales respecto a su biomasa seca), creciendo las cepas en el medio MIB. Los resultados obtenidos mostraron la presencia de nueve levaduras oleaginosas que presentaron un rendimiento lipídico igual o superior al 20% g/g (Figura 1).

Tabla 1. Levaduras evaluadas y su fuente de aislamiento.

Cepa	Fuente de aislamiento	Tipo de agua
CS16	Canal Sur (CS)	Residual
CS4	Canal Sur (CS)	Residual

CS17A	Canal Sur (CS)	Residual
CS19	Canal Sur (CS)	Residual
CS1B	Canal Sur (CS)	Residual
CS7A	Canal Sur (CS)	Residual
CS7	Canal Sur (CS)	Residual
CS1A	Canal Sur (CS)	Residual
CS21	Canal Sur (CS)	Residual
CS3	Canal Sur (CS)	Residual
M20	Río Meléndez (M)	Potable
M6A	Río Meléndez (M)	Potable
M23B	Río Meléndez (M)	Potable
M14	Río Meléndez (M)	Potable
M7	Río Meléndez (M)	Potable
M6B	Río Meléndez (M)	Potable
P10	PTAR (P)	Residual
P14	PTAR (P)	Residual
P4	PTAR (P)	Residual
P24	PTAR (P)	Residual
P18	PTAR (P)	Residual
P12	PTAR (P)	Residual
PM15	Planta de Tratamiento Puerto Mallarino (PM)	Potable
PM24	Planta de Tratamiento Puerto Mallarino (PM)	Potable
PM14	Planta de Tratamiento Puerto Mallarino (PM)	Potable

En la Tabla 2 se pueden observar los resultados obtenidos del *screening* de la acumulación de lípidos de las 25 cepas de levadura, con estos datos fue posible discriminar las cepas que definitivamente no presentaban carácter oleaginoso, teniendo en cuenta el rendimiento lipídico respecto a su biomasa seca L/X (g/g). De acuerdo con la Figura 1, nueve cepas mostraron capacidad de acumulación superior al 20% (g/g).

Tabla 2. Datos del *screening* de acumulación de lípidos.

Cepa	Biomasa seca (X, g/L)		Peso lípidos (L, g/L)		L/X (g/g)
	Promedio	Desv. Est.	Promedio	Desv. Est.	
CS16	3,4000	0,3606	0,2900	0,0707	0,0853
CS4	2,2000	0,8544	0,2667	0,1172	0,1212
CS17A	2,7000	0,1000	0,2133	0,0643	0,0790
CS19	3,9667	0,4509	0,1933	0,1007	0,0487
CS1B	2,9500	0,4950	0,2287	0,1502	0,0775
CS7A	2,7667	0,2082	0,3467	0,0611	0,1253
CS7	2,2000	0,2828	1,3900	0,1273	0,6318
CS1A	2,5333	0,2309	0,5200	0,5091	0,2053
CS21	1,2733	0,0611	0,3367	0,2797	0,2644
CS3	1,9622	0,0252	0,0933	0,0115	0,0476
M20	2,2667	0,4619	0,1400	0,0917	0,0618
M6A	3,8333	0,4163	0,6467	0,3190	0,1687
M23B	2,5000	0,2646	0,1933	0,0503	0,0773
M14	0,7600	0,1478	0,3000	0,1386	0,3947
M7	2,8333	0,2517	0,8133	0,0306	0,2871
M6B	2,5000	0,1000	0,5067	0,0702	0,2027
P10	1,6250	0,1202	0,2733	0,0451	0,1682
P14	0,9250	0,1061	0,3433	0,1447	0,3712
P4	1,6150	0,1061	0,2300	0,1114	0,1424
P24	1,0167	0,0839	0,1533	0,0252	0,1508
P18	2,2600	0,1973	0,1000	0,0200	0,0442

P12	1,8400	0,0872	0,5100	0,1744	0,2772
PM15	1,4200	0,0643	0,0667	0,0231	0,0469
PM24	2,0356	0,0379	0,0700	0,0200	0,0344
PM14	1,1867	0,2873	0,5033	0,1815	0,4242

