



Facultad de Ciencias Naturales y Exactas
Departamento de Biología
Centro de Estudios de Biotecnología Industrial

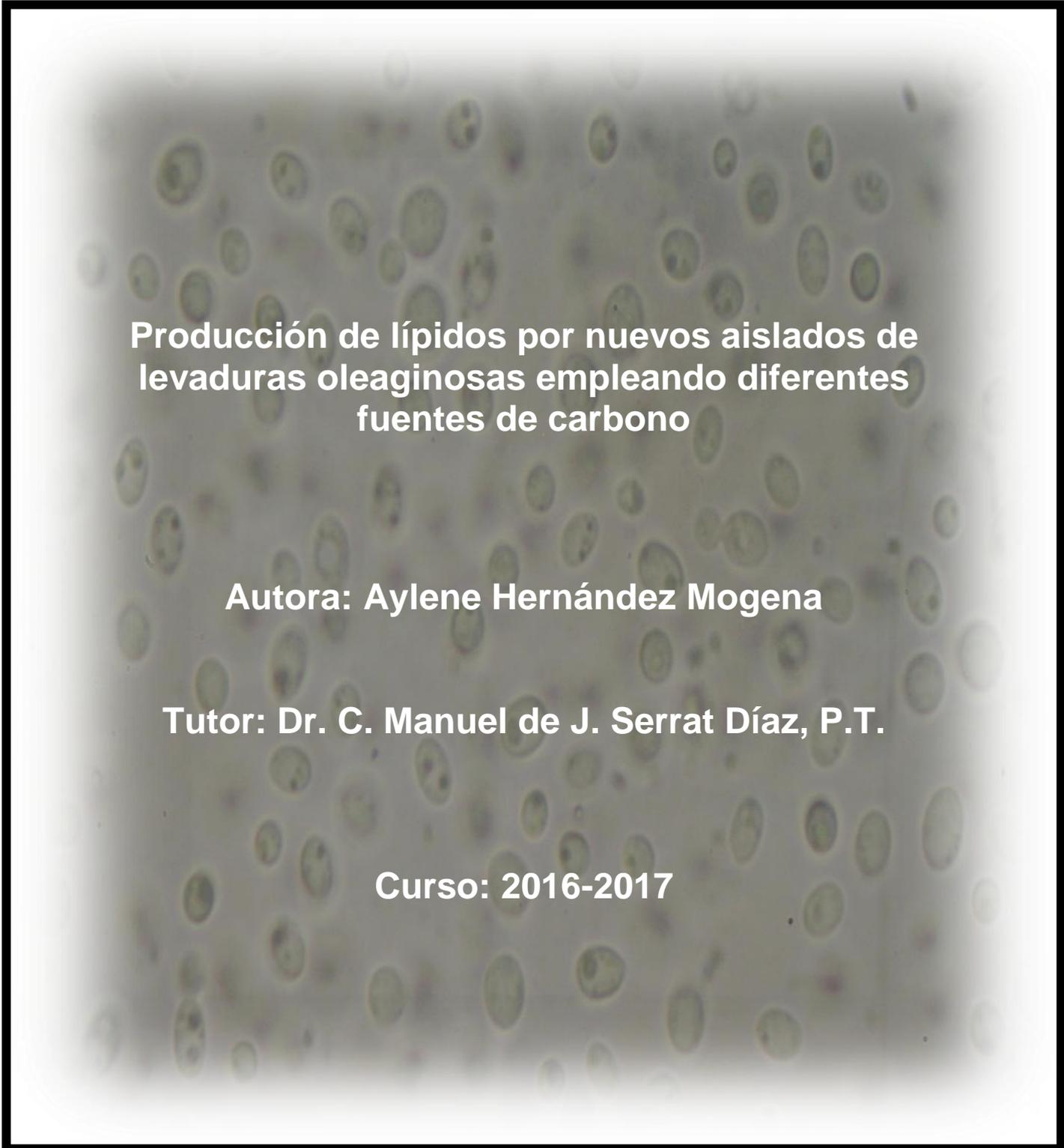
Trabajo de Diploma en opción al título
de
Licenciada en Ciencias Biológicas

Título: Producción de lípidos por nuevos
aislados de levaduras oleaginosas
empleando diferentes fuentes de carbono

Autora: Aylene Hernández Mogená

Tutor: Dr. C. Manuel de J. Serrat Díaz, P. T.

Curso: 2016-2017



**Producción de lípidos por nuevos aislados de
levaduras oleaginosas empleando diferentes
fuentes de carbono**

Autora: Aylene Hernández Mogena

Tutor: Dr. C. Manuel de J. Serrat Díaz, P.T.

Curso: 2016-2017



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y
EXACTAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
CENTRO DE ESTUDIOS DE BIOTECNOLOGÍA INDUSTRIAL



Aval

Dr. C. Manuel de Jesús Serrat Díaz, P. T.

CERTIFICA

Que la presente Tesis titulada **“Producción de lípidos por nuevos aislados de levaduras oleaginosas empleando diferentes fuentes de carbono”**, ha sido realizada en el Centro de Estudios de Biotecnología Industrial de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad de Oriente por **Aylene Hernández Mogena** bajo su dirección, y

AUTORIZA

Su presentación al ejercicio final de la carrera con el fin de optar al título de **Licenciada en Ciencias Biológicas**

Santiago de Cuba, 10 de junio de 2017

Fdo: Dr. Manuel de Jesús Serrat Díaz, P. T.

“[...] No se concibe en el mundo de hoy, cualquiera que sea el sistema social, un progreso sin la ciencia, un avance sin la ciencia”.

Fidel Castro Ruz

A mi abuelita

A mi mami

Agradecimientos

A Dios, por bendecirme siempre y guiarme por el camino del triunfo

A mi tutor Dr. C. Manuel Serrat, por la confianza que depositó en mí para la realización de este proyecto, por su apoyo brindado, sus amplios perfiles de conocimiento, y sobre todo por las largas horas de trabajo que enfrentamos en el laboratorio a pesar de las adversidades

A mi mamá y mi abuelita por su apoyo en todo momento, su confianza, dedicación, amor y sobre todo los sabios consejos y experiencias que siempre tienen para compartir conmigo

A mi hermanita Anita, que es mi razón de ser, y por siempre tener guardada una sonrisa para mí

A mis papás Lachy y Tito, mi tío Javier, mi tía Betty y al resto de mi familia que de una forma u otra contribuyeron en mi desempeño estudiantil para el logro exitoso de este Trabajo de Diploma

A mi Rafelito, por apoyarme, mimarme y quererme tanto

A mi club de amigos, Las Hernández: Dari, Indi, Mari, por los excelentes momentos vividos y por las experiencias de los malos, y por siempre estar a mi lado, y mis amigas Wendita, Amairanis, Enays y mis amigos Keiler y Luis

A todo el personal del CEBI, por su grata acogida en el centro y su buen trato, en especial a la profe Norita, a mi tía Miladis, a Yane, Leo, la profe Irasema, Diana, Isabel, Migdalia, Janet, los profes Morris y Gabriel

A todos los profesores del Departamento de Biología, por su empeño y dedicación al compartir sus conocimientos y que hoy, este trabajo es fruto de esa enseñanza, en especial a las profesoras Mireyita, Ania, Andrea, Yaixa, Onaylis, Ianna y los profes Daniel, Mario, Joaquín y Bernardo

A todos mis compañeros y compañeras de aula por haber formado parte de esta familia por 5 años, y haberme dado la oportunidad de conocerlos, a pesar de las diferencias, en especial a Alinita, Camila, Liuba, Wir, Leydis y Martha

A Katy, Yaque, Daylén y Fide, que a pesar de la distancia siempre estuvieron ahí para mis antojos

A las trabajadoras y trabajadores de la biblioteca Francisco Martínez Anaya, por soportarme durante estos 22 años, en especial a mi “abuela” Ana Ibis

Y a todas aquellas personas que directa o indirectamente hicieron alegre mi tránsito por este difícil pero provechoso camino

Muchas gracias!!!!

RESUMEN

Microorganismos oleaginosos como las levaduras utilizan un amplio abanico de materias primas como fuente de carbono durante su crecimiento, llegando a aumentar los niveles de lípidos superiores al 40 % de su masa seca, en condiciones nutricionales limitantes, considerándose como buenos candidatos para la producción de biodiesel. En el presente trabajo se evaluó el bioproceso de obtención de triacilglicéridos en levaduras oleaginosas aisladas de queso, empleando diferentes fuentes de carbono y relaciones C/N. Además, se identificaron taxonómicamente las mejores cepas de levaduras oleaginosas. Siete de las cepas evaluadas fueron capaces de acumular más del 20% de lípidos, dos de ellas tanto en glucosa como en glicerol y otro de los aislados llegó a acumular el 56% de triacilglicéridos, cuando la relación C/N fue de 44:1. El examen de la influencia de las fuentes de carbono en la producción de lípidos usando una relación C/N 60:1, mostró que solo uno de los aislados acumuló más del 20 % de grasas, específicamente en los medios con glucosa y xilosa, en esta última llegó al 31,4%. La identificación taxonómica de las cepas de levaduras mostró la presencia de cuatro especies oleaginosas: *Rhodotorula glutinis*, *Cryptococcus curvatus*, *Candida fusiformata* y *Cryptococcus albidus*. Estos resultados son aplicables en el contexto del desarrollo de fuentes alternativas y sostenibles para la obtención de grasas, evitando así la competencia con las fuentes tradicionalmente usadas en la alimentación humana y animal. Esto constituye una de las premisas para desarrollar una tecnología sustentable de producción de biodiesel a partir de aceites microbianos.

Palabras claves: levaduras oleaginosas, acumulación de lípidos, sulfosfosvainillina, relación C/N, *Rhodotorula glutinis*

ABSTRACT

Oleaginous microorganisms such as yeasts use a wide range of raw materials as a source of carbon during their growth, reaching lipid levels above 40% of their dry mass, under limiting nutritional conditions, being considered as good candidates for the production of biodiesel. In the present work the bioprocess of obtaining triacylglycerides in oleaginous yeast isolated from cheese, using different carbon sources and C/N ratios, was evaluated. In addition, the best strains of oleaginous yeast were identified taxonomically. Seven of the evaluated strains were able to accumulate more than 20% of lipids, two of them in glucose and glycerol and another of the isolates accumulated 56% of triacylglycerides, when the C/N ratio was 44:1. Examination of the influence of carbon sources on lipid production using a 60:1 C/N ratio showed that only one of the isolates accumulated more than 20% of fats, specifically in glucose and xylose media, in the latter reached 31.4%. The taxonomic identification of the yeast strains showed the presence of four oleaginous yeast: *Rhodotorula glutinis*, *Cryptococcus curvatus*, *Candida fusiformata* and *Cryptococcus albidus*. These results are applicable in the context of the development of alternative and sustainable sources for obtaining fats, thus avoiding competition with sources traditionally used in food and feed. This is one of the premises for developing a sustainable biodiesel production technology from microbial oils.

Key words: oleaginous yeasts, lipid accumulation, sulfophosphovanillin, C/N ratio, *Rhodotorula glutinis*

Índice Páginas

INTRODUCCIÓN	1
I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
1.1 Reseña histórica de las grasas microbianas.....	5
1.2 Principales géneros y especies de levaduras que producen grasa.....	6
1.3 Requerimientos para la acumulación de grasa en levaduras oleaginosas.....	6
1.4 Bioquímica de la acumulación de grasas en levaduras.....	8
1.5 Influencia de la fuente de carbono en la acumulación de TAG en levaduras oleaginosas.....	9
1.6 Importancia de las grasas microbianas o AUC.....	12
1.7 Taxonomía de levaduras. Identificación bioquímica.....	13
II. MATERIALES Y MÉTODOS	16
2.1 Microorganismos.....	16
2.2 Medios de cultivo.....	16
2.3 Preparación del inóculo.....	17
2.3.1 Inoculación de los medios para la producción de TAG.....	17
2.4 Evaluación cuantitativa de la acumulación de TAG en las levaduras por el método colorimétrico de la Sulfofosfovainillina.....	17
2.4.1 Determinación gravimétrica de la biomasa.....	17
2.4.2 Evaluación de la influencia de la fuente de carbono sobre la acumulación de TAG en las levaduras seleccionadas.....	18
2.5 Determinaciones analíticas.....	19
2.5.1 Determinación directa del contenido de lípidos en la biomasa mediante el método colorimétrico de la Sulfofosfovainillina.....	19
2.5.2 Determinación de carbohidratos totales solubles por el Método Fenol-Ácido sulfúrico.....	20
2.5.3 Determinación colorimétrica de glicerol.....	20
2.5.4 Determinación de NH_4^+	21
2.5.5 Cálculo de los indicadores de eficiencia de la fermentación.....	21
2.6 Tratamiento estadístico de los resultados.....	21
2.7 Identificación taxonómica de las cepas de levaduras seleccionadas.....	21
2.7.1 Observaciones microscópicas y microfotografías.....	22

2.7.2 Ensayos bioquímicos para la identificación de las cepas de levaduras aisladas.....	22
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
3.1 Cuantificación de la capacidad de acumulación de triacilglicéridos en nuevos aislados de levaduras procedentes de ambientes oleosos.....	23
3.2 Evaluación de la influencia de la fuente de carbono sobre la acumulación de triacilglicéridos en las levaduras seleccionadas.....	25
3.3 Identificación taxonómica de las cepas de levaduras seleccionadas.....	35
CONCLUSIONES	40
RECOMENDACIONES	41
REFERENCIAS BIBLIGRÁFICAS	42
ANEXOS	54

INTRODUCCIÓN

Las grasas microbianas o aceite unicelular (AUC) han sido el centro de atención de numerosas investigaciones desde las últimas décadas del siglo XX, por las variadas aplicaciones biotecnológicas que presentan, tales como formulación de alimentos, fabricación de fármacos y especialmente en la nueva industria de los biocombustibles.

En el mundo actual la demanda energética mundial es cada vez mayor debido al rápido crecimiento de la población y urbanístico. Las fuentes energéticas convencionales como el carbón, el petróleo o el gas natural, están agotándose poco a poco, mientras la biomasa está emergiendo como una de las alternativas energéticas más prometedoras y compatibles con el medio ambiente. Las reservas de petróleo actualmente conocidas se agotarán en un futuro incierto, pero no muy lejano. Por ello, resulta clave la búsqueda de fuentes de energía alternativas basadas en procesos regenerativos, ecológicamente compatibles y sostenibles en el tiempo. Un ejemplo son los biocombustibles, que constituyen la principal vía renovable para cumplir estos objetivos debido a los beneficios medioambientales que suponen, especialmente por la reducción de las emisiones de dióxido de carbono.

El biodiesel, es un biocombustible renovable constituido por ésteres metílicos o etílicos de ácidos grasos. Presenta propiedades físicas (densidad, viscosidad) y poder calórico similares a los hidrocarburos convencionales, pero ofrece varias ventajas con respecto a ellos. Entre estas se pueden destacar la emisión reducida de gases contaminantes (p.ej., óxidos nítrico y sulfúrico) en los motores, su baja inflamabilidad, la seguridad en su manipulación y la ventaja de poder utilizarse directamente en cualquier motor diesel, sin requerir ningún tipo de modificación, puro o mezclado con el petrodiesel (Pradhan, *et al.*, 2008). Como combustible obtenido a partir de fuentes renovables, su uso presenta un impacto medioambiental favorable con respecto al petrodiesel, pues su combustión no conduce a un incremento neto en los niveles de dióxido de carbono atmosférico, al tiempo que reduce las emisiones de azufre y monóxido de carbono en los vehículos entre un 65 y 95%, lo cual disminuye la toxicidad del aire en un 90% (Soria, 2014). Los ácidos grasos utilizados actualmente para la preparación de biodiesel derivan de los triacilglicéridos (TAG) que conforman los aceites vegetales y las grasas animales; sin embargo, la producción de biodiesel a partir de estas fuentes tiene sus limitaciones, como son la disponibilidad de aceite vegetal y la competencia con la alimentación humana y animal (Subhash y Mohan, 2014).

Muchos microorganismos oleaginosos son considerados como materia prima para la producción de biodiesel, ya que su composición de ácidos grasos es similar a la de los aceites vegetales que se utilizan en la actualidad (Ratlidge, 2004; Meng *et al.*, 2009; Vicente *et al.*, 2009) y dado a que no presentan el dilema ético del uso de productos alimenticios para elaborar biocombustibles, motivos estos por los que recientemente se les ha prestado gran atención. El contenido lipídico presente en estos microorganismos presenta perfiles que en muchos casos son idóneos para la producción de este biocombustible y en algunos otros casos pueden ser utilizados también en la industria alimenticia, por la presencia de un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados, tales como los ácidos linoleico (C18:2) y araquidónico (C20:4), los cuales son ácidos grasos esenciales y tienen valor nutricional (Subramaniam, *et al.*, 2010).

Los microorganismos oleaginosos heterotróficos (MOH), como levaduras y hongos filamentosos, pueden crecer en plantas de biomasa convencionales, pudiendo obtenerse grandes cantidades de estos en espacio reducido y en un corto período de tiempo, lo cual constituye una ventaja incuestionable con relación a la obtención de grasas de fuentes animales y vegetales. Además, los MOH utilizan un amplio abanico de materias primas como fuente de carbono durante su crecimiento, incluyendo residuos agroindustriales, lo cual reduce considerablemente los costos de producción de la grasa microbiana (Vicente, *et al.*, 2009). Pocos microorganismos son capaces de acumular grasas de forma significativa; entre los microorganismos oleaginosos que más se han estudiado se encuentran: algunas microalgas, bacterias, hongos filamentosos, y las levaduras *Candida rugosa*, *Rhodospiridium sp.*, *Rhodotorula sp.*, *Lipomyces starkeyi*, *Rhodotorula glutinis* y *Yarrowia lipolytica* (Benjamin y Pandey 2001).

En estos microorganismos la acumulación de lípidos ocurre durante el metabolismo secundario, en condiciones limitadas de un nutriente importante para el crecimiento como el nitrógeno, magnesio, fósforo, hierro o zinc, y en presencia de altas concentraciones de carbono (Murphy, 1991).

El desarrollo de un proceso fermentativo a escala comercial para la obtención de grasa microbiana requiere de dos cuestiones básicas: (1) disponer de un microorganismo capaz de acumular grandes cantidades de lípidos en su biomasa en un corto período de tiempo y con un aprovechamiento óptimo del sustrato (rendimiento) y (2) emplear un medio de cultivo óptimo en términos económicos y de indicadores de eficacia del bioproceso. En el primer aspecto, constituye un imperativo disponer de microorganismos autóctonos, pues las cepas para uso a escala comercial son conservadas celosamente por sus propietarios.

En cuanto a la formulación del medio de cultivo, el componente más relevante es la fuente de carbono y energía, por ser esta la que mayor peso tiene en el costo del mismo. Teniendo en cuenta estos dos elementos se diseñó el marco teórico que sirve de soporte a esta investigación.

Problema de investigación: Se necesita conocer cómo influye la fuente de carbono en la acumulación y rendimiento de TAG en nuevas cepas de levaduras oleaginosas aisladas de ecosistemas naturales y artificiales.

Hipótesis: Si se emplea una estrategia adecuada en la selección de cepas de levaduras oleaginosas y de las fuentes de carbono a utilizar en el medio de cultivo entonces se podrán maximizar el rendimiento y la acumulación de TAG en el proceso fermentativo.

Objetivo general:

Evaluar el bioproceso de obtención de triacilglicéridosa partir de diferentes fuentes de carbono en nuevos aislados de levaduras oleaginosas.

Objetivos específicos:

1. Cuantificarla capacidad de acumulación de triacilglicéridos en nuevos aislados de levaduras procedentes de ambientes oleosos.
2. Evaluar la influencia de la fuente de carbono sobre la acumulación de TAG en las levaduras seleccionadas.
3. Identificar taxonómicamente las cepas de levaduras seleccionadas

Novedad e Importancia de la Investigación

La presente investigación está vinculada al Proyecto “Desarrollo de una tecnología a escala piloto para la producción de biodiesel de residuos agroindustriales lignocelulósicos”, perteneciente al Programa Nacional de Ciencia y Técnica “Desarrollo de Fuentes Renovables de Energía” y en el cual participa el Grupo de Tecnología Enzimática del Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (CEBI). La identificación y caracterización de MOH capaces de utilizar una amplia gama de fuentes de carbono como materia prima para la acumulación de lípidos, así como la optimización de sus condiciones de cultivo, constituye una de las premisas para el logro de una tecnología competitiva de producción de biodiesel a partir de estas materias primas. Esto responde a la búsqueda de tecnologías para el aprovechamiento de la biomasa como fuente de energía renovable; una de las líneas de investigación priorizadas por el país. La investigación aporta nuevos aislados de levaduras oleaginosas autóctonas, con indicadores relevantes de acumulación y

rendimiento de lípidos, así como resultados preliminares acerca de la influencia de la fuente de carbono y la relación C/N en la producción de lípidos por estas levaduras.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1 Reseña histórica de las grasas microbianas

El estudio de los lípidos microbianos tiene una larga historia que se remonta a mediados de los años 1870. Varios investigadores han considerado el uso de aceites microbianos como fuentes de materias primas de aceites y grasas (Ratledge y Wynn, 2002). A principios de 1960, surgió un notable interés acerca de la producción de proteínas por microorganismos como las levaduras a partir de su selección en materias primas baratas derivadas de las refinerías de petróleo, de ahí que surgiera la era de la proteína unicelular la cual dio lugar a importantes avances en la tecnología de bioprocesos, con unidades de fermentación desarrolladas hasta 5 x 500 m³, y por la conversión de gas natural (metano) en SCP. Años más tarde se adoptó el nombre de aceite unicelular (SCO, por sus siglas en inglés) para describir a los microorganismos oleaginosos convirtiéndose en una estrategia alternativa. Muchos microorganismos llegaron a ser identificados por una producción de grasa elevada (Ratledge y Wynn, 2002).

