

ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD LIPOLÍTICA Y DE ESTERASAS, DE UNA COLECCIÓN DE CEPAS DE *YARROWIA LIPOLYTICA*

Sara Angélica Arreguín Magdaleno (1), Adán Topiltzin Morales Vargas (2)

1 [Ingeniería Bioquímica, Instituto Tecnológico Superior de Irapuato] | Dirección de correo electrónico: [sar21122@hotmail.com]

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

Resumen

Yarrowia lipolytica usualmente habita en ambientes ricos en sustratos hidrofóbicos. Esto es posible debido principalmente a que posee varias familias de genes que le permiten degradar de manera eficiente este tipo de sustratos. En el presente estudio se llevó a cabo un análisis cualitativo de la producción de lipasas y esterasas, de una colección de cepas de *Y. lipolytica* aisladas a partir de productos lácteos y cárnicos no procesados. Se realizó un análisis primario de la actividad lipolítica en medio YNB (Yeast Nitrogen Base) adicionado con Tween 80 y usando rojo de metilo como indicador con el cual se pudo observar un halo de color claro en aquellas cepas productoras de lipasas; posteriormente se realizaron ensayos en medios con aceite de oliva y tributirina, para el análisis de lipasas y esterasas respectivamente, utilizando un indicador de rojo de fenol, lo cual permitió identificar a las cepas productoras de lipasas y/o esterasas. Adicionalmente, se analizó la producción de lipasas en medio líquido monitoreando la actividad enzimática durante siete días, con aquellas cepas que mostraron buenos resultados en medio sólido. Para la determinación de actividad lipolítica, se realizaron ensayos de cromatografía de capa fina (TLC).

Abstract

Yarrowia lipolytica usually inhabits environments rich in hydrophobic substrates. This is possible mainly because it has several families of genes that allow efficiently assimilated these substrates. In this study, it was carried out an analysis of lipase and esterase activity of a collection strains of *Yarrowia lipolytica* isolated from dairy and meat products not processed. A primary analysis of lipolytic activity was performed in YNB (Yeast Nitrogen Base) medium added with Tween 80 and methyl red, as indicator with which a light colored halo could be observed in lipase producer strains; then assays were done using olive oil and tributyrin as substrate for analysis of lipases and esterases respectively, using a phenol red indicator, which allowed to identify lipase and/or esterase producer strains when a turn from red to yellow in medium color. Further, a production lipases in liquid medium assay was developed monitoring enzymatic activity during seven days, employing those strains that showed positive results in solid medium. For determination of lipolytic activity, thin layer chromatography (TLC) assays were performed. Isolated strains showed lipases and esterases activity which show us the biotechnological potential for production of this enzymes.

Palabras Clave

Biotecnología; lipasas; TLC.

INTRODUCCIÓN

Yarrowia lipolytica es un hongo ascomiceto dimorfo, el cual presenta inusuales características fisiológicas, metabólicas y genómicas que le diferencian de otras levaduras; por estos rasgos se le ha considerado un sistema modelo para un gran número de investigaciones básicas y aplicadas [1]. Uno de los más importantes productos secretados por *Y. lipolytica* son las lipasas, las cuales han atraído el interés de científicos e investigadores industriales porque pueden ser explotadas para diversas aplicaciones en procesos biotecnológicos en la industria [2].

Lipasas

Las lipasas (triacilglicerol éster hidrolasas, EC 3.1.1.3) y esterases (carboxilo-éster hidrolasas, EC 3.1.1.1), conocidas colectivamente como “enzimas lipolíticas” se caracterizan por su habilidad para hidrolizar cadenas de lípidos largas y cortas esterificadas al glicerol [3]. La especificidad de estas enzimas se relaciona directamente con el microorganismo que las produce, por lo cual existen lipasas no específicas; es decir, aquéllas que pueden realizar la hidrólisis del triglicérido en cualquiera de sus posiciones, obteniendo productos intermediarios como diglicéridos y monoglicéridos [4].