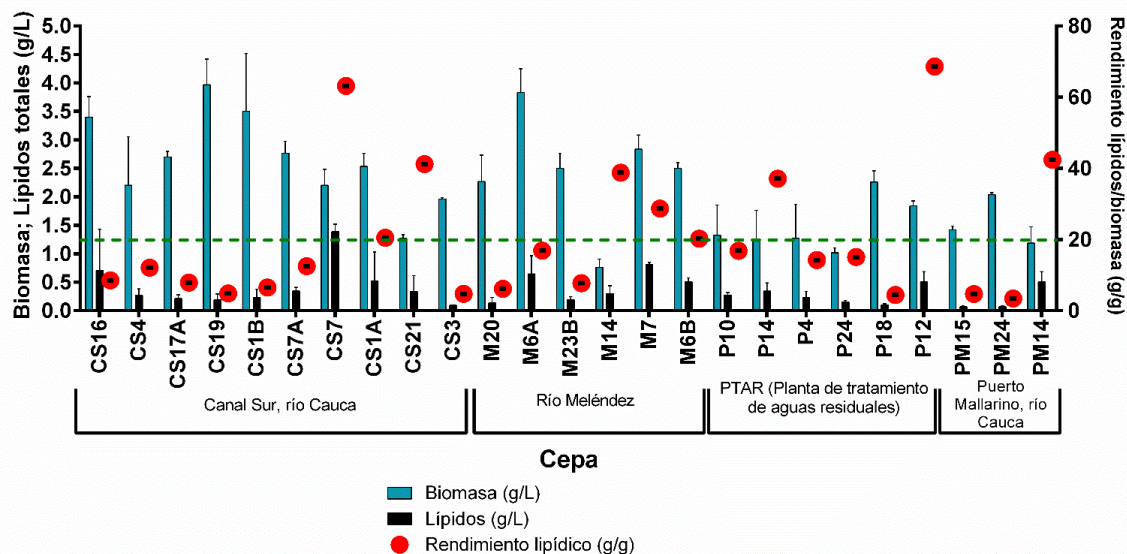


Figura 1. Screening de la acumulación de lípidos en sistemas acuáticos de Cali. Los valores de rendimiento de lípidos iguales o superiores al 20% g/g (línea verde puntillada) se consideraron oleaginosos.

La limitación de nitrógeno es la condición más eficiente para inducir la lipogénesis en levaduras oleaginosas. Durante la fase de crecimiento, el nitrógeno es necesario para la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos, mientras que el flujo de carbono se distribuye entre los procesos energéticos y anabólicos que producen carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos y proteínas. Cuando el nitrógeno se limita, la tasa de crecimiento se ralentiza y la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos tiende a cesar. En especies no oleaginosas, el exceso de carbono permanece sin utilizar o se convierte en polisacáridos de almacenamiento. Por el contrario, las especies oleaginosas canalizan preferentemente el exceso de carbono hacia la lipogénesis y acumulan TAG dentro de los cuerpos lipídicos [15], siendo el rendimiento teórico máximo de producción de lípidos a partir de hexosas o glicerol aproximadamente 30% p/p [13].

3.2 Selección de cepas

Cabe señalar que, pasaron alrededor de seis meses cuando se inició de nuevo con los experimentos (confirmación de las cepas seleccionadas), y se observó un aumento en la biomasa y una gran disminución en la producción de lípidos (Tabla 3). Debido a este resultado inesperado, y con la hipótesis que algún componente del medio de cultivo podría estar interfiriendo en la acumulación de lípidos, se realizaron cuatro experimentos con la cepa M6B, teniendo en cuenta su relación Carbono/Nitrógeno para evaluar en qué concentraciones de los componentes del medio se obtendrían mejores resultados (Tabla 4).

Tabla 3. Datos de la confirmación de las cepas seleccionadas.