Los estudios sobre los lípidos microbianos, y en particular sobre los lípidos de levadura, han mostrado que especies como *Saccharomyces cerevisiae*, nunca acumula más por encima de 10% de su masa celular, lípidos, pero otras levaduras, tales como *Rhodotorula sp.* y *Lipomyces sp.*, podrían acumular 70% e incluso más de su biomasa como lípidos. Por otra parte, la mayoría de los lípidos en estos microorganismos son triacilglicéridos (TAG), ácidos grasos de cadena larga, y por lo tanto su composición química es equivalente a los aceites y grasas comerciales. Estos microorganismos que podían acumular un nivel de grasa significativo se conocieron como microorganismos oleaginosos (Ratledge y Wilkinson, 1989).

En la actual sociedad global el objetivo está encaminado a la búsqueda de fuentes de energía alternativas basadas en recursos naturales renovables que sean sostenibles desde el punto de vista ambiental y económico. Este enfoque puede ofrecer una forma alternativa de obtener biocombustibles. En este contexto, el biodiesel producido a través de cultivos oleaginosos representa una alternativa válida para reemplazar a los combustibles fósiles (Ratledge, 2004, Meng, *et al.*, 2009, Vicente, *et al.*, 2009)

1.2 Principales géneros y especies de levaduras que producen grasa

Las levaduras oleaginosas poseen al menos el 20 % de su masa seca compuesta por ácidos grasos y una acción de crecimiento rápida. Estos microorganismos pueden crecer en una multitud de fuentes de carbono (glucosa, xilosa, glicerol, y otros residuos agrícolas e industriales). La mayoría de las levaduras oleaginosas pueden aumentar los niveles de lípidos en más de un 40 % de su masa seca y hasta un 70 % en condiciones nutricionales limitantes. Algunas de las especies de levaduras con un contenido lipídico alto son *Candida curvata*, *Lipomyces starkeyi*, *Rhodotorula glutinis*, *Cryptococcus albidus*. Especies tales como *Rhodospiridium sp.*, *Rhodotorula sp.*, y *Lipomyces sp.*, han mostrado un nivel de acumulación de lípidos que alcanza el 70% de su peso seco de biomasa (Subhash y Mohan, 2011).

De las 600 especies de levaduras que existen, menos de 30 tienen hasta ahora el poder de aumentar más del 20 % de su peso de la biomasa en aceite unicelular. Varias levaduras pueden acumular grasas a partir de hidrolizados de paja de arroz, de trigo y bagazo; sin embargo, la necesidad de una hidrólisis físico-química o enzimática previa del sustrato aumenta los gastos de producción, por lo que continúan los estudios exploratorios para reconocer especies oleaginosas que puedan crecer directamente en la biomasa lignocelulósica y utilizarla como fuente de carbono para la producción de AUC. (Soria, 2014).

1.3 Requerimientos para la acumulación de grasa en levaduras oleaginosas

Algunos investigadores han planteado cuatro posibles razones del por qué algunas levaduras pueden acumular gran cantidad de lípidos (Ratledge y Wynn, 2002):

1. Agotamiento de nitrógeno en el medio, las levaduras no oleaginosas dejarían de asimilar glucosa y por lo tanto no se generarían unidades de acetato que actúen como punto de partida para la biosíntesis de ácidos grasos.
2. La primera reacción de biosíntesis de ácidos grasos es caracterizada por la enzima acetil-CoA carboxilasa. En las especies no oleaginosas, esta enzima podría estar reprimida o sujeta a inhibición por retroalimentación por un acil-CoA éster graso como el producto final de la síntesis de ácidos grasos.
3. En los microorganismos no oleaginosos, puede haber un ciclo fútil de la biosíntesis de lípidos acompañada simultáneamente por la oxidación de lípidos de modo que no habría ninguna acumulación neta de lípidos.

4. El metabolismo intermediario puede ser regulado de manera diferente tanto en las levaduras oleaginosas como en las no oleaginosas de modo que en las primeras no habría un aumento del flujo de carbono en acetil-CoA, o, alternativamente, las no oleaginosas, este flujo es disminuido por los procesos de regulación celular.

Todas las enzimas dentro de una célula pueden considerarse como esenciales para alguna u otra función. Un perfecto equilibrio u organización celular es necesario para la biosíntesis y el almacenamiento de lípidos y el desarrollo funcional de la acetil-CoA carboxilasa (ACC), como enzima involucrada en la biosíntesis de lípidos, esta ACC, es una enzima ubicua, encontrándose en todas las células que generan sus lípidos a partir de acetil-CoA (Ratledge y Wynn, 2002)

En estos microorganismos la acumulación de lípidos ocurre durante el metabolismo secundario, en condiciones limitadas de un nutriente importante para el crecimiento como el nitrógeno, magnesio, fósforo, hierro o zinc, y en presencia de altas concentraciones de carbono (Murphy, 1991), la glucosa sigue siendo asimilada por las células y se convierte en triacilglicéridos más o menos a la misma velocidad a la que se sintetizaron los lípidos en la fase de crecimiento. La limitación en el suministro de nitrógeno impide la división celular, los lípidos que se van formando se van almacenando dentro de estas células existentes; por lo tanto, implica un aumento de la masa seca (Chatzifragkou, *et al.*, 2010).

De todos los nutrientes que pueden limitar el crecimiento e inducir la acumulación, la limitación de nitrógeno es la que causa mayor producción de AUC (Beopoulos, *et al.*, 2009). La magnitud acumulativa de grasas está en dependencia de condiciones de cultivo tales como el sustrato empleado, pH, temperatura, disponibilidad de nutrientes y tiempo de incubación y es necesario mantener un control de ellas (Chatzifragkou, *et al.*, 2011). El contenido lipídico podría ser mejorado significativamente a partir de la optimización de Mg^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , y la concentración de Ca^{2+} (Li, *et al.*, 2006).

Además de elegir las cepas adecuadas, son importantes sobre todo los sustratos pobres en nitrógeno y fósforo para que haya un almacenamiento importante de grasas en la célula microbiana. Por ello en muchas levaduras la mejor síntesis de grasas se consigue cuando el medio de cultivo tiene un contenido de nitrógeno de un 50 – 70 % por debajo del contenido óptimo. La síntesis de ácidos grasos en estos microorganismos se facilita por la disminución de la actividad de la enzima isocitrato deshidrogenasa, bajo la disminución de los niveles de nitrógeno. La asparagina y el ácido aspártico son especialmente apropiados como fuente de nitrógeno para producir una alta producción de grasas.

1.4 Bioquímica de la acumulación de grasas en levaduras oleaginosas

Las propiedades bioquímicas particulares de cada microorganismo oleaginoso es lo que le permite tener un mayor o menor rendimiento en la acumulación de lípidos.

Dos de las principales vías metabólicas para la biosíntesis de TAG son: la glicerol-3-fosfato (G-3-P) y la vía monoacilglicerol (MAG) aunque de esta última se tiene poca evidencia de si existe en levaduras. En ambos vías, el diacilglicerol (DAG), es el precursor inmediato de TAG, formado en un punto de ramificación. El DAG formado por la vía de MAG se orienta entonces a la vía de G-3-P para la etapa de esterificación final. En levaduras, TAG puede ser sintetizado ya sea por una reacción de acil-CoA-dependiente catalizada por la acil-CoA: diacilglicerolaciltransferasa (DGAT) o una vía-acilCoA-independiente catalizada por fosfolípidos: diacilglicerolaciltransferasa (PDAT) (Vorapreeda, *et al.*, 2012). El mecanismo bioquímico básico para la acumulación de grasas en levaduras oleaginosas fue desarrollado en condiciones limitantes de nitrógeno y propuesto como modelo regulador para dirigir la biosíntesis de lípidos (Ratledge y Wynn, 2002). El primer evento bioquímico identificable luego del agotamiento de nitrógeno es la activación de AMP desaminasa [S]: $AMP + IMP + NH_4^+$, actividad que sólo puede ser medida a corto plazo para aliviar la carencia de nitrógeno dentro de las células. La consecuente disminución de la concentración de AMP es pareja a un cambio repentino en el consumo de oxígeno de las células y en la salida de CO_2 (Ratledge, 2002). Esto es atribuible al cese de la actividad de la enzima isocitrato deshidrogenasa (ICDH) en la mitocondria. Esta enzima en los microorganismos oleaginosos tiene un requisito absoluto para la concentración de AMP. Luego de la inactivación de ICDH tiene lugar rápidamente una acumulación de citrato como isocitrato, a continuación, se equilibra rápidamente con citrato. El citrato se transporta fuera de la mitocondria, a través del sistema malato / translocasa citrato, y se escinde en el citosol por la enzima citrato liasa (Evans y Ratledge, 1984). Los dos átomos de carbono del acetyl-CoA obtenidos a partir de diferentes rutas catabólicas como la glucólisis, la ruta del fosfogluconato o por el catabolismo de grasas, aminoácidos y cuerpos cetónicos son los precursores de la síntesis de ácidos grasos (SAG) (Fakas, *et al.*, 2009) los cuales se sintetizan principalmente en el citoplasma (Scandellari, *et al.*, 2009). Los metabolitos intermediarios y enzimas que participan regulan de forma diferente a especies oleaginosas y no oleaginosas dentro de un mismo grupo; en las oleaginosas favorecen la degradación de la fuente carbonada del medio hasta AcetylCoA y luego su incorporación a SAG, y en las no oleaginosas la disminuyen (Saxena, *et al.*, 1998). Estudios realizados acerca de las diferencias entre el metabolismo de especies oleaginosas y no oleaginosas, reportan que la concentración de monofosfato de adenosina (AMP) en las especies oleaginosas en

condiciones limitantes de nitrógeno disminuye a menos de un 5% de su valor con respecto a condiciones limitadas de carbono; mientras que en las no oleaginosas, la concentración de AMP desciende de forma no significativa. La limitación de nitrógeno en el medio desencadena una serie de procesos bioquímicos en organismos oleaginosos, la glucosa continúa siendo asimilada y se convierte en triacilglicéridos en una porción similar a la de los lípidos sintetizados durante el crecimiento. La enzima AMP desaminasa es considerada la enzima causante de estos cambios. La AMP desaminasa es una enzima rescatadora de NH_4^+ ; por lo que al agotarse el nitrógeno del medio, aumenta su actividad como una vía de la célula para obtener el nitrógeno del AMP y utilizarlo en la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos. El rápido decrecimiento en la concentración de AMP debido a su desaminación, disminuye la actividad de la enzima isocitrato deshidrogenasa dependiente del NAD^+ (ICDH). La ICDH cataliza la descarboxilación oxidativa del isocitrato en 2-oxoglutarato durante el ciclo de Krebs; por lo que, la disminución de su actividad provoca la acumulación de citrato en las células y en el medio. El exceso de citrato se transporta desde las mitocondrias hacia el citosol y entra en la ruta de la SAG en forma de AcetilCoA por la acción de la enzima ATP citrato liasa (Ratledge y Wynn, 2002).

1.5 Influencia de la fuente de carbono en la acumulación de TAG en levaduras oleaginosas

Estudios realizados han demostrado que algunas condiciones de cultivo como la relación molar C/N, la fuente de nitrógeno, temperatura, pH, oxígeno disuelto y la concentración de sales trazas y sales inorgánicas tienen influencia en la acumulación de lípidos (Kong, *et al.*, 2007). Varios investigadores han reportado que cuando la relación C/N aumenta de 25 a 70, el contenido de aceite unicelular aumenta de 18 a 46 % (Hassan, *et al.*, 1996). Se ha encontrado que las fuentes inorgánicas de nitrógeno favorecen el crecimiento microbiano, pero no la acumulación de lípidos, mientras que fuentes orgánicas como la peptona favorecen la acumulación de lípidos, pero no el crecimiento celular (El-Fadaly, *et al.*, 2009). El nitrógeno es asimilado de fuentes como amoníaco, nitratos, nitritos y urea para sintetizar aminoácidos por medio de la transaminación, la diferencia entre una fuente y otra es la influencia en la tasa de crecimiento y acumulación de lípidos (Hung-Hsieh y Wen-Teng, 2009). El porcentaje en peso de lípidos varía por intervención de la concentración de algunos nutrientes en el medio de cultivo, entre ellos el nitrógeno y fósforo. Se ha confirmado que varias condiciones de estrés como la baja concentración de nitrógeno puede modificar significativamente la composición del organismo, provocando mayor contenido de lípidos. El crecimiento celular, la velocidad de consumo de nutrientes y la acumulación de lípidos dependen principalmente de factores como: concentración de

nutrientes (siendo el nitrógeno y fósforo los más importantes), adición de fuentes de carbono orgánico (peptona, ácido acético, glucosa, glicerina, acetato) e inorgánicos (dióxido de carbono). Una adecuada relación de la concentración entre nitrógeno y fósforo permite que la acumulación de lípidos y el crecimiento celular sean continuos (Xinet *et al.*, 2010).

Las levaduras oleaginosas que se desarrollan en medios ricos en fuente de carbono y con niveles bajos de nitrógeno pueden incrementar su capacidad de acumulación de lípidos, esto ocurre debido a que bajo estas condiciones la actividad de la NADH isocitrato deshidrogenasa disminuye o incluso desaparece en las mitocondrias de las levaduras oleaginosas, con lo cual el ciclo del ácido cítrico se ve reprimido, las rutas metabólicas se alteran, diezmando la síntesis de proteínas y comenzando la síntesis de lípidos (Chi *et al.*, 2010).

Hasta la fecha, la mayoría de los estudios sobre la producción de lípidos en microorganismos oleaginosos (microalgas, levaduras, bacterias, etc.) se han llevado a cabo con la glucosa como única fuente de carbono (Li *et al.*, 2007, Steen *et al.*, 2010). Sin embargo, el alto costo del biodiesel de los microorganismos oleaginosos se debe principalmente al alto costo de la glucosa, que se estima es aproximadamente el 80% del coste medio total. Por lo tanto, se han realizado esfuerzos considerables para minimizar el costo de la fuente de carbono y encontrar nuevas fuentes de carbono alternativas, incluyendo almidón y etanol (Hansson *et al.*, 1986), pectina y lactosa (Papanikolaou *et al.*, 2007, Fakas *et al.*, 2008), y glicerol (Easterling *et al.*, 2009, Makri *et al.*, 2010).

Durante la producción de biodiesel se obtiene como subproducto el glicerol. Se han informado microorganismos capaces de asimilar el glicerol como fuente de carbono para la acumulación de lípidos (Papanikolaou *et al.*, 2002). Con el desarrollo de las producciones de biodiesel a gran escala, el empleo del glicerol crudo como fuente de carbono para la producción de aceite unicelular es un campo de investigación interesante, tal es el caso de *Candida curvatus* que tuvo una acumulación de lípidos del 48% en peso (Thiru *et al.*, 2011).

En otros estudios como el de Ravindra (2000), se obtuvo que, para la producción de AUC a partir de desechos orgánicos agroindustriales ricos en celulosa y almidón, son los mejores sustratos. Entre los residuales que pueden usarse como sustrato para la acumulación de lípidos por microorganismos oleaginosos heterotróficos (MOH), la biomasa lignocelulósica es una de las alternativas más prometedoras, debido a su abundancia y bajo costo. La

lignocelulosa está compuesta por lignina 15-25%, hemicelulosa 23-32 %, celulosa 38-50 %, y algunos componentes inorgánicos (Abril, 2008). Debido a su composición su utilización como sustrato, incluye un proceso de degradación de los polisacáridos en monosacáridos asimilables por los microorganismos oleaginosos (Rubin, 2008). La conversión de biomasa a AUC ocurre en dos pasos: primero la lignocelulosa es convertida en azúcares fermentables y segundo, los azúcares son asimilados y convertidos en AUC por los MOH. Pocos microorganismos oleaginosos son capaces de crecer en biomasa lignocelulósica, por lo que la mayoría de los estudios se han enfocado en la oleaginosidad a partir de hidrolizados lignocelulósicos posterior a una hidrólisis físico-química o pretratamiento enzimático. Incluso posterior a hidrólisis, muy pocos microorganismos oleaginosos pueden utilizar la xilosa para producir AUC, y este azúcar después de la glucosa es el monosacárido más abundante en los hidrolizados lignocelulósicos (Huang *et al.*, 2013). *Lipomyces starkeyi* (Zhao *et al.*, 2008), *Mortierella isabellina* (Fakaset *et al.*, 2009) y *Trichosporon fermentans* (Zhu *et al.*, 2008) han sido utilizados para la obtención de AUC a partir de hidrolizados de paja de arroz y bagazo. Se ha obtenido AUC también a partir *Cryptococcus curvatus*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodospiridium torulooides*, *Lipomyces starkeyi*, y *Yarrowia lipolytica*, en hidrolizados de paja de trigo (Yue *et al.*, 2011).

Otro de los residuos industriales importantes es la vinaza un subproducto del proceso de obtención de etanol a partir de la melaza y jugos de caña de azúcar. Posee alta cantidad de materia orgánica y es uno de los residuos más recalcitrantes. La vinaza es una buena fuente de carbono para el metabolismo microbiano debido a la presencia de azúcares fermentables y otros compuestos orgánicos en su composición. Las levaduras oleaginosas acumulan lípidos cuando la fuente de nitrógeno del medio se ha agotado y el exceso de carbono es asimilado por las células y convertido en TAG que podrían ser empleados para la producción de biocombustibles. Constituye un buen sustrato para el desarrollo de *Rhodotorula mucilaginosa* permitiendo una remoción del 80 % de la carga orgánica. Otro ejemplo de ello es el trabajo de Zhu *et al.*, (2008) quienes reportan una acumulación de lípidos del 50.8% en peso seco y una producción de biomasa del 19.4 g L⁻¹ en melazas, en la levadura *Trichosporon fermentans*.

La Cerulenina, o 2,3-epoxi-4-oxo-10-dodecadienamida, es un producto natural descrito originalmente por Hata *et al.*, (1960) por presentar propiedades antifúngicas. Estudios adicionales revelaron que la cerulenina constituye un potente inhibidor de la biosíntesis de lípidos (Satoshi, 1976), demostrándose su relación en los efectos inhibidores sobre la actividad de la enzima ácido graso sintetasa (Kawaguchi *et al.*, 1982). Sin embargo otros estudios han revelado que este producto ha sido ampliamente utilizado como una herramienta valiosa en estudios bioquímicos, centrándose en la síntesis y metabolismo de

ácidos grasos y esteroides por microorganismos (Altenbern, 1977; Parrish *et al.*, 1999; Parsons *et al.*, 2011). Estudios recientes han utilizado esta molécula como suplemento nutricional para la producción natural de ácidos grasos poliinsaturados por *Moritella marina* y *Shewanella marinintestina* (Morita *et al.*, 2005), así como un agente selectivo en la detección de la producción de un contenido lipídico alto por mutantes de *Rhodotorula glutinis* (Wang *et al.*, 2009) y una alta producción de glutatión por mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida utilis* (Nishiushi *et al.*, 2012).

1.6 Importancia de las grasas microbianas o AUC

La producción de lípidos ha despertado gran interés hacia el desarrollo de nuevas investigaciones debido a sus propiedades, y a las diversas formas de obtenerlos. Las diferentes aplicaciones de estas biomoléculas como formulación de alimentos, fabricación de fármacos y especialmente biocombustibles han generado la búsqueda por nuevas fuentes entre las que se encuentran las levaduras. Los lípidos presentes en estos microorganismos presentan perfiles que en muchos casos son idóneos para la producción de biodiesel, y en algunos otros casos pueden ser utilizados en la industria alimenticia, debido a que algunas levaduras tienen la capacidad de sintetizar lípidos similares a los presentes en la semilla de cacao, con altos porcentajes de ácido esteárico y porcentajes parecidos de ácido oleico y palmítico, o incluso algunas tienen la capacidad de sintetizar ácidos grasos omega 3 y omega 6, los cuales se ha observado que presentan propiedades nutricionales y terapéuticas importantes (Li-Xia *et al.*, 2009).

El AUC es rico en ácidos grasos poliinsaturados como el linoléico y el araquidónico, los cuales pueden ser utilizados para la producción de suplementos nutricionales. Los lípidos microbianos también son considerados candidatos prometedores para la obtención de biodiesel, pues su composición de ácidos grasos es similar a la de los aceites vegetales (Economou, *et al.*, 2011).

La posibilidad de utilizar residuales lignocelulósicos como fuente de carbono para la obtención de lípidos, a través de fermentación en estado sólido (FES) por especies oleaginosas, resulta atractivo para la producción de biodiesel; debido a que disminuye el costo de la materia prima utilizada; además se le agrega un valor a los residuales de esta naturaleza. Uno de los residuales lignocelulósicos más abundantes en nuestro país es la pulpa de café, la misma representa el 40% del café que se despulpa. Anualmente se vierten en todo el país, como promedio, unas 56 800 toneladas de pulpa, la cual debido a

su composición química es utilizada como sustrato para FES(fermentación en estado sólido) con el fin de obtener biomasa y enzimas (García, 2008).

Estas grasas microbianas constituyen un gran potencial de materia prima para la producción de biodiesel, debido a las ventajas que posee: renovabilidad, una tasa de crecimiento rápida, y no necesita extensiones de tierras para el cultivo. Este biodiesel como combustible obtenido a partir de fuentes renovables, contribuiría a resolver problemas ambientales, sociales y económicos como son: la contaminación derivada del diesel de petróleo cuya combustión genera emisiones nocivas al medio ambiente y la salud (monóxido de carbono, dióxido de azufre, óxidos de nitrógeno, dióxido de azufre, hidrocarburos, y aldehídos) lo cual disminuye la toxicidad del aire en un 90% (Soria, 2014); en lo social, el consumo arraigado hacia los combustibles de origen fósil, cuyo agotamiento ya predecible generará malestar en el consumidor final; y en lo económico, nuestra matriz energética se diversificaría y por lo tanto no dependeríamos de manera importante de las súbitas fluctuaciones del precio del petróleo que es manejado internacionalmente por la Organización de los Países Exportadores de Petróleo (OPEC)(Mendoza, 2010).La eficiencia de la conversión de AUC en biodiesel como fuente de energía es de aproximadamente 55% (Tao, *et al.*, 2006).