Se pueden clasificar la especificidad de las lipasas en dos tipos: posicional y de ácido graso. Las de tipo posicional hidrolizan preferentemente determinadas posiciones del triglicérido, normalmente las posiciones 1 y 3, por ser las más accesibles; a este tipo pertenecen las producidas por *Yarrowia lipolytica*. Las de tipo de ácido graso catalizan la hidrólisis de un determinado tipo de ácido graso particular de un triglicérido [4].

Además de las funciones biológicas que tiene en bacterias, hongos, plantas y animales, las lipasas han recibido atención debido a su función como biocatalizadores en numerosos procesos industriales incluyendo áreas como aceites y ácidos grasos, detergentes, panificación, elaboración de queso (mejorando la calidad de cuajadas, generación de aromas y sabores), limpieza de superficies así como procesamiento de papel (eliminando triglicéridos de la pulpa de celulosa o

eliminando tintas a base de lípidos en papel reciclado) y cuero [5].

Factores que afectan su producción

Diferentes factores tienen influencia en la biosíntesis de las lipasas, entre los más importantes se encuentran: La fuente de carbono del medio de cultivo, fuente de nitrógeno, activadores, estimuladores como vitaminas y colesterol, inhibidores como biotina y etanol; la temperatura, pH [6].

La producción de lipasas por *Y. lipolytica* fue reportada por primera vez en 1948 por Peters y Nelson [7]. Diversos estudios demuestran que *Y. lipolytica* posee heterogeneidad en cuanto a las capacidades para producir diferentes enzimas, por lo tanto, el conocer si una determinada cepa de *Y. lipolytica* es productora de lipasas y esterases, podrá ayudar en la elección de la mejor cepa para un proceso o análisis específico posterior.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos

Las cepas de *Y. lipolytica* analizadas en esta investigación fueron aisladas en previos trabajos, de diferentes muestras de cárnicos, productos lácteos y suelo contaminado por hidrocarburos, en las instalaciones del Instituto Tecnológico Superior de Irapuato (ITESI).

Precultivo de las células de levadura

Fue llevado a cabo en tubos Falcón de 50 ml con 5 ml de medio líquido YPD (2% glucosa, 1% extracto de levadura y 2% peptona) a 28°C por 48 horas a 120 rpm. Luego se transfirió 1 ml del medio a tubos Eppendorf de 1.5 ml, se centrifugaron a 6000 rpm por 5min y se realizaron 2 lavados con agua destilada. La densidad óptica de cada pre-inoculo fue llevada a 0.1.

Análisis primario de actividad lipolítica y de esterases

Se inocularon 10 μ l por triplicado de cada cepa en medio sólido conteniendo agar bacteriológicos, extracto de levadura, peptona, rojo de metilo al 0.01% como indicador de actividad lipolítica, y 2% de Tween 80 como sustrato [8].

Análisis específico de actividad lipolítica y de esterases

Se prepararon placas de sustrato cromogénico incorporando rojo de fenol al 0.01%, con 1% de sustrato lipídico, tributirina para el análisis de esterases, y aceite de oliva para el análisis de lipasas y esterases [9]. El pH del medio fue ajustado a 7.3-7.4 para conseguir una coloración rojiza en el medio. Se inocularon 20 μ l de cada cepa, incubando por 48 horas a temperatura ambiente.

Producción de lipasas en medio líquido

El medio líquido usado se componía de peptona (2g 100^{-1} ml), extracto de levadura (0.5 g 100^{-1} ml), NaCl (0.5 100^{-1} ml), Na_2CO_3 (0.025 g 100^{-1} ml) y aceite de oliva (1 g 100^{-1} ml). Se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer de 250 ml, con 100 ml de medio inoculados para D.O de 0.05. Se incubaron por 7 días a 120 rpm y temperatura ambiente, tomando muestras cada 24 horas, las cuales fueron centrifugadas a 10000rpm por 10 min, con la finalidad de eliminar las células presentes en el cultivo [9].