Cepa	Biomasa seca (X, g/L)		Lípidos totales (L, g/L)		L/X (g/g)
	Promedio	Desv. Est.	Promedio	Desv. Est.	
CS7	2,4489	0,0773	0,1178	0,0641	0,0481
M14	2,3956	0,0278	0,1333	0,0240	0,0557
M6B	3,4733	0,2815	0,1556	0,1063	0,0448
P14	2,0044	0,5778	0,0778	0,0168	0,0388
P12	2,2156	0,0671	0,1378	0,0509	0,0622

Tabla 4. Composición de medio inductor para la producción de lípidos con diferentes relaciones C/N.

Experimento	Componentes del medio (% p/v)			
	KH ₂ PO ₄	(NH ₄) ₂ SO ₄	MgCl ₂ ·6H ₂ O	Glucosa
1	0,1	0,05	0,05	5
2	0,1	0,03	0,05	5
3	0,7	0,05	0,15	5
4	0,7	0,03	0,15	5

La Tabla 5 muestra los resultados de los experimentos con nuevas combinaciones de medio inductor posterior a 72 horas de incubación. La extracción de lípidos y análisis de datos fueron realizados de la misma forma, mostrando que la cepa M6B, a pesar que tuvo un aumento en su rendimiento lipídico, no alcanzó el 20% para ser considerado oleaginoso.

Tabla 5. Datos de los experimentos con nuevas combinaciones de medio inductor para la cepa M6B.

Experimento	Biomasa seca (X, g/L)		Lípidos totales (L, g/L)		L/X (g/g)
	Promedio	Dev. Est.	Promedio	Dev. Est.	
1	3,3311	0,5735	0,0911	0,0444	0,0274
2	3,6133	0,5468	0,2156	0,0168	0,0597
3	7,0300	0,5798	0,4033	0,0801	0,0574
4	5,0289	0,1836	0,4356	0,0535	0,0866

Teniendo en cuenta la relación Carbono/Nitrógeno del experimento 4, el cual arrojó mejores resultados, se realizó la extracción de lípidos usando la cepa M6B, y se comparó el método hexano-metanol por el método con acetona, donde se pudo observar que hay una gran diferencia entre ambos métodos, pues mientras que la extracción de lípidos totales de la cepa M6B con hexano-metanol obtuvo una concentración de 0,44±0,05 g/L de lípidos y rendimiento lipídico de 8,66% g/g, con acetona se obtuvo una concentración de 1,85±0,26 g/L (cuatro veces mayor) y rendimiento lipídico de 44,94% g/g.

Muchos factores afectan el crecimiento de las levaduras y los rendimientos posteriores de TAG, estos factores incluyen fuentes de carbono y nitrógeno, sus concentraciones, la relación C/N, temperatura, pH, velocidad de aireación, elementos minerales, sales inorgánicas e inhibidores, como se puede observar en la Tabla 3, donde hubo una gran disminución en la producción de lípidos. De acuerdo con los resultados obtenidos por otros documentos, se ha reportado que, entre todas las fuentes de carbono, la glucosa es la mejor en peso de lípidos, contenido de lípidos, rendimiento de lípidos y productividad de lípidos, pues los valores alcanzados han sido significativamente más altos en comparación con otros azúcares. Las diferentes fuentes de nitrógeno tienen diversas influencias en la acumulación total de síntesis de TAG, así como en los perfiles de ácidos grasos de los TAG. Se ha informado ampliamente que las fuentes de nitrógeno inorgánico, por ejemplo, el sulfato de amonio y el cloruro de amonio juegan un buen papel en el crecimiento celular, mientras que no son adecuadas para la producción de lípidos. En contraste, las fuentes de nitrógeno orgánico como el extracto de levadura y la peptona parecen estimular la producción de lípidos y tienen menos efecto sobre el crecimiento de las células de levadura [15]. En otras investigaciones se informó que, la adición de sales inorgánicas como NaCl (1.0 M) durante la fase logarítmica del cultivo de *Dunaliella* resultó en un aumento del 70% de TAG [16].