1.7 Taxonomía de levaduras. Identificación bioquímica

La caracterización de levaduras hasta el nivel de especie resulta relevante desde el punto de vista industrial, debido a que muchos grupos forman parte de la microflora natural de alimentos y bebidas fermentadas y/o participan en el proceso de obtención de éstos. De ahí la necesidad de poseer métodos de identificación rápidos, precisos y fáciles, que puedan ser aplicados al control de la calidad en la industria, con el fin de asegurar que la cepa de partida, conductora del proceso y que rinde el producto final, sea la misma. Por otro lado, en los laboratorios de control de calidad de alimentos ya se está haciendo necesaria la identificación de levaduras alteradoras, tanto para la detección del origen de la contaminación como para la solución de litigios, relacionados con la propiedad industrial (Fernández-Espinar *et al.*,2000). Las áreas de comparación taxonómica en las cuales se enmarca la taxonomía de levaduras incluyen la Morfología, Fisiología, Genética, Bioquímica, Ecología y Biología Molecular (Boekhout y Kurtzman, 1996).

La taxonomía de levaduras ha transitado por dos períodos, el primero caracterizado por un fuerte estudio de la morfología comparativa, la fisiología y la genética convencional y una segunda etapa, que se extiende hasta la actualidad, identificada por una ampliación en los

estudios de morfología al nivel ultramicroscópico, la aplicación de criterios bioquímicos y la introducción de los estudios de la Biología Molecular (Kurtzman y Mannarelli, 1998). Entre los principales aportes de la segunda etapa se destacan la diferenciación por microscopía electrónica de transmisión de las fases levaduriformes de los ascomicetes y basidiomicetes (Boekhout y Kurtzman, 1996) y la aplicación de los perfiles de ácidos nucleicos para la identificación de géneros, especies y cepas, mediante las técnicas de secuenciación de DNA/RNA, cariotipado y el estudio de los patrones de restricción de los RNAs (Kurtzman y Mannarelli, 1998). Estos métodos moleculares en su mayoría resultan costosos y algunos laboriosos, sin embargo, en muchos casos son la base para el desarrollo de herramientas moleculares que combinan la exactitud con la rapidez y la factibilidad, resultando en una aplicación exitosa en la industria y para el diagnóstico clínico.

La identificación en base a las características morfológicas y fisiológicas requiere la realización de unas 100 pruebas, lo cual es laborioso, complejo y consume tiempo (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999). Se estudia la morfología del estado asexual y sexual, presencia de homo y heterotalismo, etc., características que solo permiten la identificación hasta el nivel de género (Boekhout y Kurtzman, 1996). Las principales desventajas que han mostrado las pruebas morfológicas se manifestaron con el descubrimiento del estado sexual de reproducción de la fase levaduriforme de los ascomicetes y basidiomicetes, o sea, la relación anamorfo/teleomorfo, lo cual ha generado la llamada dualidad de la nomenclatura binomial, que no es más que una misma especie sea nombrada de una forma en el estado vegetativo (anamorfo) y de otra en el estado sexual (teleomorfo). En este caso se encuentran los dúos *Bullera/Bulleromyces*, *Cryptococcus/Filobasidiella* y *Brettanomyces/Dekkera*, etc. Aunque la dualidad ha sido aceptada por el Código Internacional de Nomenclatura Botánica, el esclarecimiento de estas relaciones en base a los estudios de los patrones genéticos de las especies en estado asexual, son la base del reclamo de los investigadores para la reelaboración de la nomenclatura de las levaduras (Sasson, 1998).

Las principales pruebas fisiológicas utilizadas en identificación de levaduras son las de fermentación/asimilación de fuentes de carbono, asimilación de compuestos nitrogenados, requerimientos vitamínicos, resistencia a cicloheximida y termotolerancia. Éstas no siempre son estables ni reproducibles, debido a que las fuentes de carbono y nitrógeno pueden metabolizarse por rutas comunes y en ocasiones su metabolismo es controlado por varios genes (Boekhout y Kurtzman, 1996). La prueba de fermentación de azúcares no es muy exacta debido a que las levaduras de fermentación lenta no liberan el CO₂ de forma tan inmediata para que sea atrapado en un tubo Durham, lo cual ha provocado que especies

consideradas durante mucho tiempo no fermentativas, hayan tenido que reclasificarse (Boekhout y Kurtzman, 1996).

La identificación molecular de levaduras, posee un valor práctico para el desarrollo de métodos y herramientas para la identificación rápida y precisa en muestras heterogéneas procedentes de la industria, de origen clínico y ambiental. Los datos obtenidos del estudio del genoma, han generado cambios importantes en la taxonomía de géneros y especies y han contribuido al esclarecimiento de las relaciones filogenéticas entre los grupos taxonómicos de estos microorganismos (Orberá, 2004).

Dentro de las pruebas genéticas empleadas, está el apareamiento entre cepas complementarias con la subsiguiente aparición del estado sexual, sin embargo muchas especies estrechamente relacionadas llegan a aparearse, aunque no generan una progenie viable (Boekhout y Kurtzman, 1996). Como pruebas bioquímicas predominan la electroforesis de proteínas, análisis de los patrones de isoenzimas y de Resonancia Magnética Nuclear, el número de unidades de isopreno en la coenzima Q y la cromatografía de ácidos grasos de cadena larga de la pared celular. Estas técnicas también dependen del estado fisiológico de las cepas. Estos métodos en general, producen ambigüedades e incorrecciones en los resultados, debido a que las características morfológicas y fisiológicas están fuertemente influenciadas por las condiciones de cultivo (Boekhout y Kurtzman, 1996).

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Microorganismos

Se trabajó con las 15 cepas de levaduras que mostraron los mejores valores de acumulación de TAG según el ensayo semicuantitativo (Thakur, 1989), las cuales fueron aisladas de ambientes oleosos en un trabajo previo (Hernández *et al.*, 2016). Las cepas se encontraban conservadas en agua destilada estéril a 4° C en el Laboratorio de Tecnología Enzimática y Microbiana del CEBI.

2.2 Medios de cultivo

a) Medios de uso general

Extracto de levadura-peptona-glucosa (YPD) (composición, en g·L⁻¹): Extracto de levadura 10, Glucosa 20, Peptona 20. La variante sólida del medio (YPDA) se obtiene por adición de agar bacteriológico 20.

b) Medios líquidos para evaluar cuantitativamente la capacidad de acumulación de triacilglicéridos en las levaduras aisladas

Los medios de cultivo empleados presentaron la siguiente composición (g·L⁻¹): fuente de carbono y energía (glucosa o glicerol) 40, (NH₄)₂SO₄ 2, KH₂PO₄ 1, MgSO₄·5H₂O 0,5, Extracto de levadura 1. El pH se ajustó a 5 con una solución de NaOH 1 mol/l, usando un pH-metro digital (Consort C561, Bélgica) para su medición.

c) Medios líquidos para evaluar la influencia de la fuente de carbono sobre la acumulación de TAG en las levaduras seleccionadas.

Los medios empleados tuvieron la siguiente composición (g·L⁻¹): (NH₄)₂SO₄ 2, KH₂PO₄ 1, MgSO₄·5H₂O 0,5, Extracto de levadura 1. La concentración de la fuente de carbono se ajustó de modo que la relación molar C/N fuera de 60:1. Las fuentes de carbono y concentraciones (g·L⁻¹) usadas fueron: Glucosa 54 (Medio 1), Glicerol 52 (Medio 2), Lactosa 51,35 (Medio 3), Sacarosa 51,35 (Medio 4), Xilosa 54,04 (Medio 5) y mezcla de Xilosa (42,02) + Glucosa (12,6) (Medio 6; las concentraciones en este medio simulan las de un hidrolizado ácido de lignocelulosa). El pH se ajustó a 5 con una solución de NaOH 1 mol/l, usando un pH-metro digital (Consort C561, Bélgica) para su medición.

Todos los medios fueron esterilizados en autoclave(BK-75, Rusia) a 121° C, 1 atm de vapor, durante 20 min.

2.3 Preparación del inóculo

Se tomaron 100 µl de la suspensión celular de las levaduras conservadas en agua destilada y se depositaron en tubos de ensayos con medio YPD para revitalizar el cultivo. Los tubos inoculados se dejaron en agitación durante 24 horas en zaranda (*Mizard 2001*) a temperatura ambiente.

2.3.1 Inoculación de los medios para la producción de TAG

Una vez observado el crecimiento de las cepas en el medio YPD, se tomaron 100 µl de los cultivos y se depositaron en erlenmeyers que contenían los respectivos medios líquidos para la posterior evaluación de la capacidad de acumulación de TAG. Los frascos inoculados se incubaron en agitación a 150 rpm por un período de 70 horas a temperatura ambiente.

2.4 Evaluación cuantitativa de la acumulación de TAG en las levaduras por el método colorimétrico de la Sulfofosfovainillina (Izard y Limberger, 2003)

Se depositaron alícuotas de 10 ml de los cultivos de las levaduras en tubos de centrifuga plásticos y se centrifugaron a 6000 rpm durante 10 minutos. Del sobrenadante se tomó 1ml para la determinación de glucosa y glicerol residual. Luego se lavó la biomasa sedimentada con 5 ml de agua destilada y se resuspendió en 2 ml de agua destilada. La suspensión celular se utilizó para la determinación directa del contenido de TAG mediante el método colorimétrico de la Sulfofosfovainillina, según se describe en el epígrafe 2.5.1.

2.4.1 Determinación gravimétrica de la biomasa

De la biomasa de levadura resuspendida en agua destilada, según se describió en el epígrafe 2.4, se trasladaron 1,5 ml a viales previamente tarados en Balanza Analítica (Ohaus, China) para la determinación del peso seco. Se centrifugaron los viales, se desechó el sobrenadante y se dejaron en la estufa(YLD 6000, China) durante 24 horas hasta peso constante a 80° C. Posteriormente se pesaron en Balanza Analítica (Ohaus, China).

2.4.2 Evaluación de la influencia de la fuente de carbono sobre la acumulación de TAG en las levaduras seleccionadas

Se escogieron las dos mejores cepas, considerando sus niveles de acumulación de lípidos y el rendimiento de biomasa, para evaluar la influencia de diferentes fuentes de carbono sobre la acumulación de triacilglicéridos. La relación molar carbono/nitrógeno (C/N) fue ajustada para una proporción de 60:1 teniendo en cuenta lo reportado en la literatura sobre la acumulación de lípidos en estos microorganismos, en condiciones limitadas de un nutriente importante para el crecimiento como el nitrógeno y en presencia de altas concentraciones de carbono (Murphy, 1991).

Las cepas seleccionadas se crecieron en cuñas de YPDA durante 24-48 h. Se tomó con el asa microbiológica una porción adecuada del cultivo en medio sólido y se inocularon 50 ml de medio YPD contenidos en erlenmeyers de 250 ml. Estos se incubaron en agitación por un período de 18 horas; transcurrido ese tiempo el cultivo se centrifugó (Heal Force, Alemania), la biomasa se lavó y se resuspendió en 20 ml de NaCl 0,9% estéril. Se tomó 1 ml de la suspensión para la inoculación de cada medio de cultivo (20 ml), correspondientes a las seis variantes de fuentes de carbono empleadas. El ensayo se realizó por duplicado, para cada medio. Con la suspensión celular restante se realizó el conteo de células en Cámara de Neubauer para determinar la concentración inicial del microorganismo en el cultivo.

Los medios de cultivos inoculados, contenidos en erlenmeyers de 100ml, se dejaron en agitación a 130 rpm en zaranda (HDL Apparatus), a temperatura ambiente. Cada 24 horas se tomó 1 ml del caldo de fermentación, se centrifugó y el sobrenadante se usó para la determinación de NH_4^+ ; el pellet celular se resuspendió en 0,2 ml de agua destilada y se procedió a la determinación cuantitativa (por duplicado) del contenido de lípidos mediante el Método de la Sulfofosfovainillina (alícuotas de 50 μl , excepto para la cepa 30 A donde se tomaron alícuotas de 50 μl y 10 μl) y al conteo celular en Cámara de Neubauer.

A las 72 horas se tomaron 15 ml de los cultivos y se centrifugaron durante 10 minutos a 8 000 rpm. Al sobrenadante se le determinó NH_4^+ , azúcares solubles y glicerol residual, según los métodos que se describen en la sección 2.5. El pellet celular se lavó con 5 ml de agua destilada y se resuspendió en 2 ml de agua destilada. De la suspensión celular se tomaron 1,5 ml para la determinación gravimétrica de la biomasa (peso seco) y con el resto se cuantificó el contenido de lípidos por el Método de la Sulfofosfovainillina y se realizó conteo celular en Cámara de Neubauer.

2.5 Determinaciones analíticas

2.5.1 Determinación directa del contenido de lípidos en la biomasa mediante el método colorimétrico de la Sulfofosvoinillina (Izard y Limberger, 2003)

a) Preparación de la serie de patrones de aceite de soya para la realización de la curva de calibración del método.

Se preparó una solución madre de aceite de soya refinado comercial *As de Oro* (Empresa Productora y Refinadora de Aceites *Ecasol*, carretera de Mar Verde, Km 4½) en isooctano a 0,5 mg/ml. Para ello, se añadieron 100 µl de aceite de soya en un vial previamente tarado en balanza analítica (*Sartorius*) y se pesó nuevamente el vial para determinar la masa exacta de aceite añadida. Se añadieron 884 µl de isooctano para obtener una concentración de aceite de 100 mg/ml. Entonces se efectuaron diluciones sucesivas 1/10 y 1/20 en isooctano para obtener la solución madre de aceite de soya a 0,5 mg/ml. De esta solución de aceite de soya a 0,5 mg/ml se tomaron (por duplicado) alícuotas de 20, 40, 80, 120, 160 µl y se depositaron en tubos de ensayos, para posteriormente poner a secar en la estufa a 60° C. Una vez finalizado el proceso de secado, se enfriaron los tubos a temperatura ambiente, y se añadieron 100 µl de agua destilada a cada tubo, quedando así preparada la serie de patrones.

b) Procedimiento

A cada tubo de ensayo correspondiente a los patrones de aceite de soya o las suspensiones de biomasa (muestras) se les añadió agua destilada hasta completar un volumen de 100 µL. En este caso se añadieron 100 µl a los tubos conteniendo los patrones, por ser despreciable el volumen correspondiente al aceite y 50 µl a las suspensiones de biomasa. Se añadió luego a cada tubo 1000 µl de H₂SO₄ concentrado, se agitó e incubó en un baño de agua hirviendo durante 10 minutos. Luego se dejaron enfriar a temperatura ambiente los tubos, se añadió a cada uno 2,5 ml el reactivo Ácido Fosfórico-Vainillina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído) y se incubaron durante 15 minutos a 37° C. Posteriormente se midió la transmitancia a 550 nm en un fotómetro (Zuzi 4010). Estos ensayos fueron realizados por duplicado.

La curva de calibración se confeccionó utilizando el software Microsoft Office Excell.

2.5.2 Determinación de carbohidratos totales solubles por el Método fenol-ácido sulfúrico (Método de Dubois: Dubois *et al.*, 1956) (Anexo 1)

Patrones: Se prepararon soluciones madre de glucosa, sacarosa y xilosa 1 mg/ml, a partir de las cuales se prepararon patrones de 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 µg/ml respectivamente. En el caso de la sacarosa se prepararon, además, patrones de 240 y 300 µg/ml. A las muestras se les efectuó diluciones de 1/100 antes del ensayo.

Procedimiento: De las muestras y los patrones se añadieron 0,2 ml a tubos de ensayo termorresistentes provistos de cierre hermético (*Hach*) y 0,2 ml del Reactivo A (fenol disuelto en agua (5%*m/v*)), se añadió 1 ml del Reactivo B (ácido sulfúrico concentrado) rápidamente y directamente sobre la superficie de la solución sin tocar las paredes del tubo, se esperaron 10 minutos antes de agitar vigorosamente, se esperaron otros 30 minutos y se procedió a leer la transmitancia a 480nm contra un blanco de reactivo en el fotómetro(Zuzi 4010).

2.5.3 Determinación colorimétrica de glicerol (Bondioli y Bella, 2005) (Anexo 2)

Patrones: Se preparó la serie de patrones de glicerol a partir de una solución de trabajo de referencia de glicerol a 0,03 mg/ml, transfiriéndose 0,25; 0,50; 0,75; 1,00; 1,25 ml de esta solución a tubos con cierre hermético (*Hach*), y mezclándose con el disolvente de trabajo (mezcla de volúmenes iguales de agua destilada y etanol al 95 %) de tal manera que se obtuviera un volumen final de 2 ml en cada tubo. La serie de patrones se preparó por duplicado. Para evaluar la influencia de glicerol como fuente de carbono se preparó una nueva Solución Madre de Glicerol 250 µg /ml, a partir de la cual se prepararon patrones de 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 µg/ml respectivamente.

Procedimiento: De las muestras, con previa dilución 1/100, se depositaron 0,5 ml en tubos (*Hach*) y se agregaron 1,5 ml del disolvente de trabajo a cada tubo. A muestras y patrones se añadieron 1,2 ml de la solución metaperyodato sódico 10 mM y se agitaron durante 30 segundos. Luego se añadieron 1,2 ml de la solución de acetilacetona 0,2 M y se llevaron a un baño de agua termostataado 70° C durante 1 minuto agitando manualmente. Una vez concluido este tiempo se detuvo la reacción inmediatamente en agua fría, para proceder a leer la transmitancia en fotómetro (Zuzi 4010) a 420 nm contra un blanco de reactivo. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

2.5.4 Determinación de NH_4^+ (Standard Methods, APHA, 1998) (Anexo 3)

Patrones: Se prepararon la serie de patrones de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 mg/l a partir de una Solución Madre de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2,5 mg/l.

Procedimiento: A las muestras se le aplicó previamente dilución 1/1000, y luego fue variando la dilución según los valores de absorbancia obtenidos. De los patrones y las previas diluciones de las muestras, se tomaron 2,5 ml, y se depositaron en Tubos Hach, se adicionó cuidadosamente, agitando y mezclando completamente: 0,1 ml de la solución de fenol; 0,1 ml de la solución de nitroprusiato de sodio 0,5 %, y 2,5 ml de la solución oxidante. Los tubos se cerraron herméticamente, y se dejaron en un cuarto de temperatura de 22 a 27° C, a media luz, hasta que transcurriera una hora. La medida de absorbancia se realizó a 670 nm contra un blanco de reactivo. La solución oxidante usada fue hipoclorito de sodio a una concentración del 1%.

2.5.5 Cálculo de los indicadores de eficiencia de la fermentación

Rendimiento biomasa/sustrato ($Y_{X/S}$):

- $Y_{X/S} = [\text{biomasa formada (g}\cdot\text{L}^{-1})]/[\text{sustrato consumido (g}\cdot\text{L}^{-1})]$

Rendimiento producto/sustrato ($Y_{P/S}$):

- $Y_{P/S} = [\text{producto formado (mg)}]/[\text{concentración inicial de sustrato (g}\cdot\text{L}^{-1})]$

Contenido de lípidos en la célula (%):

- $Y_{P/X} = [\text{contenido de lípidos (\%)}] = (\text{concentración de lípidos}\cdot 100/\text{concentración de biomasa})$

2.6 Tratamiento estadístico de los resultados

Los ensayos de producción de TAG por las levaduras se realizaron por duplicado, realizándose, además, dos repeticiones de los ensayos analíticos, procesándose un total de cuatro repeticiones. Para la interpretación de los parámetros muestrales se utilizaron los estadígrafos media aritmética y desviación estándar.

2.7 Identificación taxonómica de las cepas de levaduras seleccionadas

Se identificaron taxonómicamente cuatro cepas de levaduras previamente aisladas de ambientes oleosos, dos de ellas sometidas a los ensayos antes descritos y las otras dos

considerando sus niveles de acumulación de lípidos y el rendimiento de biomasa según resultados del primer ensayo cuantitativo. Las levaduras seleccionadas para realizarles la identificación se purificaron por dilución y se conservaron en cuñas de YPDA a 4 °C.

2.7.1 Observaciones microscópicas y microfotografías

Las observaciones microscópicas se realizaron a partir de preparaciones en fresco de los cultivos, en un microscopio óptico (NOVEL, China). Las microfotografías se tomaron con una cámara fotográfica digital (CANON, China) acoplada al microscopio bajo un aumento de 100x. Para obtener las fotografías de las colonias, las levaduras se sembraron por diseminación en placas de YPDA y se dejaron crecer a 30°C durante 48 h. Las observaciones se realizaron al microscopio estereoscópico (Novel, China) y se fotografiaron (CANON, China) bajo un aumento de 10x.