Ensayo de determinación posicional específica de lipasas por hidrólisis de lípidos

0.5 ml del extracto enzimático crudo, obtenido del sobrenadante de las muestras cada 24 horas, fue agregado a tubos Eppendorf con una mezcla de 0.5 ml aceite de oliva, Tris-HCl 0.1M y CaCl_2 1mM, se emulsificó la mezcla y se dejó en incubación por 3 horas a 120rpm y 28°C [9]. Después de la hidrólisis, se le adicionó 0.5 ml de hexano a los tubos Eppendorf para separar lípidos presentes, se llevó a vortex para emulsificar y a continuación se dejó en reposo por 5 minutos. En una placa de cromatografía de capa fina (TLC), se colocó una gota del sobrenadante obtenido con ayuda del hexano, utilizando el sistema de solventes hexano:

dietil éter: ácido acético (80:20:1, v/v/v), se separaron los lípidos, presentes en la muestra, las bandas separadas fueron visualizadas utilizando yodo. Las bandas se identificaron usando como referencia los valores estándar de Rf para lípidos [10].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se analizaron un total de 86 cepas de *Y. lipolytica*, 46 aisladas de productos lácteos y cárnicos, 43 de suelo contaminado por hidrocarburos proveniente del Río Lerma, Gto, y la cepa W29 (*Y. lipolytica*).

Análisis primario de la actividad lipolítica

Los Tween o polisorbatos (ésteres de ácidos grasos de sorbitán de polioxietileno) han sido los sustratos más usados en medios sólidos, para la detección de capacidades lipolíticas en microorganismos [3]. Usando esta técnica, un análisis primario pudo ser llevado a cabo identificando la formación de un halo de color claro alrededor de aquellas cepas con un resultado positivo, como se observa en la Figura 1.

Los resultados para los ensayos usando Tween 80 como sustrato fueron registrados 48 horas después de la inoculación, permitiendo que en aquellas cepas que presentaban resultados positivos pero no muy claros, se intensificaran los halos de color claro.

Análisis específico de actividad lipolítica y de esterases

En esta etapa, se utilizaron medios adicionados con aceite de oliva y tributirina, para el análisis específico de producción de lipasas y esterases, respectivamente. Las cepas que fueron productoras de esterases dieron un resultado positivo solamente en las placas con tributirina como sustrato, y aquellas productoras de lipasas dieron positivo en ambos sustratos.

Los resultados positivos se consideraban cuando un halo de color amarillo se presentaba alrededor del inóculo a las 48 horas de incubación. El fundamento de esta técnica es que los ácidos grasos liberados en la hidrólisis de los lípidos por aquellos microorganismos con capacidades

lipolíticas, ocasionan un decremento en el pH del medio, lo cual provoca un viraje en el color del medio yendo de rojo (pH 7.3-7.4) a amarillo (pH 7.0-7.1) al utilizar el indicador rojo de fenol, indicando una formación de lipasas (Figura 2) [9].

Al llevar el pH del medio al punto final para el indicador de rojo de fenol, se pudo observar incluso una baja producción de lipasas y/o esterases, pues basta con una pequeña cantidad de estas enzimas para provocar el viraje de color. En otras investigaciones se han utilizado distintos indicadores, como Rodamina B, pero posee una menor sensibilidad y requiere de un tiempo incubación prolongado para detectar la fluorescencia que indique un positivo para actividad lipolítica [3].