Es bien sabido que las condiciones ambientales, como la temperatura, han demostrado ser un factor que controla la tasa de crecimiento y la acumulación de lípidos por la levadura oleaginoso, pues una temperatura demasiado alta o demasiado baja puede afectar el crecimiento celular y la acumulación de lípidos. Se podría proponer que el grado de temperatura de 30°C fue el mejor para el crecimiento de levaduras y también para la producción de lípidos. Con respecto a todos los parámetros de rendimiento lipídico, el peso lipídico, el contenido lipídico, el rendimiento lipídico y la productividad lipídica de *Candida* e *Issatchenkia* estaban en sus valores máximos a treinta grados (30°C). Resultados similares informaron que *Candida curvatus* y *Candida bomicola* realizaron el peso lipídico máximo y el contenido lipídico a un grado de temperatura de 28-30°C. Además, también se demostró que la temperatura de crecimiento puede influir en la composición de ácidos grasos presente en el TAG acumulado, así como en el grado de saturación. Parece probable que el grado de alta temperatura tenga un impacto negativo en todos los parámetros de crecimiento y la acumulación de lípidos de la levadura oleaginoso [17]

El menor contenido de ácidos grasos en este estudio podría atribuirse al hecho de que las condiciones de cultivo no están optimizadas. Como se demostró en *L. starkeyi*, tanto la relación C/N inicial como la velocidad de agitación pueden tener un impacto en la acumulación de lípidos y al reducir la velocidad de agitación de 300 rpm a 200 rpm, la acumulación de lípidos aumentó de 28.43% a 54.85%. Además, en *L. starkeyi* la optimización media mientras se utiliza una mezcla de glucosa y xilosa aumentó el contenido de lípidos del 38,8% al 61,5%, lo que indica que se puede lograr una producción óptima de lípidos mediante optimizaciones adicionales. Sin embargo, debe señalarse que la comparación del contenido de triacilglicéridos con otros estudios descritos en la literatura es difícil, ya que dependen en gran medida de las condiciones de cultivo utilizadas y las relaciones C/N [18].

La diversidad de cepas o las condiciones de cultivo pueden alterar la producción de lípidos; para maximizar la producción de lípidos, se debe evitar la síntesis de endopolisacáridos bajo limitación de nitrógeno. Aunque se han realizado progresos en los últimos años, la ingeniería genética de estas levaduras sigue siendo una deficiencia. Algunas cepas de *Y. lipolytica*, al igual que otras especies del género, son naturalmente más propensas a almacenar lípidos de compuestos hidrófobos exógenos que a convertir la glucosa en lípidos. El contenido de lípidos puede alcanzar fácilmente el 30% de DCW (biomasa seca) en el primer caso y generalmente del 6 al 15% de DCW en el último. La ingeniería metabólica y/o la optimización de procesos, así como la detección de deformaciones, se han utilizado con éxito para aumentar el contenido de lípidos por encima del 35% de DCW y, según los informes, hasta el 90%. *Y. lipolytica*. También ha requerido ingeniería genética o condiciones de cultivo específicas para utilizar xilosa, celobiosa o polímeros de celulosa, que son componentes principales de los materiales lignocelulósicos. Dependiendo de la cepa, los procesos biotecnológicos deben ajustarse para evitar la excreción excesiva de ácido cítrico, que compite con la producción de lípidos en presencia de un exceso de carbono, y una fuerte filamentación, que depende de múltiples parámetros (oxígeno disuelto, composición media e inicial concentración de carbono, etc.) y puede alterar el proceso de producción de lípidos y su rendimiento [19].