2.7.2 Ensayos bioquímicos para la identificación de las cepas de levaduras aisladas (Barnett *et al.*, 1983)

Las levaduras se identificaron sobre la base de 50 caracteres (pruebas bioquímicas y observaciones morfológicas) de acuerdo con las claves dicotómicas y procedimientos experimentales descritos por Barnett *et al.* (1983). Se asignó una identificación solo cuando la correspondencia con las claves era del 100 % o, en caso de una correspondencia inferior, si ésta superó en al menos un 9 % a la próxima mejor identificación (Silva *et al.*, 2000). Las pruebas bioquímicas utilizadas en el proceso de identificación de levaduras fueron las de fermentación de azúcares, asimilación de diferentes fuentes de carbono, asimilación de distintos compuestos nitrogenados, requerimientos vitamínicos y termotolerancia. El crecimiento microbiano se evaluó visualmente cada 24 horas durante 7 y hasta 10 días.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Cuantificación de la capacidad de acumulación de triacilglicéridos en nuevos aislados de levaduras procedentes de ambientes oleosos

En las tablas 1 y 2 se muestran los valores obtenidos de acumulación de lípidos en las 15 cepas de levaduras aisladas

Tabla 1. Acumulación de lípidos en las 15 cepas de levaduras empleando glucosa como fuente de carbono y energía

Cepas	C cel (mg/ml)	Y _{x/s}	Y _{P/S} (mg TAG/g sustrato)	Y _{P/X} (%)
75	2,16	0,08	7,4	9,23
78	1,93	0,07	14,9	21,27
30A	4,91	0,17	55,9	32,89
30B	1,61	0,06	20,1	33,54
79	3,27	0,12	16,9	14,11
74	4,56	0,17	30,2	17,77
73	0,56	0,2	73,3	36,65
38	4,04	0,15	17,1	11,42
77	0,99	0,04	10,1	25,27
36	3,51	0,14	9,2	6,56
48	5,6	0,16	14,9	9,33
37	7,63	0,21	16,5	7,85
35	5,37	0,17	15,1	8,86
20	3,85	0,13	10,0	7,66
76	5,68	0,18	16,6	9,2

Tabla 2. Acumulación de lípidos en las 15 cepas de levaduras empleando glicerol como fuente de carbono y energía

Cepas	C cel (mg/ml)	Y_{x/s}	Y_{P/S} (mg TAG/g sustrato)	Y_{P/X} (%)
75	2,84	0,08	5,3	6,61
78	2,52	0,07	9,1	13,05
30A	3,24	0,09	44,9	49,84
30B	0,81	0,02	6,0	30,04
79	2,41	0,07	10,1	14,4
74	1,63	0,04	19,9	49,72
73	2,36	0,07	8,5	12,15
38	2,31	0,06	9,0	15,03
77	1,8	0,03	3,2	10,75
36	1,08	0,03	2,3	7,74
48	6,39	0,17	8,3	4,87
37	1,19	0,04	22,6	56,53
35	3,37	0,09	14,0	15,51
20	6,64	0,17	8,7	5,09
76	4,63	0,13	15,7	12,06

Hasta la fecha, la mayoría de los estudios sobre la producción de lípidos en microorganismos oleaginosos como las levaduras se han llevado a cabo con glucosa como única fuente de carbono (Li *et al.*, 2007, Steen *et al.*, 2010). Sin embargo, el alto costo del biodiesel a partir del aceite de los microorganismos oleaginosos se debe principalmente al alto costo de la glucosa, que se estima es aproximadamente el 80% del coste medio total. Por lo tanto, se han realizado esfuerzos considerables para minimizar el costo de la fuente de carbono y encontrar nuevas fuentes de carbono alternativas, como el glicerol (Easterling *et al.*, 2009, Makri *et al.*, 2010).

La evaluación cuantitativa mostró que siete de las cepas fueron capaces de acumular más del 20% de lípidos, dos de ellas tanto en glucosa como en glicerol. Otra de las cepas llegó a acumular el 56 % de triacilglicéridos, empleando como única fuente de carbono y energía glicerol. Se ha informado acerca de microorganismos levaduriformes capaces de asimilar el glicerol como fuente de carbono para la acumulación de lípidos (Papanikolaou *et al.*, 2002). Con el desarrollo de las producciones de biodiesel a gran escala, el glicerol crudo puede ser considerado como sustrato modelo para la producción de aceite unicelular.

En el medio conteniendo glicerol la cepa 37 acumuló el mayor contenido de lípidos con un valor de 56 % (rendimiento de biomasa de 0,04y 22,6mg TAG/g sustrato), valores muy similares a los obtenidos por las cepas 30 A y 74, con valores de 49,84 % (rendimiento de biomasa de 0,09y 44,9mg TAG/g sustrato) y 49,72 % de lípidos (rendimiento de biomasa 0,04y 19,9mg TAG/g sustrato), respectivamente. En los tres casos las cepas fueron capaces de crecer significativamente empleando glicerol como única fuente de carbono. Easterling *et al.* (2009) informaron que las levaduras oleaginosas tienen la capacidad de crecer y acumular lípidos cuando se cultivan en glicerol y tienen tiempos de generación cortos, y requerimientos de nutrientes muy mínimos. Por lo tanto, usar el glicerol crudo para producir aceites de levaduras como materia prima para obtención de biodiesel proporcionaría una ventaja adicional de compensar los costos de producción.

Las cepas 30 A y 74 se escogieron para realizar el otro ensayo considerando sus niveles de acumulación de lípidos y el rendimiento de biomasa, pues en un período de fermentación de 70 horas, fueron capaces de acumular más del 30 % de lípidos en su biomasa, resultado que concuerda además con el valor de concentración de biomasa obtenido en las cepas (Tablas 1 y 2), lo cual es satisfactorio ya que muestra que las cepas lograron adaptarse rápidamente a las condiciones aportadas por los medios evaluados, y hasta ese tiempo de fermentación, se lograron acumular cantidades significativas de lípidos.

3.2 Evaluación de la influencia de la fuente de carbono sobre la acumulación de triacilglicéridos en las levaduras seleccionadas

Para cualquier microorganismo, una eficiente producción de biomasa y de los metabolitos de interés depende en gran medida de las fuentes de nutrientes, su composición y un adecuado balance entre estas fuentes. La relación molar carbono-nitrógeno (C/N) es un factor importante. Aunque la relación C/N de la biomasa fúngica es alrededor de 20/1 (Wallander *et al.*, 2003), se ha encontrado que el valor óptimo de esta relación en los medios de cultivo usados para su crecimiento es específico para cada especie y, en general, es superior al valor presente en la biomasa. Para que las fuentes de nitrógeno, fósforo y carbono presentes en el sustrato sean aprovechados por la levadura se requiere que se encuentren en forma asimilable (Fajardo y Sarmiento, 2007).

La magnitud acumulativa de grasas está en dependencia de condiciones de cultivo tales como el sustrato empleado, disponibilidad de nutrientes y tiempo de incubación y es necesario mantener un control de ellas (Chatzifragkou, *et al.*, 2011), por ende en nuestro estudio formulamos varios medios, que incluían azúcares (monosacáridos, disacáridos y

pentosa) y glicerol, con alta concentración de la fuente de carbono, y baja concentración de nitrógeno, con una relación C/N de 60:1 (Chang *et al.*, 2011).

Según los resultados obtenidos, ambas cepas fueron capaces de crecer en las seis fuentes de carbono evaluadas: glucosa, glicerol, lactosa, sacarosa, xilosa, xilosa + glucosa. Las tablas 3 a la 8 muestran los valores obtenidos de concentración celular (mg/ml), rendimiento de biomasa, producción de biomasa (mg TAG/g sustrato) y acumulación de lípidos (%) en las cepas de levaduras para las diferentes fuentes de carbono evaluadas y en diferentes períodos de tiempo.

Tabla 3. Efecto de la fuente de carbono glucosa y la relación C/N 60:1 en la acumulación de lípidos en las cepas seleccionadas

Cepas	Tiempo (horas)	C cel (mg/ml)	% TAG	TAG (mg/ml)	Yx/s	Yp/s	Yp/s (mg TAG/g sustrato)
30	24		22,5 ± 14,9	113,5 ± 58,4		0,09 ± 0,04	91,93 ± 38,13
	48		8,9 ± 2,8	46,3 ± 8,9		0,04 ± 0,01	38,27 ± 5,10
	72	5,35 ± 0,76	15,4 ± 4,0	81,6 ± 21,6	0,45 ± 0,10	0,07 ± 0,02	68,46 ± 21,05
74	24		15,5 ± 1,5	39,2 ± 3,7		0,09 ± 0,04	87,78 ± 38,66
	48		10,5 ± 3,4	26,5 ± 8,5		0,06 ± 0,04	63,74 ± 41,03
	72	2,5 ± 0,01	14,6 ± 0,4	36,7 ± 1,1	0,56 ± 0,21	0,08 ± 0,03	80,69 ± 30,09

Se muestran los valores promedios de cuatro repeticiones ± desviación estándar

Tabla 4. Efecto de la fuente de carbono glicerol y la relación C/N 60:1 en la acumulación de lípidos en las cepas seleccionadas

Cepas	Tiempo (horas)	C cel (mg/ml)	% TAG	TAG (mg/ml)	Yx/s	Yp/s	Yp/s (mg TAG/g sustrato)
30	24		5,6 ± 1,6	27,4 ± 8,0		0,01 ± 0	5,61 ± 1,61
	48		7,3 ± 2,6	35,4 ± 12,2		0,01 ± 1	7,31 ± 2,56
	72	4,87 ± 0,07	12 ± 1,8	58,1 ± 9,6	0,10 ± 0	0,01 ± 0	11,97 ± 1,84
74	24		16,4 ± 6,2	12,8 ± 4,7		0,003 ± 0,001	3,27 ± 1,25
	48		3,2 ± 1,9	2,5 ± 1,6		0,001 ± 0,00	0,65 ± 0,39
	72	0,78 ± 0,02	13,8 ± 2,4	10,8 ± 2,1	0,02 ± 1	0,002 ± 0,00	2,75 ± 0,47

Se muestran los valores promedios de cuatro repeticiones ± desviación estándar

Tabla 5. Efecto de la fuente de carbono lactosa y la relación C/N 60:1 en la acumulación de lípidos en las cepas seleccionadas

Cepas	Tiempo (horas)	C cel (mg/ml)	% TAG	TAG (mg/ml)	Yx/s	Yp/s	Yp/s (mg TAG/g sustrato)
30	24		10,0 ± 1,7	16,7 ± 3,0		0,05 ± 0,02	54,34 ± 21,14
	48		11,7 ± 2,4	13,8 ± 7,8		0,07 ± 0,04	74,52 ± 38,67
	72	1,67 ± 0,04	14,7 ± 5,0	24,3 ± 7,9	0,63 ± 0,25	0,10 ± 0,06	96,13 ± 61,05
74	24		14,3 ± 2,6	22,43 ± 4,44		0,05 ± 0,02	45,00 ± 15,93
	48		16,3 ± 4,3	25,76 ± 5,26		0,05 ± 0,002	53,00 ± 1,79
	72	1,57 ± 0,08	11,3 ± 0,7	17,8 ± 0,9	0,32 ± 0,09	0,04 ± 0,01	35,40 ± 8,68

Se muestran los valores promedios de cuatro repeticiones ± desviación estándar

Tabla 6. Efecto de la fuente de carbono sacarosa y la relación C/N 60:1 en la acumulación de lípidos en las cepas seleccionadas

Cepas	Tiempo (horas)	Ccel (mg/ml)	% TAG	TAG (mg/ml)	Yx/s	Yp/s	Yp/s (mg TAG/g sustrato)
30	24		13,8 ± 1,9	66,12 ± 13,11		0,05 ± 0,01	47,08 ± 9,39
	48		17,7 ± 4,7	83,25 ± 11,90		0,06 ± 0,01	59,26 ± 8,36
	72	4,78 ± 0,48	17,8 ± 2,3	84,63 ± 9,75	0,34 ± 0,03	0,06 ± 0,01	60,25 ± 6,97
74	24		13,5 ± 2,1	30,84 ± 5,13		0,16 ± 0,03	159,58 ± 26,51
	48		12,9 ± 0,5	29,35 ± 1,48		0,15 ± 0,01	151,88 ± 7,59
	72	2,28 ± 0,02	12,8 ± 2,1	29,29 ± 5,06	1,18 ± 0,01	0,15 ± 0,03	151,57 ± 26,14

Tabla 7. Efecto de la fuente de carbono xilosa y la relación C/N 60:1 en la acumulación de lípidos en las cepas seleccionadas

Cepas	Tiempo (horas)	Ccel (mg/ml)	% TAG	TAG (mg/ml)	Yx/s	Yp/s	Yp/s (mg TAG/g sustrato)
30	24		31,4 ± 14,5	93,70 ± 37,77		0,03 ± 0,01	26,18 ± 10,12
	48		7,8 ± 3,3	26,57 ± 5,87		0,01 ± 0,003	6,60 ± 2,65
	72	3,03 ± 0,20	13,3 ± 3,1	40,23 ± 9,88	0,09 ± 0,01	0,01 ± 0,003	11,29 ± 2,84
74	24		11,8 ± 2,6	20,47 ± 5,52		0,01 ± 0	5,90 ± 1,32
	48		10,3 ± 5,0	17,39 ± 7,73		0,01 ± 0,003	5,15 ± 2,52
	72	1,72 ± 0,09	17,0 ± 4,0	28,94 ± 5,37	0,05 ± 0	0,01 ± 0,002	8,49 ± 2,01

Se muestran los valores promedios de cuatro repeticiones ± desviación estándar

Tabla 8 Efecto de la fuente de carbono xilosa + glucosa y la relación C/N 60:1 en la acumulación de lípidos en las cepas seleccionadas

Cepas	Tiempo (horas)	Ccel (mg/ml)	% TAG	TAG (mg/ml)	Yx/s	Yp/s	Yp/s (mg TAG/g sustrato)
30	24		13,5 ± 5,7	46,06 ± 20,39		0,01 ± 0,01	12,19 ± 5,19
	48		8,5 ± 1,6	28,77 ± 5,56		0,01 ± 0,001	7,65 ± 1,44
	72	3,39 ± 0,11	14,3 ± 1,3	48,23 ± 2,70	0,09 ± 0	0,01 ± 0,001	12,85 ± 1,13
74	24		10,8 ± 2,4	20,98 ± 4,44		0,01 ± 0	5,42 ± 1,21
	48		9,5 ± 2,2	18,36 ± 4,02		0,00	4,74 ± 1,09
	72	1,94 ± 0,02	16,7 ± 0,6	32,36 ± 0,89	0,05 ± 0	0,01 ± 0	8,34 ± 0,32

Se muestran los valores promedios de cuatro repeticiones ± desviación estándar

En estos microorganismos los lípidos son acumulados intracelularmente y durante el metabolismo secundario, en condiciones limitadas de un nutriente importante para el crecimiento como el nitrógeno, magnesio, fósforo, hierro o zinc, y en presencia de altas concentraciones de carbono (Murphy, 1991), por ende es importante alcanzar un buen crecimiento del microorganismo para que a su vez, se logren acumular grandes cantidades de grasas (Soria, 2014).

Para los rendimientos de lípidos con respecto al consumo de la fuente de carbono, la mayor producción de TAG en la cepa 30 A, se obtuvo en glucosa (91,93 ± 38,13 mg TAG/g) seguida de lactosa (54,34 ± 21,14mg TAG/g),sacarosa (47,08 ± 9,39mg TAG /g), xilosa (26,18 ± 10,12mg TAG/g), xilosa + glucosa (12,19 ± 5,19mg TAG/g) y glicerol (5,61 ± 1,61mg TAG/g) en un período de cultivo de 24 horas. Estos valores fueron disminuyendo paulatinamente en el tiempo, excepto en las fuentes lactosa (96,13 ± 61,05mg TAG/g), sacarosa (60,25 ± 6,97mg TAG/g) y glicerol (11,97 ± 1,84mg TAG/g) que se apreció un aumento aunque no muy significativo a las 72 h de fermentación. Este comportamiento fue diferente en la cepa 74, donde la producción de biomasa más alta fue en sacarosa (159,58 ± 26,51mg TAG/g), luego glucosa (87,78 ± 38,66mg TAG/g), lactosa (45,00 ± 15,93mg TAG/g), xilosa (5,90 ± 1,32mg TAG/g), xilosa + glucosa (5,42 ± 1,21mg TAG/g) y glicerol (3,27 ± 1,25mg TAG/g).

En cuanto a la producción de lípidos (mg/ml), en esta misma cepa(30 A), a las 24 horas del cultivo, el valor más alto se obtuvo en glucosa (113,5 ± 58,4), seguida de xilosa (93,70 ± 37,77), sacarosa (66,12 ± 13,11), xilosa + glucosa (46,06 ± 20,39), glicerol (27,4 ± 8,0) y lactosa (16,7 ± 3,0). En la cepa 74 la mayor producción de lípidos se obtuvo empleando como fuente de carbono glucosa (39,2 ± 3,7), seguida de sacarosa (30,84 ± 5,13), lactosa (22,43 ± 4,44), xilosa + glucosa (20,98 ± 4,44), xilosa (20,47 ± 5,52) y glicerol (12,8 ± 4,7).

El mayor porcentaje de lípidos (%) acumulado por la cepa 30 A, se obtuvo en medio xilosa ($31,4 \pm 14,5$), luego, glucosa ($22,5 \pm 14,9$), sacarosa ($13,8 \pm 1,9$), xilosa + glucosa ($13,5 \pm 5,7$), lactosa ($10,0 \pm 1,7$) y glicerol ($5,6 \pm 1,6$). En cuanto a la cepa 74, el mayor valor se logró en el medio glicerol ($16,4 \pm 6,2$), luego glucosa ($15,5 \pm 1,5$), lactosa ($14,3 \pm 2,6$), sacarosa ($13,5 \pm 2,1$), xilosa ($11,8 \pm 2,6$), xilosa + glucosa ($10,8 \pm 2,4$).

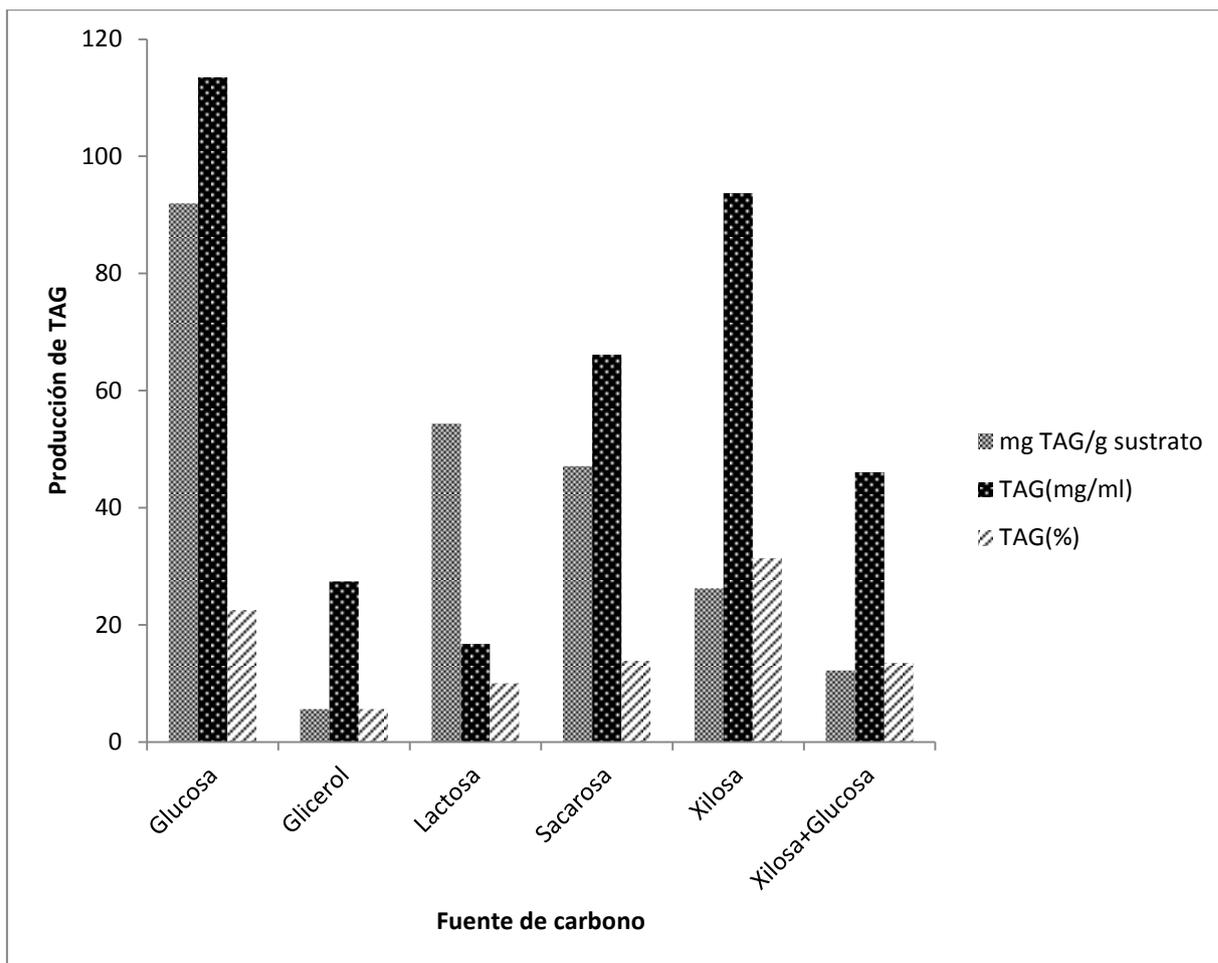


Figura 1. Producción de TAG en la cepa 30 A según la influencia de la fuente de carbono y relación C/N 60:1 (24 horas de cultivo)