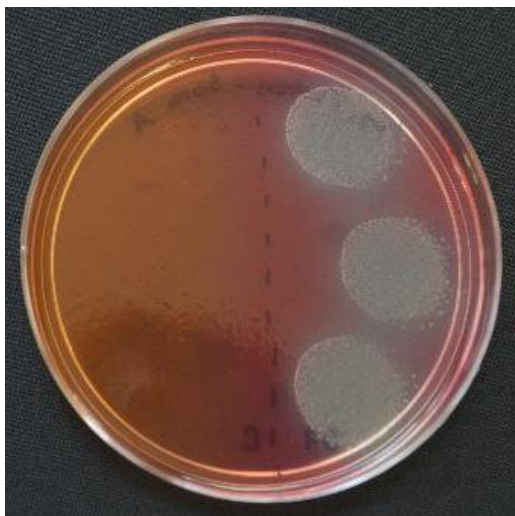


Imagen 1. Halo de hidrólisis de lípidos correspondiente a la cepa 37 (derecha) en medio con Tween 80 e indicador de rojo de metilo. Además, se muestra un control negativo (izquierda).

Producción de lipasas en medio líquido

Se seleccionaron siete cepas para llevar a cabo este ensayo, tomando dos con resultado negativo, dos con resultado positivo medio y dos con positivo alto. Además, se utilizó la cepa W29 como control positivo.

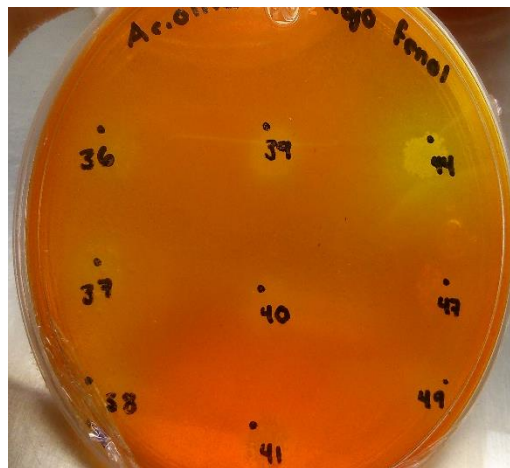


Imagen 2. Detección de lipasas en placas con rojo de fenol.

Determinación posicional específica de lipasas por hidrólisis de lípidos

Al analizar por TLC los productos de la hidrólisis de lípidos inducida por aceite de oliva, se identificaron triglicéridos, 1,3 y 1,2 diglicéridos, monoglicéridos y ácidos grasos libres [10]. La banda superior en el TLC del día 1 (Imagen 3) corresponde a los triglicéridos, en el TLC del análisis realizado el día 7 ya no se observa esta banda (Imagen 4).

Los resultados obtenidos al día 7 de la producción de lipasas en medio líquido comprobaron un incremento en la cantidad de enzimas lipolíticas en el medio, pues al desaparecer la banda de los triglicéridos se puede suponer que fueron hidrolizados por completo, esto ocurrió incluso para aquellas cepas que se registraron con resultado negativo en los análisis de la actividad lipolítica y de esterases. Lo anterior podría ser debido a que las técnicas utilizadas son cualitativas o tal vez las condiciones de crecimiento no fueron las adecuadas para dichas cepas.

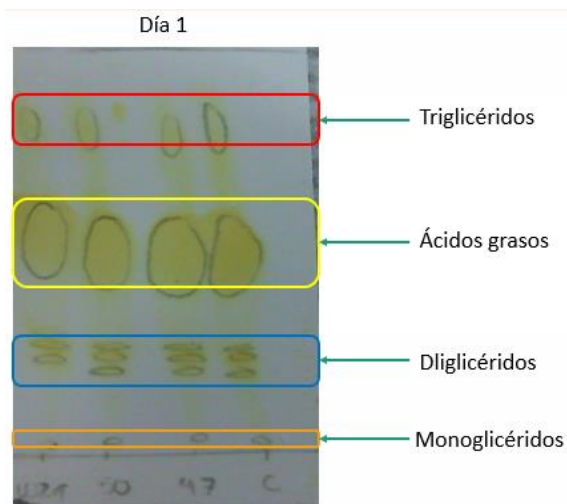


Imagen 3. TLC correspondiente al día 1. Cepas W29, 50 y 47.