Con todo lo anterior, existen estrategias actuales utilizadas para optimizar la capacidad de acumulación de lípidos de los microorganismos oleaginosos, los cuales incluyen, la sobreexpresión de genes que codifican enzimas clave implicadas en la síntesis de ácidos grasos y triacilglicerol, como citrato liasa dependiente de ATP, acetil-CoA carboxilasa, enzima málica, proteínas de la grasa, complejo ácido sintasa, deshidrogenasa de 3-fosfato de glicerol y diversas aciltransferasas, y/o la inactivación de genes que codifican enzimas implicadas en el catabolismo lipídico de almacenamiento, tales como lipasas y acil-CoA oxidasas. Además, el bloqueo, incluso parcialmente, de las vías competitivas para la biosíntesis de lípidos (por ejemplo, aquellos involucrados en la acumulación de polisacárido de almacenamiento o excreción de ácido orgánico y polioliol) también puede aumentar la capacidad de acumulación de lípidos en microorganismos oleaginosos. Las metodologías, como la evolución adaptativa de laboratorio, se pueden incluir en los flujos de trabajo existentes para la generación de cepas con una capacidad mejorada de acumulación de lípidos. Así, los esfuerzos deben centrarse en la construcción de cepas con altas tasas de absorción de carbono y una coordinación reprogramada de las partes individuales de la maquinaria oleaginosa que maximiza el flujo de carbono hacia la lipogénesis [20].

3.3 Identificación molecular

Después de realizar la extracción de ADN genómico de las cinco cepas preseleccionadas, se procedió a analizar la calidad de dichas extracciones mediante cuantificación por Nanodrop 2000. Seguidamente, las muestras de ADN fueron estandarizadas a 1ng/μL. Posteriormente, se llevó a cabo la visualización de productos de PCR (Figura 2). La reacción en cadena de la polimerasa dirigida a las regiones conservadas D1/D2 del ADNr 26S LSU, realizado en los aislados de levadura productoras de lípidos tuvo éxito en la producción de los amplicones de aproximadamente 600 pb de tamaño en todas las cepas seleccionadas. Las secuencias obtenidas por el método Sanger fueron comparadas con las secuencias de cepas tipo depositadas en las bases de datos Genbank (bases de datos rRNA / ITS, 28S secuencias de ARN ribosómico (LSU) del tipo de hongo y material de referencia) y Mycobank, obteniendo identidades superiores a 99.5% (Tabla 6). Sin embargo, la cepa M6B no fue posible identificar, debido a un error técnico en el momento de rotular los tubos Eppendorf.

Tabla 6. Identificación molecular de las cinco cepas seleccionadas.

Cepa	Identificación	% Identidad
CS7	<i>Candida tropicalis</i>	99.55
P14	<i>Candida aaseri</i>	100
P12	<i>Pichia kudriavzevii</i>	99.74

M14	<i>Pichia kudriavzevii</i>	99.82
M6B	Sin identificar	-

Al comparar las secuencias de la cepa P14, se observó que presentó similitud con dos especies, *Candida aaseri* con un 100% de identidad y *C. pseudoaaseri* con un 99% de identidad, para tener un resultado más verídico sobre la identificación de esta levadura, se procedió a realizar un árbol filogenético, en el que la historia evolutiva se infirió usando el método Neighbor-joining, en total fueron analizadas 52 secuencias de cepas tipo y 522 posiciones (Figura A2), arrojando como resultado que la levadura identificada es *Candida aaseri*.

Cabe resaltar que, en un estudio anterior [14] también se identificaron a *Candida tropicalis* y *Pichia kudriavzevii*, como levaduras oleaginosas prometedoras como productores viables de biodiesel, aisladas de muestras de jugo de caña de azúcar, frutas podridas y encurtidos de un mercado local en la ciudad de Guiza, Egipto, así como muestras de abono orgánico. *Pichia kudriavzevii* obtuvo un rendimiento lipídico de 23,48% g/g, mientras que *Candida tropicalis* un 22,18% g/g, valores por debajo de los encontrados en esta investigación (Tabla 2).