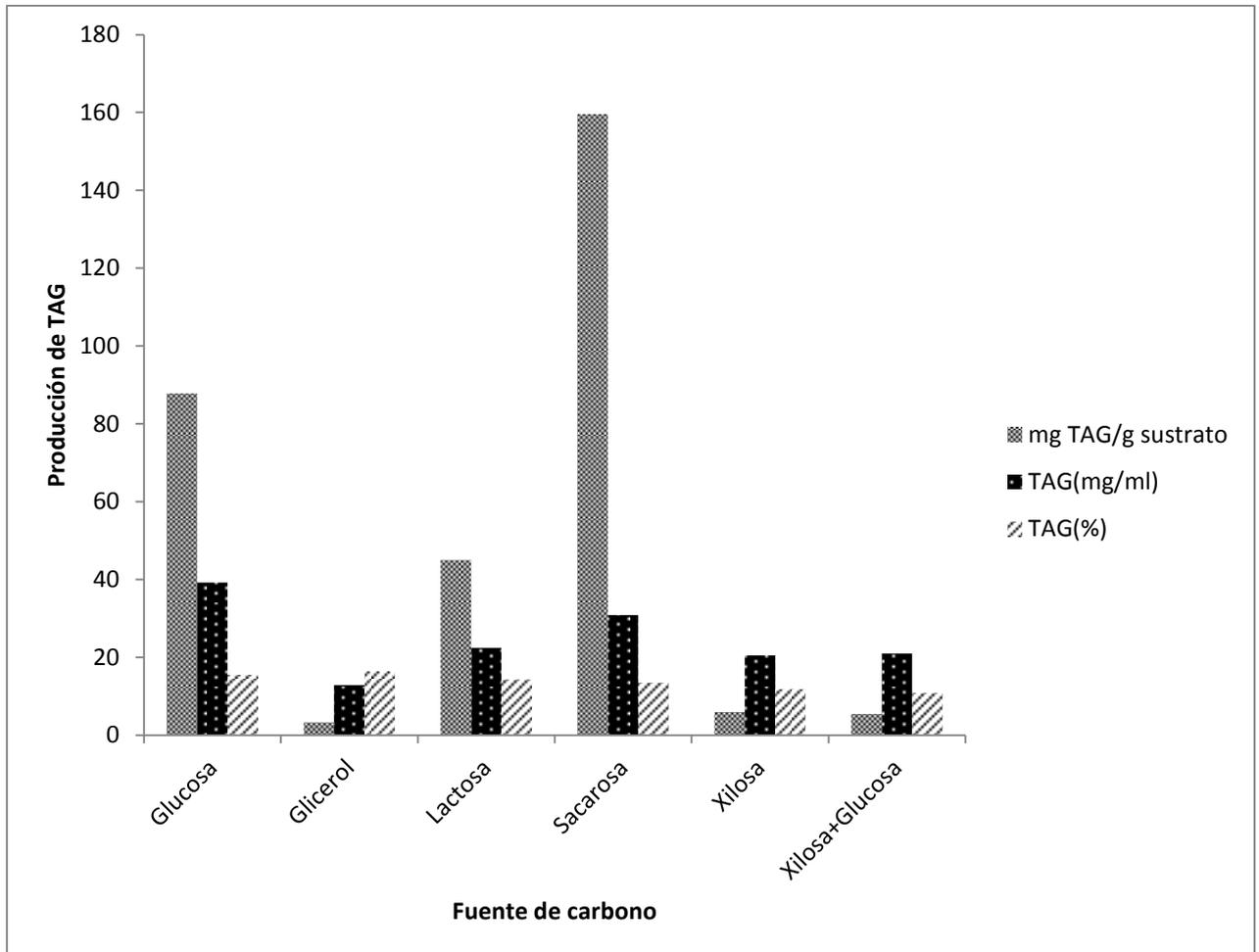


Figura 2. Producción de TAG en la cepa 74 según la influencia de la fuente de carbono y relación C/N 60:1 (24 horas de cultivo)

Estos valores son similares a los obtenidos por Vyas y Chhabra (2016), en un estudio realizado con *Cystobasidium oligophagum*, empleando como fuentes de carbono glucosa, fructosa, xilosa, lactosa, glicerol, carboximetilcelulosa, almidón, maltosa y sacarosa, con una concentración de la fuente de carbono de 40 g/l, obteniendo una mayor producción de biomasa en glucosa ($12,45 \pm 0,97$ g/l), y la mayor producción de lípidos (g/l) en glucosa ($4,91 \pm 0,52$ g/l) seguida de xilosa ($4,02 \pm 0,32$ g/l), de acuerdo al porcentaje lipídico acumulado en glucosa y xilosa obtuvieron valores de $39,44 \pm 1,19\%$ y $36,24 \pm 1,09\%$, respectivamente.

En medio xilosa se obtuvo un nivel significativo de acumulación de lípidos. Téllez-Luis *et al.*(2002), comentan en su estudio el interés de usar xilosa como fuente de carbono para el cultivo de levaduras, específicamente a partir de hidrolizados lignocelulósicos de materia primas baratas, en vez de usar xilosa comercial. La xilosa constituye además otra interesante alternativa, siendo producida durante el tratamiento de hidrólisis con ácido diluido de la biomasa lignocelulósica. Se ha sugerido que este residual se emplee para la producción de AUC por levaduras; pudiéndose emplear este aceite como combustible. Se ha planteado que la xilosa puede ser más eficiente que la glucosa en términos de rendimiento de aceite (Lee, *et al.*, 1999). Además de su abundancia, la xilosa puede ser considerada como sustrato modelo para la producción de AUC, ya que la vía involucrada en su asimilación es diferente a las vías de asimilación de glucosa, que es el mejor sustrato estudiado para la producción de estas grasas microbianas (Mu, *et al.*, 2006, Rymowicz, *et al.*, 2007, Papanikolaou, *et al.*, 2008).

Sin embargo, la cepa 74 no fue capaz de acumular un porcentaje lipídico significativo asociado al medio xilosa, resultado que puede estar asociado al lento crecimiento de la cepa en dicho medio debido a una limitada producción de ATP, pues durante la fermentación con xilosa, los requerimientos energéticos para su transporte y fosforilación son mayores en comparación con glucosa. La glucosa es transportada y posteriormente fosforilada por el sistema de la fosfotransferasa (PTS), utilizando para ello, un enlace fosfato proveniente del fosfoenolpiruvato de alto contenido energético (Postma *et al.*, 1996).

En el caso de xilosa es transportada por un simporte de protones o un sistema dependiente de ATP y posteriormente es fosforilada por un quinasa intracelular dependiente de ATP (Fraenkel, 1996; Lin, 1996; Underwood *et al.*, 2002). De esta manera, para la producción de una molécula glucosa-6-fosfato se requiere de un solo enlace fosfato de alto contenido energético, mientras que para xilosa-fosfato, el requerimiento es de 2 enlaces fosfato de alto contenido energético, por lo cual el rendimiento neto de la conversión de glucosa a piruvato es de 2 ATP, mientras que para xilosa es ~0.67 ATP (Tao *et al.*, 2001; Underwood *et al.*, 2002). Lo anterior se ve reflejado directamente en el crecimiento celular observado.

Cuando se utilizaron monosacáridos como sustrato para la fermentación, el crecimiento fue más rápido. La síntesis de AUC comienza inmediatamente que la fuente de nitrógeno sea limitante para el crecimiento. Sin embargo, cuando estos monosacáridos se encuentran asociados en polímeros complejos, el crecimiento es más lento debido a que depende de la síntesis de enzimas hidrolíticas que degraden estos polímeros en azúcares asimilables.

Un crecimiento lento determina que la utilización del sustrato sea más lenta, y las condiciones de limitación de nutrientes aparezcan a un mayor tiempo de incubación, lo cual hace que la oleaginosis se retarde y ocurra a un tiempo de fermentación más largo.

Si la fuente de carbono asimilable alcanza niveles muy bajos, el microorganismo no podrá acumular grasas y usará entonces los lípidos acumulados como sustrato, debido a que el carbono disponible en el medio no satisface sus requerimientos metabólicos (Holdsworth y Ratledge, 1988; André *et al.*, 2010). La definición del período donde el carbono asimilable alcanza niveles muy bajos y el AUC comienza a utilizarse como sustrato es muy importante para el aprovechamiento industrial de los aceites microbianos. La degradación de las grasas de reserva puede ser inhibida mediante la modificación genética del microorganismo (Mlicková *et al.*, 2004; Papanikolaou *et al.*, 2004).

Los resultados obtenidos en nuestro estudio para la mezcla xilosa + glucosa, corroboran lo planteado por Huang *et al.* (2013). Pocos microorganismos oleaginosos son capaces de crecer en biomasa lignocelulósica, por lo que la mayoría de los estudios se han enfocado en la oleaginosis a partir de hidrolizados lignocelulósicos posterior a una hidrólisis físico-química o pretratamiento enzimático. Incluso posterior a hidrólisis, muy pocos microorganismos oleaginosos pueden utilizar la xilosa para producir AUC, y este azúcar después de la glucosa es el monosacárido más abundante en los hidrolizados lignocelulósicos (Huang *et al.*, 2013).

En nuestro estudio no se lograron resultados satisfactorios de acumulación de lípidos empleando como fuente de carbono el medio " hidrolizado lignocelulósico ", la causa puede estar relacionada con los procesos metabólicos que tienen lugar en la célula cuando se utilizan dos o más fuentes de carbono en el medio. Estas son consumidas subsecuentemente, presentándose varias fases de crecimiento exponencial en el microorganismo, las cuales están separadas por fases de adaptación, lo cual comúnmente es denominado crecimiento diáuxico. El consumo de cada una de las fuentes de carbono está generalmente sujeto a represión catabólica por glucosa. Es decir que la glucosa es metabolizada primeramente y el (los) otro (s) azúcar (res) es (son) metabolizado (s) una vez que la glucosa se agota. Debido a esto, las mezclas de azúcares no pueden ser metabolizadas de manera rápida y eficiente (Hernández-Montalvo, *et al.*, 2001). La represión catabólica es un mecanismo de regulación por el cual la célula coordina el metabolismo de las fuentes de carbono y energía para maximizar su eficiencia y regular otros procesos metabólicos.

La composición usada en el hidrolizado lignocelulósico "fue la reportada en la literatura según la composición de los hidrolizados lignocelulósicos realizados con ácidos diluidos, como pretratamiento para su posterior tratamiento con enzimas celulolíticas (Chang *et al.*, 2011).

La disminución del contenido de nitrógeno en el medio es una de las condiciones más importantes para inducir la acumulación de lípidos. La oleaginosidad comienza cuando un elemento del medio se vuelve limitante y la fuente de carbono está en exceso. Muchos elementos pueden inducir la acumulación de lípidos, pero la limitación de nitrógeno es la más conocida (Papanikolaou y Aggelis, 2003). Durante el crecimiento, el carbono asimilado tiene como destino final principalmente alguna de las cuatro macromoléculas estructurales (carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos y proteínas). El nitrógeno es un componente esencial para la síntesis de proteínas y las bases nitrogenadas de los ácidos nucleicos, necesarios para la proliferación celular. Bajo condiciones limitadas de nitrógeno, estos procesos se hacen lentos y el carbono acumulado es desviado a la lipogénesis y se utiliza para acumular ácidos grasos de reserva.

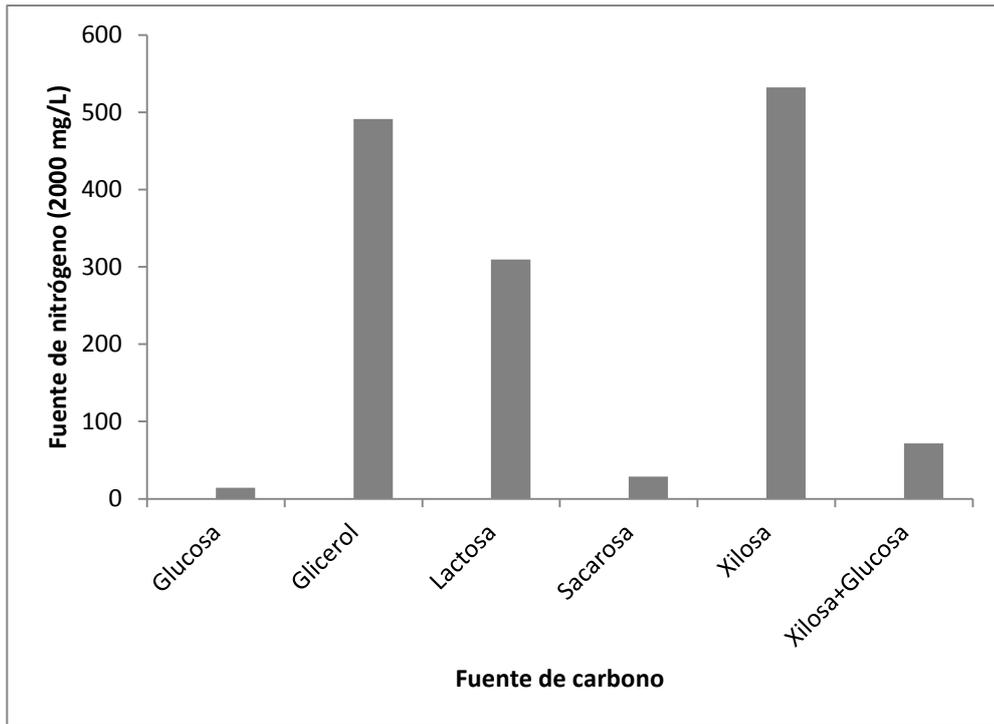


Figura3. Consumo de la fuente de nitrógeno por la cepa 30 A en las fuentes de carbono evaluadas (24 horas de cultivo).

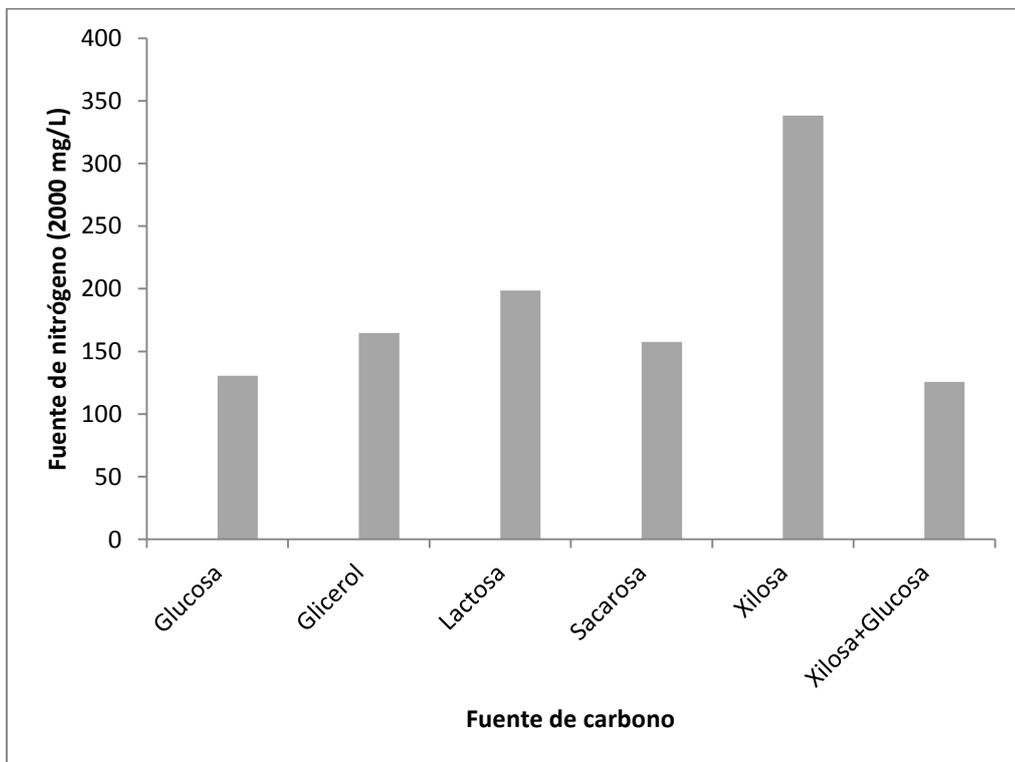


Figura 4. Consumo de la fuente de nitrógeno por la cepa 74 en las fuentes de carbono evaluadas (24 horas de cultivo)

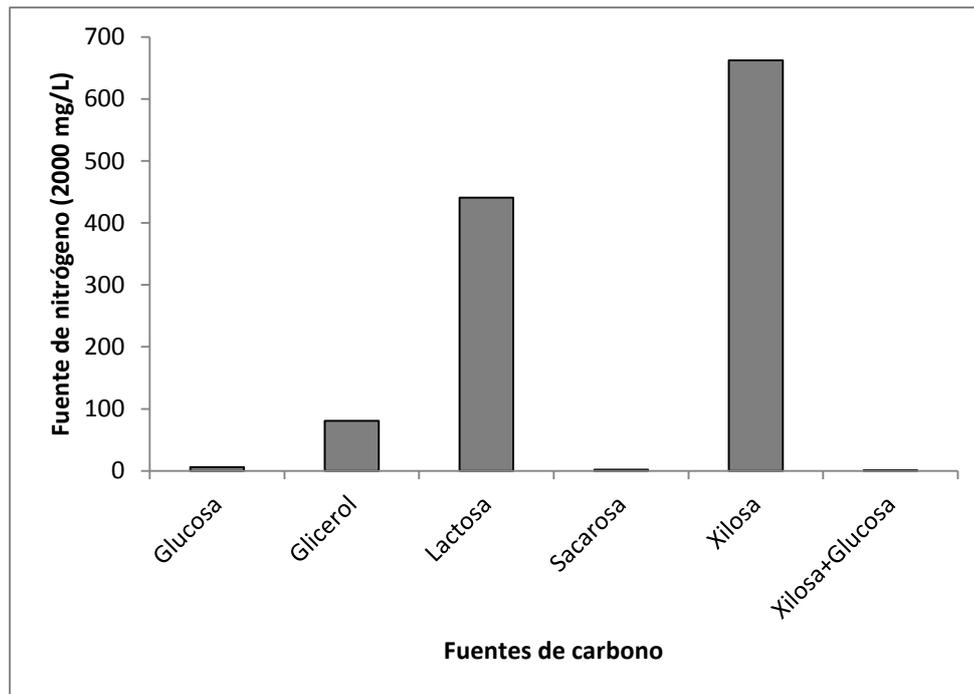


Figura 5. Consumo de la fuente de nitrógeno por la cepa 30 A en las fuentes de carbono evaluadas (72 horas de cultivo).

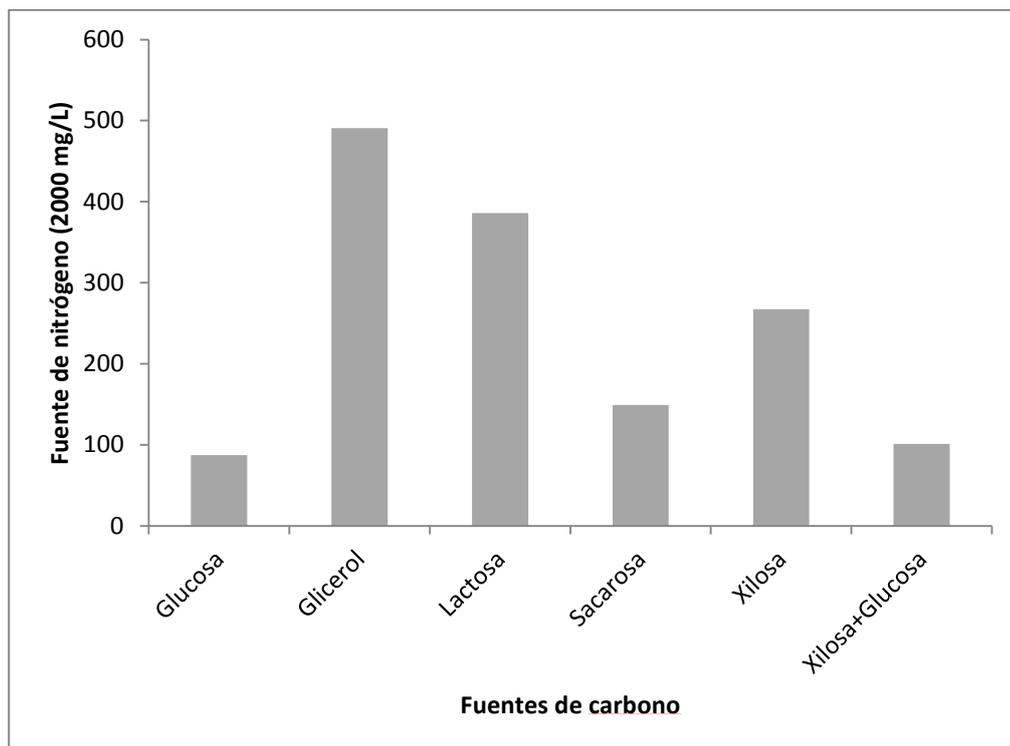


Figura 6. Consumo de la fuente de nitrógeno por la cepa 74 en las fuentes de carbono evaluadas (72 horas de cultivo).

La fuente de nitrógeno, específicamente en la cepa 30 A, en medios glucosa y sacarosa, a las 24 horas estaba casi agotada (Figuras 3 y 5), por lo que se puede predecir que este agotamiento afectó funciones metabólicas en estos microorganismos muy vinculadas a la síntesis de lípidos, apreciándose la disminución en los valores de porcentajes de lípidos en horas posteriores (Tablas 1 a la 8). Sin embargo, la cepa 74, consumió muy poco la fuente de nitrógeno existente en el medio (Figuras 4 y 6), por lo que no logró acumular un gran porcentaje de lípidos en su biomasa, pudiésemos relacionar este hecho con el tiempo de fermentación ensayado para esta cepa, quizás no fue suficiente para el consumo total de la fuente de carbono, presentes en cada uno de los medios, afectándose el crecimiento celular y la producción de biomasa y, los cuales pudieron ser mayores, pues en las horas posteriores del cultivo es apreciable un ligero aumento en la acumulación de lípidos en algunas fuentes. Por otro lado, la alta concentración de azúcares en el medio, pudiese ser otra de las causas que tuvo lugar en la limitación del crecimiento celular.