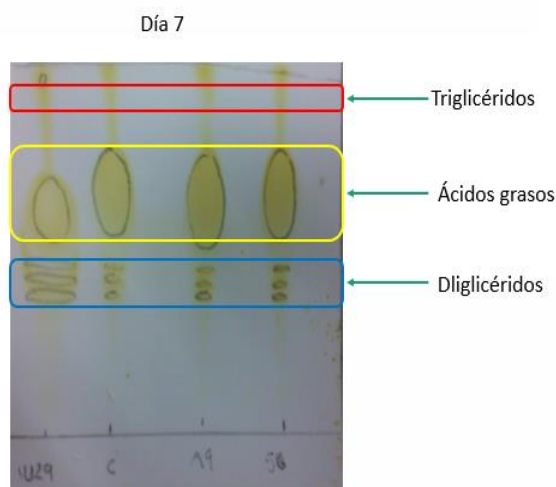


Imagen 4. TLC correspondiente al día 7. Cepas W29, A9 y 58

CONCLUSIONES

Se analizaron las capacidades lipolíticas de un total de 86 cepas de *Y. lipolytica*, de las cuales se identificaron 13 cepas con altas capacidades de hidrólisis de lípidos, 8 de las aisladas de productos lácteos y cárnicos, y 5 de suelo contaminado por hidrocarburos.

Estos resultados comprueban la existencia de heterogeneidad con respecto a la capacidad de llevar a cabo la hidrólisis de cepas de *Y. lipolytica*, Además, pueden ser usados como base para la

elección de una cepa para un proceso o análisis específico posterior, lo que permite elegirla según las necesidades.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue posible gracias al apoyo, colaboración y financiamiento de los investigadores que integran el Laboratorio de Diversidad e Interacciones Microbianas (LDIM) del ITESI. Este proyecto fue financiado por el programa de fortalecimiento de cuerpo académicos 2014, PRODEP.

REFERENCIAS

1. Smitha Zinjarde, M.A., Pallavi Mohite, Ameeta Ravi Kumar, *Yarrowia lipolytica* and pollutants: Interactions and applications. *Biotechnology Advances*, 2014: p. 14.
2. M.A.Z. Coelho, P.F.F.A., I. Belo, *Yarrowia lipolytica*: an industrial workhorse. *Technology and Education Topics in Applied Microbial Biotechnology*, 2011: p. 15.
3. Rajni Singh, N.G., Vineet Kumar Goswami, Rani Gupta, *A simple activity staining protocol for lipases and esterases*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006. **70**: p. 4.
4. Liziano, O., *Caracterización bioquímica de la actividad lipolítica de Pseudoalteromonas Atlántica aislada de la Bahía de Paracas.*, in *Farmacia y Bioquímica* 2012, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. p. 76.
5. Reetz, M.T., *Lipases as practical biocatalysts*. *Current opinion in chemical biology*, 2002. **6**(2): p. 145-150.
6. Hadeball, W., *Production of lipase by Yarrowia lipolytica*. *Acta Biotechnology*, 1991. **11**: p. 9.
7. Harzevili, F.D., *Biotechnological Applications of the Yeast Yarrowia lipolytica*. 2014: Springer International Publishing.
8. Mohd Samad, N.R., Abu Bakar, *A plate assay for primary screening of lipase activity*. *Journal of Microbiological Methods*, 1988. **9**: p. 5.
9. Akhila Rajan, D.R.S.K., A. Jayakumaran Nair, *Isolation of a Novel Alkaline Lipase Producing Fungus Aspergillus fumigatus MTCC 9657 from Aged and Crude Rice Bran Oil and Quantification by HPTLC*. *International Journal of Biological Chemistry*, 2011. **5**(2): p. 10.
10. Perkins, E.G., *Analyses of Fats, Oils and Derivatives*. 1993: AOCS Press.