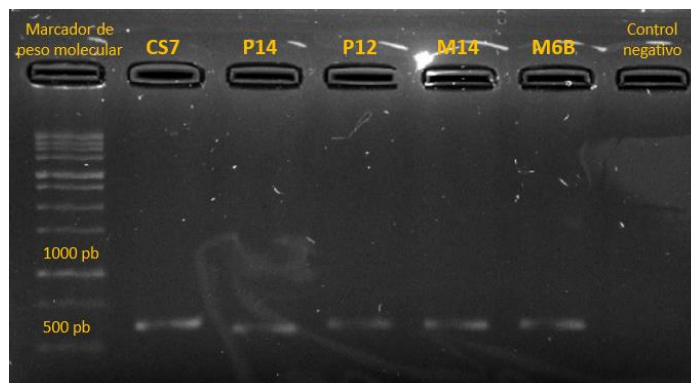


Figura 2. Visualización de productos de PCR por electroforesis en gel de agarosa al 1,5% p/v.

4. CONCLUSIONES

Con el *screening* de la acumulación de lípidos, se preseleccionaron nueve posibles levaduras oleaginosas que presentaron un rendimiento lipídico igual o superior al 20% g/g.

Se seleccionaron cinco cepas de levaduras, de las cuales cuatro de ellas se identificaron como, CS7: *Candida tropicalis*, P14: *Candida aaseri*, P12: *Pichia kudriavzevii* y M14: *Pichia kudriavzevii*, como cepas prometedoras para una futura producción de biodiesel.

La cepa *Candida tropicalis* CS7 aislada de agua residual, obtuvo el mejor rendimiento lipídico, con respecto a las cepas aisladas de aguas potables, siendo las aguas residuales la mejor fuente para la acumulación de lípidos.

Al modificar la relación Carbono/Nitrógeno del medio inductor para la acumulación de lípidos, se observó un aumento en la biomasa y de lípidos totales hasta cuatro veces mayor.

5. RECOMENDACIONES

Se recomienda evaluar la acumulación de lípidos de las cinco levaduras seleccionadas, prometedoras para una futura producción de biodiesel, usando como solvente la acetona.

Realizar ensayos futuros con las demás cepas preseleccionadas, evaluando la acumulación de lípidos con residuos agroindustriales como POME, glicerol crudo, entre otros.

6. AGRADECIMIENTOS

Le agradezco a Dios por guiarme, ser el apoyo y fortaleza en toda mi vida. A mis queridos padres Edward y Sonia por brindarme su apoyo incondicional en todo momento, por los valores que me han inculcado y me han permitido llegar muy lejos. A mi hermana por llenar mi vida de alegría y amor. Gracias a mi director Mauricio Ramírez y a mi codirector Esteban Osorio por permitirme tener el gusto de realizar mi trabajo de grado con uno de sus mejores temas, por ser un apoyo durante toda esta etapa, por darme la oportunidad de crecer profesionalmente y aprender cada día algo nuevo. Este proyecto fue financiado por la Universidad Santiago de Cali (código 934-621118-8, 934-621119-E22).