El proceso de acumulación de lípidos depende además de la fisiología del microorganismo, y las condiciones físicas del medio. Teniendo en cuenta que las cepas y la concentración de los medios utilizados en la investigación fueron distintas en todos los experimentos, la variación en la acumulación de grasas se debió a las condiciones físicas específicas de cada medio y a las vías involucradas para su asimilación.

Es posible considerar que a una relación de 60:1 la deficiencia de nitrógeno en el medio fuese muy severa para las cepas en estudio y que este fenómeno afectara la viabilidad celular, específicamente, por la afectación de proteínas con funciones esenciales en el metabolismo, lo cual perjudicó la ruta metabólica para la acumulación de grasas.

En un estudio realizado por Chang *et al.* (2011) se muestra la afectación crítica del potencial oleaginoso por la relación C/N del cultivo y otros factores como aireación, y presencia de sal inorgánica (Moreten, 1988). Sus resultados indicaron que la acumulación de lípidos en cada cepa de levadura estudiada disminuyó notablemente a medida que aumentaba la fuente de carbono. Comprobaron que 0,5 % de fuente de nitrógeno (extracto de levadura y peptona) en el medio de cultivo podría ser excesivo para la producción óptima de lípidos. Por lo tanto, para aumentar la acumulación de lípidos cambiaron la relación C/N por una concentración creciente de glucosa o reduciendo los niveles de fuente de nitrógeno. Los resultados mostraron que las mayores concentraciones (0.5% y 1.0%) de fuente de nitrógeno en el medio de cultivo limitó el crecimiento celular en comparación con los otros dos (0,1% y 0,2%), y redujo significativamente la producción de lípidos. Por el contrario, la baja fuente de nitrógeno (0,1%) en medio no afectó significativamente a la

masa celular, pero sí limitó la acumulación de lípidos. Resultados comparables a los nuestros.

Además, cuando la concentración inicial de glucosa, en su estudio, aumentó de 2% a 4% y a una concentración de nitrógeno del 0,2%, el contenido de biomasa y lípidos aumentó de 7,9 y 133,4 mg/g a 10,1 y 600,4 mg/g, respectivamente. Cuando la concentración del sustrato alcanzó 10%, la biomasa y la producción de lípidos se redujeron considerablemente a 7,9 y 412,2 mg/g, respectivamente, lo que sugiere que se había producido un considerable efecto inhibitorio. Una de las cepas evaluadas de *Cryptococcus* sp. SM5S05 acumuló gran cantidad de lípidos (alrededor del 60%) en los cultivos cuando se incubó esta cepa en el medio que contiene 0,2% de fuente de nitrógeno, las cantidades de biomasa celular y los lípidos acumulados fueron los más altos en comparación con los medios con otras proporciones de nitrógeno en el mismo nivel de glucosa.

Concluyeron que, excepto por el medio con 2% de glucosa, esta fórmula podría no satisfacer el requisito mínimo de carbono/fuente de nitrógeno. Por tanto sugieren un medio de cultivo para la producción de lípidos con una fuente de nitrógeno al 0,2 % y una glucosa del 4 % al 6 %. Demostrando que la acumulación de lípidos dependió de la relación C/N. El valor lipídico más alto se obtuvo en una relación C/N de 60-90 y una concentración de nitrógeno de 0,2% (60 – 57% de lípidos), mientras que a una relación C/N mayor de 150 sólo se acumuló el 41%. Sin embargo, existe un límite en el efecto crítico de las concentraciones de nitrógeno y el contenido de lípidos acumulado. Sin embargo el contenido de lípidos disminuyó hasta menos del 28% cuando las concentraciones de nitrógeno fueron mayores o menores que 0,2%.

Normalmente, en una alta relación C/N (> 50) la fuente de nitrógeno se agota rápidamente y el exceso de nutrientes continúa siendo absorbido por las células convirtiéndose en TAG para su almacenamiento. Con el agotamiento del nitrógeno, sin embargo, la propagación celular podría afectarse significativamente y da lugar a la disminución de la densidad celular. Se plantea la realización de nuevos estudios que incluyan otros sustratos y composición del medio de cultivo para lograr una acumulación significativa de los lípidos (Hassan, *et al.*, 1996; Meesters, *et al.*, 1996)

Otros estudios comparables, son los realizados con la especie oleaginosa *Rhodotorula minuta*, donde se observó que un aumento de la relación C/N de 17 a 30 aumentó la conversión de glucosa a lípidos de 0,25 a 0,48 moles de lípidos/mol de glucosa; sin embargo, cuando C/N alcanzó un valor de 40, la conversión disminuyó a 0,33, por lo que concluyen que una deficiencia de nitrógeno muy severa causó un rápido decrecimiento de la viabilidad celular antes de que las células fueran capaces de comenzar la acumulación

de lípidos (Saxena *et al.*, 1998). Un similar decrecimiento de la acumulación de grasas se reportó para *Cunninghamella echinulata* un C/N de 40 (Chen y Chang, 1996). Sin embargo, la sensibilidad a la deficiencia de nitrógeno varía según la especie, pues por ejemplo *Rhodotorula glutinis* aumentó la conversión de glucosa a lípidos de 0,25 a 0,45 moles de lípidos/mol de glucosa cuando la relación C/N del medio aumentó de 150 a 350 moles de glucosa/mol de nitrógeno y se observó la pérdida de la viabilidad celular cuando esta relación excedió los 350 (Granger, 1992).

3.3 Identificación taxonómica de las cepas de levaduras seleccionadas

La identificación taxonómica de las cepas de levaduras (Tabla 9) mostró la presencia de cuatro especies: *Rhodotorula glutinis*, *Cryptococcus curvatus*, *Candida fusiformata* y *Cryptococcus albidus*.

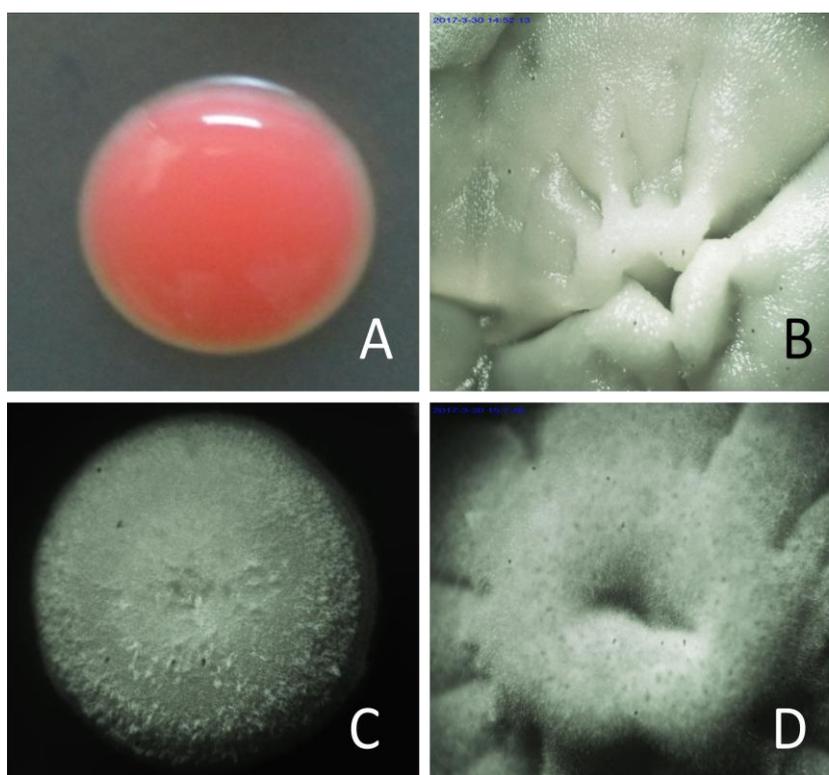


Figura 5. Especies de levaduras identificadas: *Rhodotorula glutinis* (A), *Cryptococcus curvatus* (B), *Candida fusiformata* (C) y *Cryptococcus albidus* (D).

Cryptococcus curvatus resultó ser una de las especies de levaduras identificadas a partir de su aislamiento de queso parmesano, con largos períodos de refrigeración (Lopandica,

2006). Según Kurtzman *et al.* (2011), Cocolin reporta a esta especie como una levadura asociada a la descomposición de alimentos, obteniéndose reportes de aislamientos de productos lácteos como el queso de yogurt y lechecruda.

Cryptococcus curvatus ha sido reportada por varios autores como una levadura oleaginosa, de gran interés industrial, capaz de asimilar varias fuentes de carbono, incluyendo residuos agrícolas (Evans y Ratledge, 1983).

Se han reportado niveles de acumulación de triacilglicéridos en la especie de 60% del peso seco de las células, lo que ha impulsado nuevos estudios para mejorar esta producción (Hassan *et al.*, 1996), y modificar genéticamente la biosíntesis de estos ácidos grasos (Meesters *et al.*, 1996). Se ha demostrado que esta levadura es capaz de utilizar celulosas y hemicelulosas para la producción de TAG, por lo que ha sido continuamente estudiada para la recuperación de residuos de trigo, que son 60% no comestibles y consisten en aproximadamente 90% de celulosas y hemicelulosas.

La producción de lípidos en *C. curvatus* puede ser inducida bajo condiciones de limitación de nitrógeno, y favorece la síntesis de ácidos grasos de cadena larga (C18). La alta utilidad de estos ácidos grasos para la producción de biocombustibles y otros productos de alto valor, junto con la capacidad de *C. curvatus* para crecer utilizando materias primas de bajo costo, lo convierte en un candidato potencial para uso en procesos de fermentación industrial. La secuencia genómica de *C. curvatus* proporciona un punto de comparación suplementario en relación con otras levaduras oleaginosas para elucidar los mecanismos genéticos subyacentes a los perfiles de síntesis de ácidos grasos y los controles metabólicos que rigen la promulgación del metabolismo oleaginoso.

En un estudio realizado por Siguo *et al.* (2003) demostraron que *C. curvatus* era capaz de sintetizar grandes cantidades de lípidos usando N-acetilglucosamina, llegando a acumular un 54 % de lípidos a diferentes condiciones de temperatura y concentraciones de la fuente de carbono.

En nuestro estudio pudimos obtener un nivel de acumulación lipídico en esta levadura de 49,72% utilizando como única fuente de carbono y energía glicerol. Con esto se puede tener en cuenta a la especie como alternativa para producir grandes cantidades de lípidos empleando glicerol que es un subproducto del biodiesel, lo que garantiza la disminución en el costo de la materia prima que se emplea y un valor agregado a este residual.

Cryptococcus albidus, otro de los aislados identificados, es una cepa de levadura, estudiada por varios autores por su capacidad oleaginosa, siendo capaz de sintetizar TAG intracelulares, bajo ciertas condiciones de cultivo, hasta en un 80% de su peso seco

utilizando diversas fuentes de carbono (azúcares, ácidos orgánicos, alcoholes y aceites entre otras) y diferentes subproductos y/o residuos industriales o agrícolas (suero de leche, hidrocarburos, aceites vegetales, melazas de caña de azúcar, salvado de trigo, desechos de frutas y verduras) (Maciel, 2009; Li *et al.*, 2009).

Las especie *Candida fusiformata* fue descrita por Buhagiar (1978). Las estructuras formadas por *C. fusiformata* surgen de células maduras de forma fusiforme, a menudo dispuestas en cadenas ramificadas. Sus células son alargadas o ligeramente redondas de 2-6 x 3-9 μm y se reproducen por gemación (blastoconidios). No se han reportado estudios sobre esta levadura en relación a la acumulación de lípidos, sin embargo en nuestra investigación logramos un porcentaje de acumulación lipídico de 36,65 % empleando como única fuente de carbono y energía glicerol.

El género *Rhodotorula* se divide en dos subgéneros *Rhodotorula* y *Flavotorulua*, división basada principalmente en los espectros de absorción de sus pigmentos. Este género ha sido estudiado debido a sus diversas aplicaciones a nivel comercial dado que los carotenoides presentes en este pueden tener beneficios para la salud de humanos y animales con actividades antioxidantes potentes, como el Beta-caroteno, que puede ser utilizado también como pigmento de grado alimenticio principalmente en productos provenientes de la acuicultura como pescados y mariscos (Libkind *et al.*, 2004).

Dentro de este género una de las especies más estudiadas es *Rhodotorula glutinis*, esta fue la primera cepa de *Rhodotorula* descrita en 1928 por Harrison, de la cual se han evaluado distintas condiciones de crecimiento y se encontró que puede acumular hasta un 49% de lípidos en relación a su biomasa a nivel de laboratorio, y hasta 60% a nivel de biorreactor cuando se le suministra glucosa como fuente de carbono y peptona como fuente de nitrógeno (Cuan-Chao *et al.*, 2007), además al utilizar esta cepa es posible utilizar productos de desecho para su desarrollo ya que se ha observado que es capaz de producir hasta un 20% de lípidos con respecto a su biomasa a partir de agua de desecho proveniente de la producción de glutamato monosódico a la cual se le añadió glucosa (Xue *et al.*, 2008).

El hecho de haber sido aislada esta cepa de queso corrobora lo planteado por Castro-Castillo *et al.* (2013) en su estudio, donde evidencian que dentro del grupo de levaduras analizadas de la microbiota nativa del queso Oaxaca tradicional en tres fases de elaboración, se observó la presencia predominante del género *Rhodotorula*, resultados que concuerdan con otros trabajos donde se reportan estas características levaduras rosadas o rojas.

En el Anexo 5, puede encontrarse una descripción de las características morfológicas y fisiológicas de cada uno de los aislados oleaginosos identificados.

Tabla 9. Identificación de las levaduras oleaginosas

Descripción	Identificación ^a
30 A	<i>Rhodotorula glutinis</i>
74	<i>Cryptococcus curvatus</i>
73	<i>Candida fusiformata</i>
37	<i>Cryptococcus albidus</i>

^a Según Barnett *et al.*, 1983

Un análisis detallado de las especies de levaduras identificadas (Tabla 9) puede ayudar a comprender la causa de la aparición del fenotipo oleaginoso en dichos microorganismos aislados de queso parmesano.

El queso de pasta dura o Parmesano (Hernández y Díaz, 2002) es un alimento rico en fósforo, vitamina B2, y está compuesto principalmente por proteínas y grasa, lo que lo convierte en un sustrato nutritivo para el desarrollo de microorganismos (Díaz-Rivero y González, 2001), especialmente levaduras, que poseen determinadas características que les permiten crecer y contaminar los productos lácteos al estar presentes en el ambiente agropecuario encontrándose en la leche, el microambiente de la quesería y temperaturas manejadas en el proceso de elaboración.

La maduración de los quesos es un proceso complejo que implica reacciones bioquímicas y pérdidas de humedad por evaporación. Estas reacciones incluyen procesos fermentativos, proteolíticos y lipolíticos principalmente, que desembocan en la formación de pequeñas moléculas a partir de las proteínas y grasas precursoras (Walstra *et al.*, 2001), por ende el crecimiento de levaduras en este alimento, entre otras causas, se ve positivamente influenciado por la presencia de lactosa residual no fermentada por las bacterias ácido lácticas (Frank, 1997).

Castro-Castillo *et al.* (2013) en un estudio realizado demostraron que las levaduras fueron el grupo microbiano predominante en las tres etapas analizadas del desarrollo de producción de queso, encontrándose los conteos más elevados en dicho alimento, resultado que les llamó la atención por ser un queso fresco; pues de acuerdo a varios

autores, es más común la prevalencia de levaduras en quesos artesanales madurados o con periodos prolongados de refrigeración (Lopandica, 2006) sin embargo, las levaduras poseen determinadas características que les permiten crecer y contaminar los productos lácteos al estar presentes en el ambiente agropecuario encontrándose en la leche, el microambiente de la quesería y temperaturas manejadas en el proceso de elaboración.

El hecho de obtener aislados de ambientes naturales oleaginosos nos garantiza obtener especies de levaduras autóctonas, candidatas para la producción de TAG (Hernández *et al.*, 2016), y corrobora lo obtenido en otros estudios acerca de la elevada producción de TAG en géneros como *Rhodotorula* y *Lipomyces*, que podrían acumular el 70% e incluso más de su biomasa como lípidos (Ratledge y Wilkinson, 1989) a partir de ambientes oleosos.

CONCLUSIONES

- La evaluación cuantitativa de la producción de lípidos mostró que siete de las cepas evaluadas fueron capaces de acumular más del 20% de lípidos, dos de ellas tanto en glucosa como en glicerol y uno de los aislados llegó a acumular el 56% de triacilglicéridos.
- De las fuentes de carbono evaluadas solo en glucosa y xilosa se logró acumular más del 20 % de lípidos por la cepa 30 A, acumulando en ese último un 31,4 % de triacilglicéridos
- La cepa 74 no fue capaz de acumular un porcentaje lipídico significativo en ninguna de las fuentes de carbono evaluadas con una relación C/N 60:1
- La identificación taxonómica de las cepas de levaduras mostró la presencia de cuatro especies oleaginosas: *Rhodotorula glutinis*, *Cryptococcus curvatus*, *Candida fusiformata* y *Cryptococcus albidus*.

RECOMENDACIONES

- Aislar microorganismos levaduriformes a partir de otros ambientes oleosos, como aceite residual
- Caracterizar el contenido de triacilglicéridos de acuerdo a su composición en ácidos grasos
- Desarrollar un medio de cultivo optimizado empleando como sustratos las fuentes descritas en el estudio y otras, incluyendo residuos lignocelulósicos
- Aumentar el tiempo de fermentación aplicado a las cepas en estudio
- Evaluar la obtención de biodiesel a partir del aceite unicelular de las levaduras identificadas mediante transesterificación, para determinar si cumple con los parámetros de calidad establecidos para este biocombustible.
- Los resultados obtenidos pueden ser aplicables en el contexto del desarrollo de fuentes alternativas y sostenibles para la obtención de grasas, evitando así la competencia aquellas tradicionalmente usadas en la alimentación humana y animal

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abril, A. (2008). Etanol a partir de biomasa lignocelulósica. Primer taller nacional de etanol celulósico, ICIDCA. Ciudad de La Habana, Cuba.

Altenbern, A.(1977). Cerulenin-Inhibited Cells of *Staphylococcus aureus* resume growth when supplemented with either a saturated or an unsaturated fatty acid. *Antimicrob Agents Chemother* 11(3). :574–576

André, A., Diamantopoulou, P., Philippoussis, A., Sarris, D., Komaitis, M., Papanikolaou, S. (2010). Biotechnological conversions of biodiesel derived waste glycerol into added value compounds by higher fungi: production of biomass, single cell oil and oxalic acid. *Ind Crops Prod*31: 407–416.

APHA (American Public Health Association) American Water Works, A. W. E. F. (1998). Standard methods for the examination of water and wastewater.20a ed. American Public Health Association, Washington, D.C.

Barnett, A., Payne, W., Yarrow, D. (1983). Yeasts: Characteristics and identification. Cambridge University Press.

Benjamin, S., Pandey, A. (2001). Isolation and characterization of three distinct forms of lipases from *Candida rugosa* produced in solid state fermentation. *Braz. Arch. Biol. Techn.* 44: 213-221.

Beopoulos, A., Cescut, J., Haddouche, R.,Uribelarrea, J., Molina, C., Nicaud, J. (2009). *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oilproduction. *Progress in Lipid Research* 48: 375-387.

Boekhout, T., Kurtzman, C. (1996). Principles and methods used in yeast classification, and an overview of currently accepted yeast genera. Nonconventional Yeasts in Biotechnology: *A Handbook*.Berling, Germany, 1-81.

Bondioli, P., Bella, L. (2005). An Alternative spectrophotometric method for the determination of free glycerol in biodiesel. *Eur. J. Lipid Sci. Technol* 107 153-157

Buhagiar, R. (1978). *Candida fusiformata* sp. nov., a New Yeast from Cabbages and Cauliflowers. *Journal of General Microbiology* 110:91-97.

Castro-Castillo, G., Martínez-Castañeda, E., Martínez-Campos, R., Espinoza-Ortega, A. (2013). Caracterización de la microbiota nativa del queso Oaxaca tradicional en tres fases de elaboración. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* 33:105-109.

Chang, Y., Chang, K., Jang, H., Hsu, C. (2011). Effect of carbon source and high C/N ratio in the cellulosic hydrolysate-based media on the crude lipid contents and unsaturated fatty acid compositions of yeasts. *International Association for Engineering and Food IAEF*.

Chatzifragkou, A., Fakas, S., Galiotou-Panayotou, M., Komaitis, M., Aggelis, G., y Papanikolaou, S. (2010). Commercial sugars as substrates for lipid accumulation in *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina* fungi. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 112: 1048-1057.

Chatzifragkou, A., Makri, A., Belka, A., Bellou, S., Mavrou, M., Mastoridou, M. (2011). Biotechnological conversions of biodiesel derived waste glycerol by yeast and fungalspecies. *Energy* 36: 1097-1108.

Chen, H., Chang, C. (1996). Production of γ -Linolenic Acid by the Fungus *Cunninghamella echinulata* CCRC 31840. *BiotechnolProg* 12: 338–341.

Chih-Hung, H., Wen-Teng, W. (2009). Cultivation of microalgae for oil production with a cultivation strategy of urea limitation. *Bioresource Technology*.

Chi, Z., Liu, G., Zhao, S., Li, J., Peng, Y. (2010). Marine yeasts as biocontrol agents and producers of bio-products. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86: 1227- 1241

Cuan-Chao, D., Jie, T., Feng, X., Yi-Jun, D., Mo, Z. (2007). Biodiesel generation from oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* with xylose assimilating capacity. *African Journal of Biotechnology*.6: 2130 – 2134.

Díaz-Rivero, C., González, B. (2001). *Staphylococcus aureus* en queso blanco fresco y su relación con diferentes microorganismos indicadores de calidad sanitaria. Revista Salud Pública y Nutrición, *RESPYN* 2(3).