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] R. Poontawee, W. Yongmanitchai y S. Limtong, «Efficient oleaginous yeasts for lipid production from lignocellulosic sugars and effects of lignocellulose degradation compounds on growth and lipid production,» *Process Biochemistry* 53(2017), pp. 44-60, 2017.
- [2] W. H. Leong, J. W. Lim, M. K. Lam, Y. Uemura y Y. C. Ho, «Third generation biofuels: A nutritional perspective in enhancing microbial lipid production,» *Renewable and sustainable energy reviews*, 91, pp. 950-961, 2018.
- [3] S. Bellou, I. E. Triantaphyllidou, D. Aggeli, A. M. Elazzazy, M. N. Baeshen y G. Aggelis, «Microbial oils as food additives: recent approaches for improving microbial oil production and its polyunsaturated fatty acid content,» *Current opinion in Biotechnology*, 37, pp. 24-35, 2016.
- [4] S. Papanikolaou y G. Aggelis, «Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production,» *European Journal of lipid science and technology*, pp. 1031-1051, 2011.
- [5] J. S. Poli, M. A. da Silva, E. P. Siqueira, V. M. Pasa, C. A. Rosa y P. Valente, «Microbial lipid produced by *Yarrowia lipolytica* QU21 using industrial waste: a potential feedstock for biodiesel production,» *Bioresource technology*, 161, pp. 320-326, 2014.
- [6] M. Rossi, A. Amaretti, S. Raimondi y A. Leonardi, «Getting lipids for biodiesel production from oleaginous fungi,» *Biodiesel-Feedstocks and Processing Technologies*, pp. 71-74, 2011.
- [7] J. Zhang, X. Fang, X. L. Zhu, Y. Li, H. P. Xu, B. F. Zhao y X. D. Zhang, «Microbial lipid production by the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* O3 grown in fed-batch culture,» *Biomass and Bioenergy*, 35(5), pp. 1906-1911, 2011.
- [8] P. J. Slininger, B. S. Dien, C. P. Kurtzman, B. R. Moser, E. L. Bakota, S. R. Thompson y L. D. Sousa, «Comparative lipid production by oleaginous yeasts in hydrolyzates of lignocellulosic biomass and process strategy for high titers,» *Biotechnology and bioengineering*, 113(8), pp. 1676-1690, 2016.
- [9] I. R. Sitepu, L. A. Garay, R. Sestric, D. Levin, D. E. Block, J. B. German y K. L. Boundy-Mills, «Oleaginous yeasts for biodiesel: current and future trends in biology and production,» *Biotechnology advances*, 32(7), pp. 1336-1360, 2014.
- [10] J. L. Adrio, «Oleaginous Yeasts: Promising Platforms for the Production of Oleochemicals and Biofuels,» *Biotechnology and Bioengineering*, pp. 1915-1920, 2017.
- [11] L. S. Osorio-Vanegas, «Susceptibilidad a los antimicóticos de levaduras aisladas de los sistemas de aguas de la ciudad de Santiago de Cali,» *Trabajo de grado, programa de Microbiología, Universidad Santiago de Cali*, 2019.

- [12] M. Ramírez-Castrillón, S. D. Mendes, M. Inostroza-Ponta y P. Valente, «(GTG) 5 MSP-PCR fingerprinting as a technique for discrimination of wine associated yeasts?,» *PLoS one*, 9(8), 2014.
- [13] C. Ratledge y J. P. Wynn, «The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms,» *Advances in applied microbiology*, 51, pp. 1-52, 2002.
- [14] D. M. Mohammed, E. A. Hassan, F. H. Abd El, H. K. Zaher y E. M. Ramadan, «Evaluation of lipid producing yeast for biodiesel production,» *Egypt. J. Microbiol*, 49, 2014.
- [15] I. Fakankun, M. Mirzaei y D. B. Levin, «Impact of Culture Conditions on Neutral Lipid Production by Oleaginous Yeast,» *In Microbial Lipid Production*, pp. 311-325, 2019.
- [16] S. J. Kumar, A. Avanthi, A. D. Chintagunta, A. Gupta y R. Banerjee, «Oleaginous Lipid: A Drive to Synthesize and Utilize as Biodiesel,» *In Practices and Perspectives in Sustainable Bioenergy*, pp. 105-129, 2020.
- [17] S. Thomas, D. R. Sanya, F. Fouchard, H. V. Nguyen, G. Kunze, C. Neuvéglise y A. M. Crutz-Le Coq, «*Blastobotrys adenivorans* and *B. raffinosifermentans*, two sibling yeast species which accumulate lipids at elevated temperatures and from diverse sugars,» *Biotechnology for Biofuels*, 12(1), p. 154, 2019.
- [18] D. M. Mohammed, F. H. El Zaher, E. A. Hassan, H. A. El Maksoud y E. M. Ramadan, «Factors Affecting Microbial Oil Accumulation by Oleaginous Yeast,» *Annual Research & Review in Biology*, pp. 1-12, 2018.
- [19] D. Gálvez-López, B. Chávez-Meléndez, A. Vázquez-Ovando y R. Rosas-Quijano, «The metabolism and genetic regulation of lipids in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*,» *Brazilian Journal of Microbiology*, pp. 23-31, 2018.
- [20] M. Dourou, D. Aggeli, S. Papanikolaou y G. Aggelis, «Critical steps in carbon metabolism affecting lipid accumulation and their regulation in oleaginous microorganisms,» *Applied microbiology and biotechnology*, 102(6), pp. 2509-2523, 2018.
- [21] M. Vivas Chavez, L. D. Caicedo y J. E. Castillo, «Occurrence of β -Lactamase-Producing Gram-Negative Bacterial Isolates in Water Sources in Cali City, Colombia,» *International Journal of Microbiology*, pp. 1-8, 2019.

ANEXO

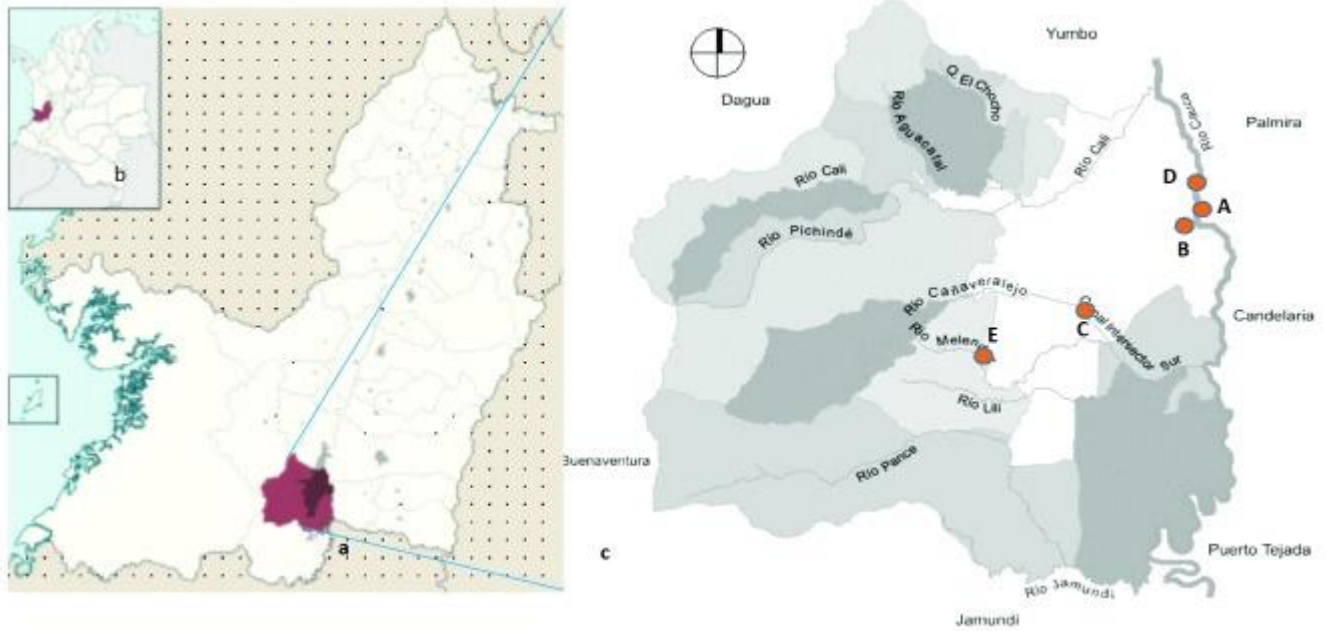


Figura A1. Ubicación geográfica del sitio de muestreo. (a) Departamento del Valle del Cauca, Colombia; (b) Ciudad de Cali. (c) Los puntos rojos muestran los sitios donde se recolectaron muestras de aguas superficiales: la planta de tratamiento de aguas residuales “Cañaveralejo PTAR-C” (A), el canal de aguas pluviales (B) cerca de la planta de tratamiento de aguas residuales, Intersector Canal (CVC) Sur (C), planta de tratamiento de agua “Puerto Mallarino” (D) y el río Meléndez (E) [21].



Figura A2. Árbol filogenético del género *Candida* basado en las secuencias del dominio D1/D2 del gen LSU rRNA, donde se resalta la clasificación de la cepa P14. El método utilizado fue Neighbor-Joining con un bootstrap de 1000 repeticiones a partir de 52 secuencias.