Dubois, M.,Guilles, K., Hamilton, K.,Robers, A., Smith, F. (1956).Colorimetric methods for determination al sugar and related susbtances. *Anal Chem* 28, p.350-356.

Easterling, R., French, T., Hernandez, R., Licha, M. (2009). The effect of glycerol as a sole and secondary substrate on the growth and fatty acid composition of *Rhodotorulaglutinis*.*BioresourTechnol*100: 356–361.

El-Fadaly, A., El-Ahmady El-Naggar, N.,Marwan, M. (2009). Single Cell Oil production by an oleaginous yeast strain in a low cost cultivation medium. *Res J Microbiol*4: 301-313

Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C.,Uruburu, F.,Querol, A. (1999). Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8 rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers.*Intern Jour SystBacteriol* 49: 329-337.

Evans, T., Ratledge, C. (1983).A comparison of the oleaginous yeast, *Candida curvata*, grown on different carbon sources in continuous and batch culture. *Lipids*, 18, 623–629.

Evans, C., Ratledge, C. (1984). Influence of nitrogen metabolism on lipid accumulation by *Rhodospidium toruloides*. *Gen Microbiol* 130: 1705-1710.

Fajardo C., Sarmiento F., (2008). Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*. Pontificia Universidad Javeriana de Colombia. Facultad de Ciencias Básicas. *Microbiología Industrial*. Bogotá.

Fakas, S., Papanikolaou, S., Batsos, A., Galiotou, M., Mallouchos, A., Aggelis, G. (2009). Evaluating renewable carbon sources as substrates for single cell oil production by *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina*. *Biomass Bioenergy* 33: 573-578.

Fakas, S., Papanikolaou, S., Galiotou-Panayotou, M., Komaitis, M., Aggelis, G. (2008). Organic nitrogen of tomato waste hydrolysate enhances glucose uptake and lipid accumulation in *Cunninghamella echinulata*. *J. Appl. Microbiol* 105, 1062–1070.

Fernández-Espinar, T., Querol, A. (2000). Molecular characterization of yeasts strains by mitochondrial DNA restriction analysis. *Methods in Biotechnology*. New York, Humana Press Inc, 329-333.

Frank, F. (1997). Milk and dairy products. En: *Food Microbiology*. Fundamentals and Properties. ASM Press. Washington.

Fraenkel, G. (1996). Glycolysis: En *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and molecular biology. Eds. Neidhardt., American Society for Microbiology. Press Washington D.C. I: 189-198.

García, N. (2008). Producción de setas comestibles y enzimas lacasas por fermentación en estado sólido de la pulpa de café con *Pleurotus* spp. In: Centro de Estudios de Biotecnología Industrial. Santiago de Cuba: Universidad de Oriente. *Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias*.

Granger, L. (1992). Caractérisation cinétique et stoechiométrique de la synthèse d'acide gras chez *Rhodotorula glutinis*. Toulouse: Institut National des sciences appliquées de Toulouse p247.

Hansson, L., Dostfilek, M. (1986). Influence of cultivation conditions on lipid production by *Cryptococcus albidus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol* 24, 12–18.

Hassan, M., Blanc, J., Granger, M., Pareilleux, A., Goma, G. (1996). Influence of nitrogen and iron limitations on lipid production by *Cryptococcus curvatus* grown in batch and fed-batch culture. *Process Biochem* 31 (4). : 355-361(7).

Hata, T., Matsumae, A., Nomura, S., Kim, T., Ryan, K. (1960). Studies on cerulenin, a new antifungal antibiotic. II. Biological characteristic and therapeutic effect of cerulenin. *Jpn J Med Mycol* 1:382–383

Hernández, P., Díaz E. (2002). Elaboración de queso mozzarella a partir de leche de *Bubalus bubalis* (ganado bubalino). *Revista Amazónica de Investigación Alimentaria* 2(2). :19-30.

Hernández, A., Serrat, M., Alfonseca, A. (2016). Selección de levaduras oleaginosas con elevada capacidad de acumulación de triacilglicéridos. En: Centro de Estudios de Biotecnología Industrial. Santiago de Cuba: Universidad de Oriente. *Trabajo de curso II*, 38.

Hernández-Montalvo, V., Valle, F., Bolivar, F., Gosset, G. (2001). Characterization of sugar mixtures utilization by an *Escherichia coli* mutant devoid of the phosphotransferase system. *Appl Microbiol Biotechnol* 57 (1-2).

Holdsworth, J., Ratledge, C. (1988). Lipid turnover in oleaginous yeasts. *Gen Microbiol* 164: 339-346.

Huang, C., Chen, X., Xiong, L., Ma, L., Chen, Y. (2013). Single cell oil production from low-cost substrates: The possibility and potential of its industrialization. *Biotechnol Adv* 31: 129–139.

Izard, J., Limberger, J. (2003). Rapid screening method for quantitation of bacterial cell lipids from whole cells. *J Microbiol Methods* 55:411–418.

Kawaguchi, A., Tomoda, H., Nozoe, S., Omura, S., Okuda, S. (1982). Mechanism of action of cerulenin on fatty acid synthetase. Effect of cerulenin on iodoacetamide-induced malonyl-CoA decarboxylase activity. *JBiochem* 92 (1): 7–12.

Kong, L., Liu, B., Zhao, B., Feng, B. (2007). Microbial production of lipids by co-fermentation of glucose and xylose with *Lipomyces starkeyi*. *Chin J Bioprocess Eng* 5 (2) : 36-41.

Kurtzman, C., Fell, W., Boekhout, T. (2011). *The yeasts: a taxonomic study*. Elsevier.

Kurtzman, P., Mannarelli, M. (1998). Rapid identification of *Candida albicans* and other human pathogenic yeasts by using short oligonucleotides in a PCR. *J Clin Microbiol* 36: 1334-1641.

Lee, Y., Iyer, P., Torget, R. (1999). Dilute-acid hydrolysis of lignocellulosic biomass. *AdvBiochemEngBiotechnol* 65: 93-114.

Li, Q., Du, W., Liu, D. (2009). Perspectives of microbial oils for biodiesel production. *Appl Microbiology and Biotechnology*. 80:749–756.

Li, W., Du, W., Li, H., Liu, H., Zhao, B. (2007). Enzymatic transesterification of yeast oils for Biodiesel fuel production. *Chin J Process Eng* 7 (1) : 137-140.

Li, Y., Liu, B., Zhao, Z., y Bai, F. (2006). Optimized culture medium and fermentation conditions for lipid production by *Rhodospiridium toruloides*. *Chin J Biotechnol* 22 (4) : 650-656.

Li-Xia, P., Deng-Feng, Y., Li, S., Wei, L., Gui-Guang, C., Zhi-Qun, L. (2009). Isolation of the oleaginous yeasts from the soil and studies of their lipid producing capacities. *Food Technology and Biotechnology*. 47: 215-220

Libkind, D., Brizzio, S. (2004). *Rhodotorula mucilaginosa*, a carotenoid producing yeast strain from a Patagonian high altitude lake. *Folia Microbiology* 49: 19 – 25.

Lin, C. (1996). Dissimilatory pathways for sugars, polyols and carboxylates: En *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and molecular biology. Eds. Neidhardt, American Society for Microbiology. Press Washington D.C. I: 307-326.

Lopandica, K., Zelgerb, S., Bańszkyc, K., Eliskases-Lechner, F. (2006). Identification of yeasts associated with milk products using traditional and molecular techniques. *Food Microbiol* 23:341-50.

Makri, A., Fakas, S., Aggelis, G. (2010). Metabolic activities of biotechnological interest in *Yarrowia lipolytica* grown on glycerol in repeated batch cultures. *BioresourTechnol* 101, 2351–2358.

Maciel, Á. (2009). Biocombustibles: desarrollo histórico-tecnológico, mercados actuales y comercio internacional. *Economia.unam.mx*, 63-65.

Meesters, A., Huijberts, M., Egglink, G. (1996). High-cell-density cultivation of the lipid accumulating yeast *Cryptococcus curvatus* using glycerol as a carbon source. *Applied Microbiology and Biotechnology* 45, 575–579

Mendoza, I. (2010). Aislamiento y selección de hongos lipolíticos a partir de aceites vegetales de desecho (proveniente de frituras) utilizados en la elaboración de biodiesel. En: Facultad de Ciencias Biológicas Lima – Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. *Tesis para optar al título profesional de Biólogo con Mención en Microbiología y Parasitología*. 83.

Meng, X., Yang, J., Xu, X., Zhang, L., Nie, Q., Xian, M. (2009). Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renew Energy* 34: 1-5.

Mlicková, K., Luo, Y., Andrea, S. Pec, P., Chardot, T., Nicaud, J. (2004). Acyl-CoA oxidase, a key step for lipid accumulation in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Mol Catal B-Enzym* 28: 81-85.

Moreten, S. (1988). Physiology of lipid accumulation yeast. In: Moreton RS, editor. Single celloil. London: Longman, p. 1–32.

Morita, N., Nishida, T., Tanaka, M., Yano, Y., Okuyama, H. (2005). Enhancement of polyunsaturated fatty acid production by cerulenin treatment in polyunsaturated fatty acid-producing bacteria. *Biotechnol Lett* 27:389–393

Murphy, D. (1991). Storage lipid bodies in plants and other organisms. *Prog Lipid Res* 29: 299-324.

Nishiuchi, H., Tabira, Y., Yamagishi, K. (2012). A combination of flow cytometry and traditional screening using chemicals to isolate high glutathione-producing yeast mutants. *Biosci Biotechnol Biochem* 76(6):1085–1090

Orberá, T. (2004). Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico. *Rev Iberoam Micol* 21:15-9.

Papanikolaou, S., Aggelis, G. (2002). Lipid production by *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycerol in a single-stage continuous culture. *Bioresour Technol*, 82:43-49.

Papanikolaou, S., Aggelis G. (2003). Modeling lipid accumulation and degradation in *Yarrowia lipolytica* cultivated on industrial fats. *Curr Microbiol* 46: 398-402.

Papanikolaou, S., Galiotou-Panayotou, M., Fakas, S., Komaitis, M., Aggelis, G. (2007). Lipid production by oleaginous Mucorales cultivated on renewable carbon sources. *Eur J Lipid Sci Technol* 109:1060–1070.

Papanikolaou, S., Sarantou, S., Komaitis, M., Aggelis, G. (2004). Repression of reserve lipid turnover in *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina* cultivated in multiple-limited media. *Appl Microbiol* 97: 867-875.

Parrish, M., Kuhajda, P., Heine, S., Bishai, R., Dick, D. (1999). Antimycobacterial activity of cerulenin and its effects on lipid biosynthesis. *J Antimicrob Chemother* 43(2):219–22

Parsons, B., Frank, W., Subramanian, C., Saenkham, P., Rock, O. (2011). Metabolic basis for the differential susceptibility of Gram-positive pathogens to fatty acid synthesis inhibitors. *Proc Natl Acad Sci. USA* 108(37):15378–15383

Postma, W., Lengeler, W., Jacobson, R. (1996). Phosphoenolpyruvate: Carbohydrate phosphotransferase systems: En Escherichia coli and Salmonella. Cellular and molecular biology. Eds. Neidhardt., American Society for Microbiology. Press Washington D.C. I: 1149-1174

Ratledge, C. (2002). Regulation of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Biochemical Society Transactions* 30 (6). : 147-150.

Ratledge, C. (2004). Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. *Biochimie* 86: 807- 815.

Ratledge, C., Wilkinson, G. (1989). Microbial Lipids. *Academic Press*. London, UK

Ratledge, C., Wynn, J. (2002). The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *AdvApplMicrobio*51: 1-51.

Ravindra, A. (2000). Value-added Food: Single Cell Protein. *Biotechnology Advances*, 18, 459-479.

Rubin, E. (2008). Genomics of cellulosic biofuels, *Nature* 454: 841-845.

Sasson, A. (1998). Productos y procedimientos comerciales basados en organismos modificados genéticamente. Biotecnologías aplicadas a la producción de fármacos y vacunas, La Habana, 21-31.

Satoshi, Ô. (1976). The Antibiotic Cerulenin, a Novel Tool for Biochemistry as an Inhibitor of fatty Acid Synthesis. *AMS News* 40:681–697.

Saxena, V., Sharma, C. D., Bhagat, S. D., Saini, V. S., Adhikari, D. K. (1998). Lipid and Fatty Acid Biosynthesis by *Rhodotorulaminuta*. *JAOC* 75 (4) : 501–505.

Scandellari, F., Hobbie, A., Ouimette, P., Stucker, K. (2009). Tracing metabolic pathways of lipid biosynthesis in ectomycorrhizal fungi from position-specific ¹³C-labelling in glucose. *Environmental Microbiology* 11 (12) : 3087-3095.

Siguo, W., Cui, H., Xin, Z., Zongbao, Z. (2003). Production of lipid from N-acetylglucosamine by *Cryptococcus curvatus*. *Eur. J. Lipid Sci. Technol* 112, 727–733

Silva, F., Schwan, F., Sousa, E., Wheals, E. (2000). Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea Arabica* in Brazil. *Int. J. Food Microbiol* 60, 251-260.

Soria, J. (2014). Acumulación de lípidos por *Aspergillus niger* durante la fermentación en estado sólido de la pulpa de café. En: Centro de Estudios de Biotecnología Industrial. Santiago de Cuba: Universidad de Oriente. *Tesis en Opción al grado de Licenciado en Biología*, 55.

Steen, J., Kang, S., Bokinsky, G., Hu, H., Schirmer, A., McClure, A., Cardayre, B., Keasling, D. (2010). Microbial production of fatty-acid-derived fuels and chemicals from plant biomass. *Nature* 463, 559–562.

Subhash, V., Mohan, V. (2011). Biodiesel production from isolated oleaginous fungi *Aspergillus* sp. using corncob waste liquor as a substrate. *Bioresource Technology* 102: 9286-9290.

Subramaniam, R., Dufreche, S., Zappi, M., Bajpai, R. (2010). Microbial lipids from renewable resources: production and characterization, *J Ind Microbiol Biotechnol* 37: 1271–1287.

Tao, J., Dai, C., Dai, Q. (2006). The conversion efficiency and economic feasibility of microbial energy. *Chin. J. Microbiol.* 26 (6) : 48-54.

Tao, H., González, R., Martínez, A., Rodríguez, M., Ingram, O., Preston, F., Shanmugam, T. (2001). Engineering a homo-ethanol pathway in *Escherichia coli*: Increased glycolytic flux and levels of expression of glycolytic genes during xylose fermentation. *J. Bacteriol.*183:2979-2988.

Téllez-Luis, J., Ramírez, A., Vázquez, M. (2002). Modelling of the hydrolysis of sorghum straw at atmospheric pressure. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 82, 505-512.

Thakur,S., Prapulla, G., KaranthG. (1989). Estimation of intracellular lipid by the measurement of absorbance of yeast cells stained with Sudan Black B. *Enzyme MicrobTechnol* 11:252–254.

Thiru, M., Sankh, S., Rangaswamy, V. (2011). Process for biodiesel production from *Cryptococcus curvatus*. *Bioresource technology*. 102, 10436-10440.

Underwood, A., Buszko, L., Shanmugam, T., Ingram, O. (2002). Flux through citrate synthase limits the growth of ethanologenic *Escherichia coli* KO11 during xylose fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:1071-1081.

Vicente, G., Bautista, L., Rodriguez, R., Gutiérrez, F., Sadaba, I., Ruiz-Vázquez, R., (2009). Biodiesel production from biomass of an oleaginous fungus. *Biochem Eng J*48: 22-27.

Vorapreeda, T., Thammarongtham, C., Cheevadhanarak, S., y Laoteng, K. (2012). Alternative routes of acetyl-CoA synthesis identified by comparative genomic analysis: involvement in the lipid production of oleaginous yeast and fungi, *Microbiology* 158: 217-228.

Vyas, S., Chhabra, M. (2016). Isolation, identification and characterization of *Cystobasidiumoligophagum*JRC1: A cellulase and lipase producing oleaginous yeast. *Bioresource Technology* 223: 250-258.

Wallander, H., Nilsson, O., Hagerberg, D., Rosengren, U. (2003). Direct estimates of C: N ratios of ectomycorrhizal mycelia collected from Norway spruce forest soils. *Soil Biology and Biochemistry* 35: 997-999.

Walstra, P., Geurts, J., Noomen, A., Jellema, A., Van Boekel, M. (2001). *Ciencia de la leche y tecnología de los productos lácteos*, Marcel Dekker.

Wang, F., Li, M., Lu, D., Ma, S., Yan, P., Li, J. (2009). A quick isolation method for mutants with high lipid yield in oleaginous yeast. *World J Microbiol Biotechnol* 25: 921–925.

Xin, L., Hong-ying, H., Ke, G., Ying-xue, S. (2010). Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. *Bioresource Technology* 101: 5494–5500.

Xue, F., Miao, J., Zhang, X., Luo, H., Tan, T. (2008). Studies on lipid production by *Rhodotorula glutinis* fermentation using monosodium glutamate wastewater as culture medium. *Bioresource Technology* 99: 5923 – 5927.

Yu, X., Zheng, Y., Dorgan, K., Chen, S. (2011). Oil production by oleaginous yeasts using the hydrolysate from pretreatment of wheat straw with dilute sulfuric acid. *Bioresour Technol* 102: 6134–6140.

Zhao, X., Kong, X., Hua, Y., Feng, B., Zhao, Z. (2008). Medium optimization for lipid production through co-fermentation of glucose and xylose by the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*. *Eur J Lipid Sci Technol* 110: 405–412.

Zhu, Y., Zong, H., Wu, H. (2008). Efficient lipid production with *Trichosporon fermentans* and its use for biodiesel preparation. *Bioresource Technology* 99, 7881-7885.

ANEXOS

Anexo 1. Principio del Método Fenol-Ácido Sulfúrico (Método de Dubois)

En ácido sulfúrico concentrado los polisacáridos son hidrolizados a sus constituyentes monosacáridos, a su vez estos son deshidratados a reactivos intermediarios que en presencia de fenol forman productos amarillo-naranja estables, la intensidad del color naranja es proporcional a la cantidad total de carbohidratos presentes en la solución. Esta absorbancia puede ser medida a 492 nm con un rango de linealidad de 5 – 50 mg/l.

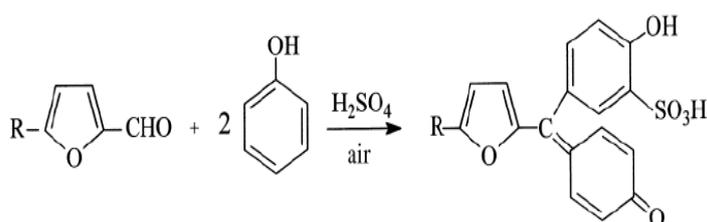


Figura 1. Reacción general Método Fenol- Ácido Sulfúrico (Método de Dubois)

Anexo 2. Principio del Método Colorimétrico para determinación de Glicerol residual (Bondioli and Bella, 2005)

El formaldehído se genera por la reacción entre el glicerol libre y el peryodato de sodio, y la reacción entre la acetil acetona y el formaldehído generado conduce a la formación de la 3,5-diacetil-1,4-dihidrolutidina. La formación de este último compuesto es proporcional a la cantidad de glicerol en la muestra y su concentración puede ser determinada colorimétricamente, debido a su intenso color amarillo, con una banda de absorción específica a 410 nm.

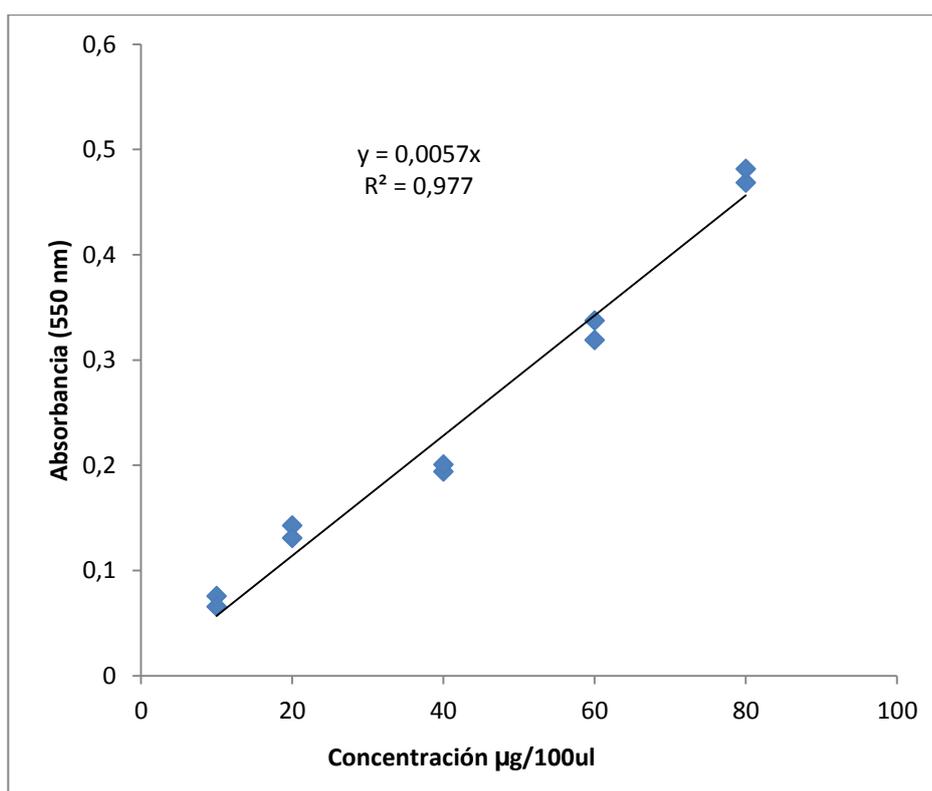
Anexo 3. Principio del Método Colorimétrico para la determinación de NH₄⁺(Standard Methods, APHA, 1998)

El método del Fenato es conocido también como la Técnica Colorimétrica de Cuantificación de azul de indofenol. El amonio es un catión poliatómico cargado positivamente de fórmula química NH₄⁺. Se produce por la reacción del amoníaco, que es una base débil con ácidos de Bronsted (donantes de electrones). El ion amonio resulta de la reducción de nitratos u oxidación de materia orgánica, sin embargo, dependiendo del pH del medio, sus concentraciones pueden variar transformándose en amoníaco, lo cual quiere decir que a pH superiores a 9,2; el amoníaco tiende a aumentar pero el amonio

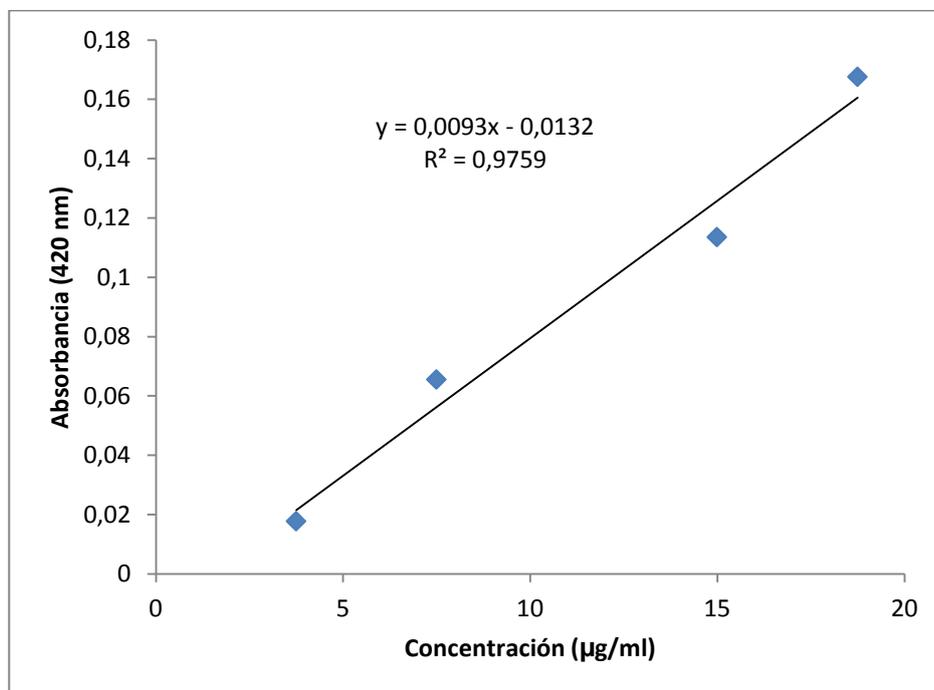
disminuye, mientras que a pH menores, el amonio aumenta y el amoníaco disminuye. Este método se basa en que un compuesto de color azul intenso, conocido como indofenol, el que se forma por la reacción del amonio con el fenol, favorecido por el ion hipoclorito, en condiciones alcalinas, catalizada por el nitroprusiato de sodio, el cual favorece la intensidad del color en la reacción. La absorbancia puede ser leída a 640 nm.

Anexo 4. Curvas de calibración utilizadas para la estimación de la concentración de los diferentes analitos ensayados en este estudio mediante determinaciones colorimétricas

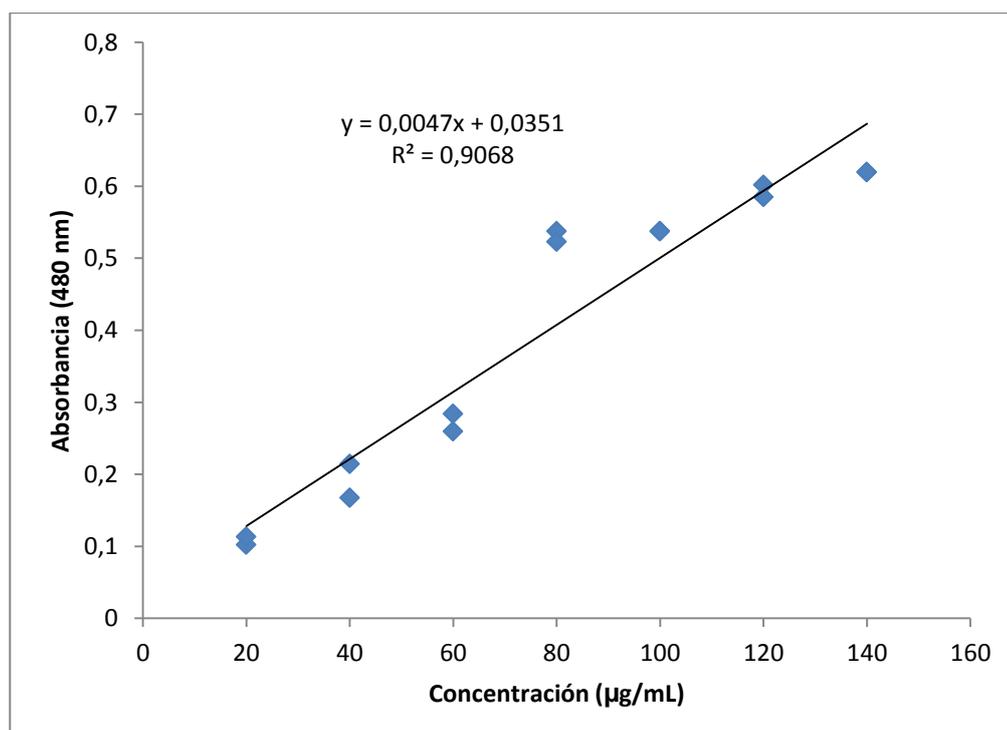
A. Curva patrón de aceite de soya para la cuantificación colorimétrica de lípidos en las biomásas de levaduras (Método de la sulfosfosvainillina, Izard y Limberger, 2003)



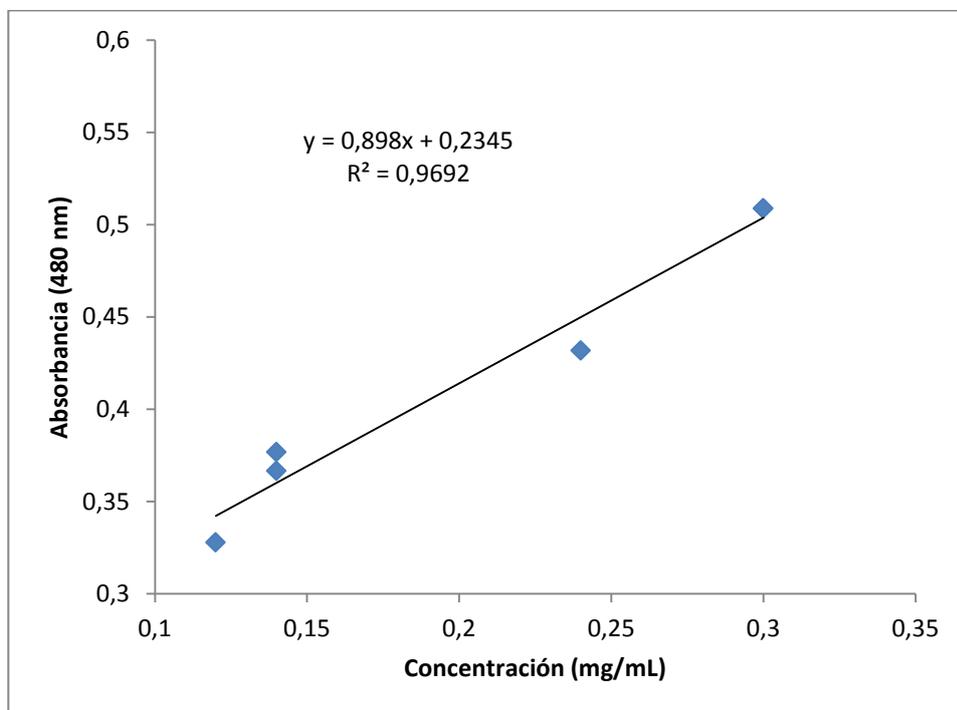
B. Curva patrón de Glicerol utilizada para la cuantificación colorimétrica del contenido de glicerol residual en los medios de cultivo (Método de Bondioli y Bella, 2005)



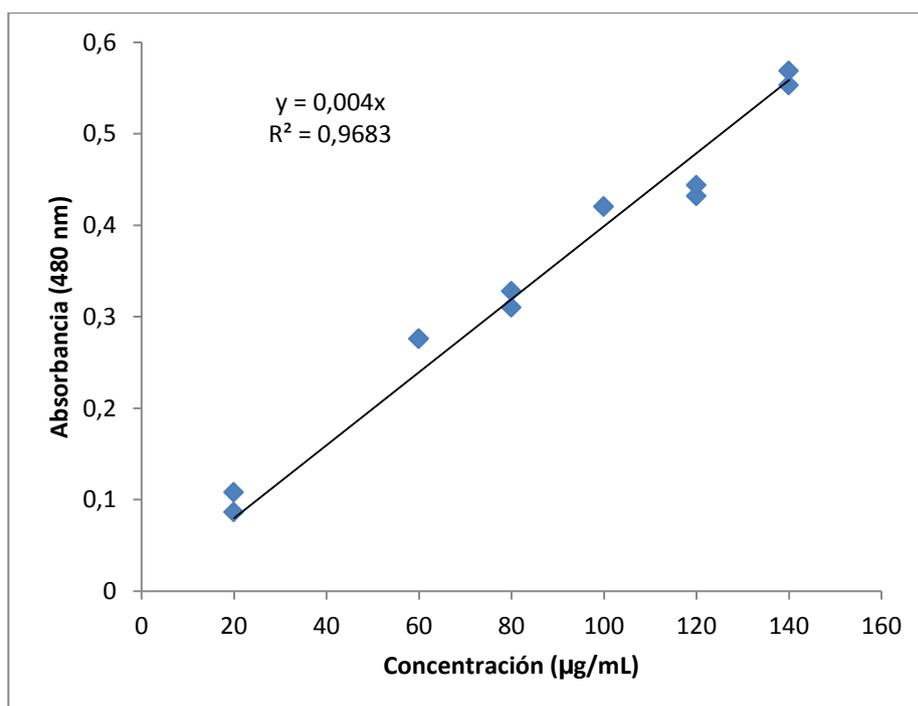
C. Curva patrón de Glucosa utilizada para la cuantificación colorimétrica del contenido de hexosas (Método del fenol-ácido sulfúrico; Dubois *et al.*, 1956)



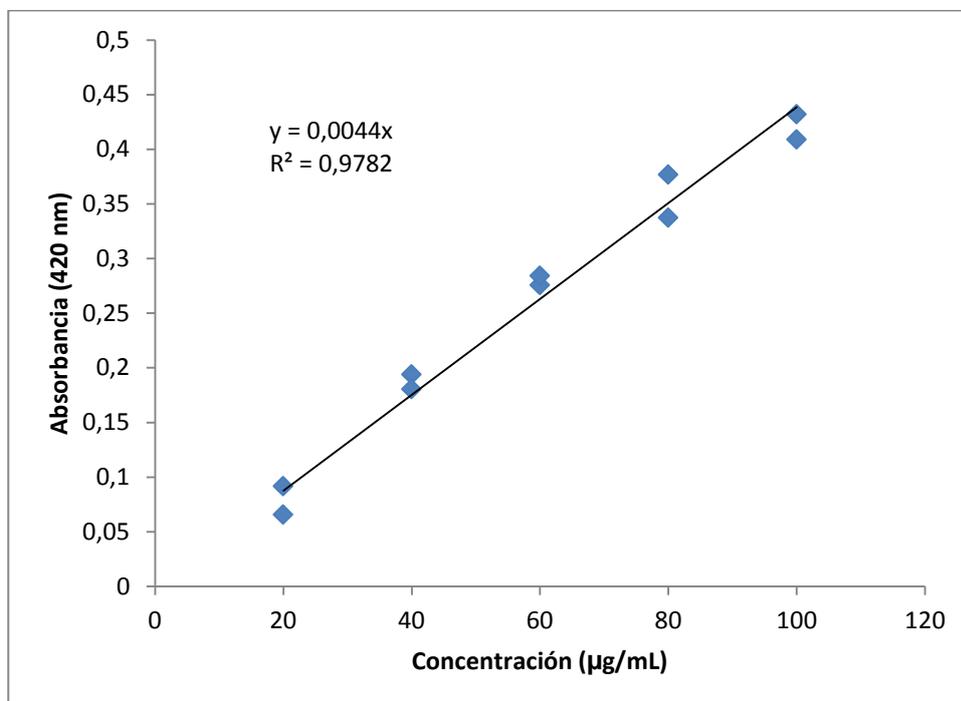
D. Curva patrón de Glucosa, Sacarosa y Lactosa utilizada para la cuantificación colorimétrica del contenido de azúcares en medios con relación C/N 60:1



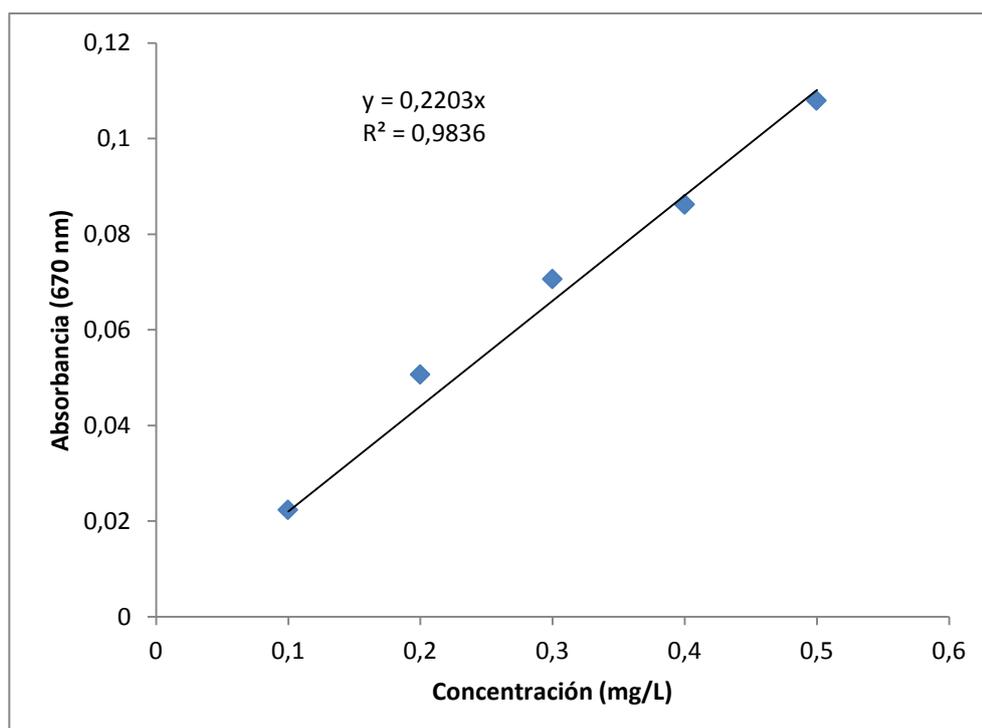
E. Curva patrón de Xilosa utilizada para la cuantificación colorimétrica del contenido de azúcares en medios con relación C/N 60:1



F. Curva patrón de Glicerol utilizada para la cuantificación colorimétrica del contenido de glicerol residual en medio con relación C/N 60:1



G. Curva patrón de sulfato de amonio utilizada para la cuantificación colorimétrica del contenido de amonio residual en medio con relación C/N 60:1



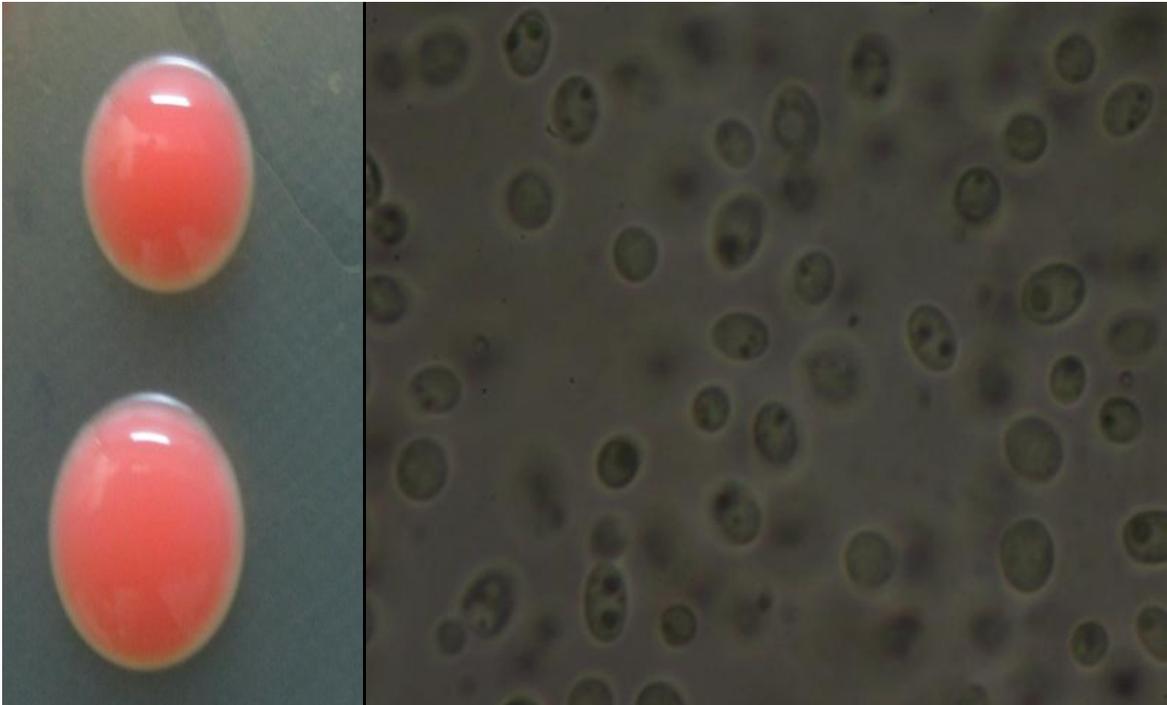
Anexo 5. Registro descriptivo de las características morfológicas y fisiológicas de las levaduras oleaginosas aisladas de queso parmesano

A. Nombre específico: *Rhodotorula glutinis* (Harrison, 1928)

Morfología:

- a) **Descripción morfológica de la colonia:** colonias circulares, convexas, lisas, brillantes, bordes enteros, abultadas, color rosa
- b) **Descripción micro-morfológica:** células ovoides, con un tamaño de 0,3 - 0,4 micras, multinucleadas.

Fotografías



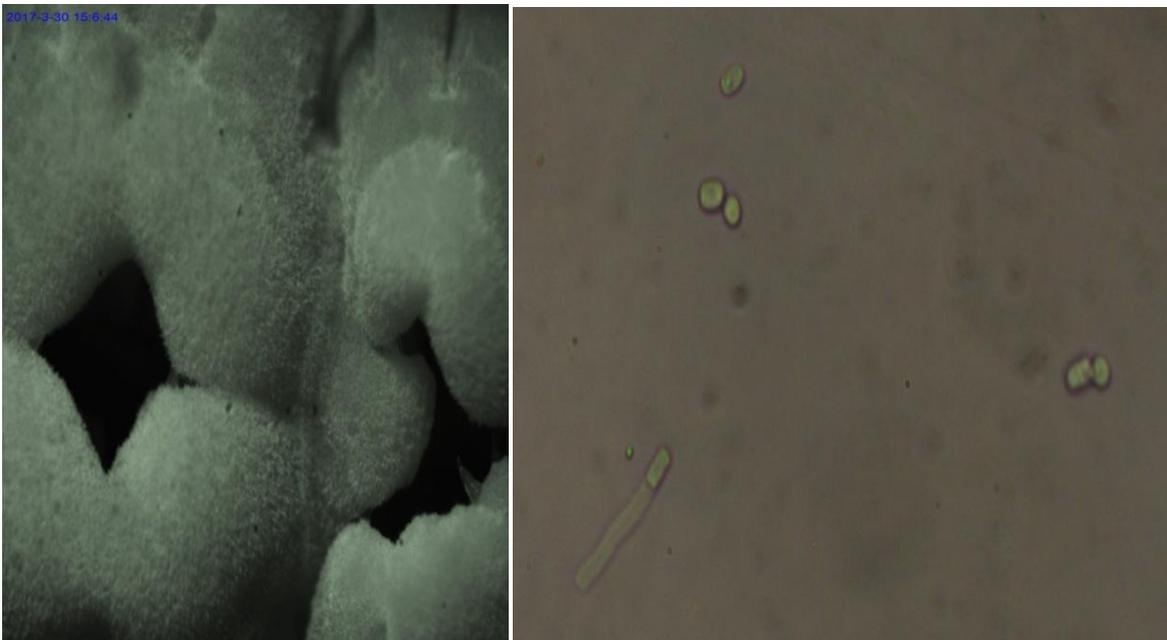
Colonias en YPDA, 7 días

B. Nombre específico: *Cryptococcus curvatus* (Diddens&Lodder, Golubev, 1980)

Morfología:

- a) **Descripción morfológica de la colonia:** colonias circulares, de 2-3 mm de diámetro, opacas, bordes irregulares septados, abultadas, con elevación y agujero en el centro, color crema y más blancas hacia el centro
- b) **Descripción micro-morfológica:** células globosas, con un tamaño de 0,3 - 0,4 micras de ancho y 0,5 de largo, pseudohifas, con gemación unipolar.

Fotografías



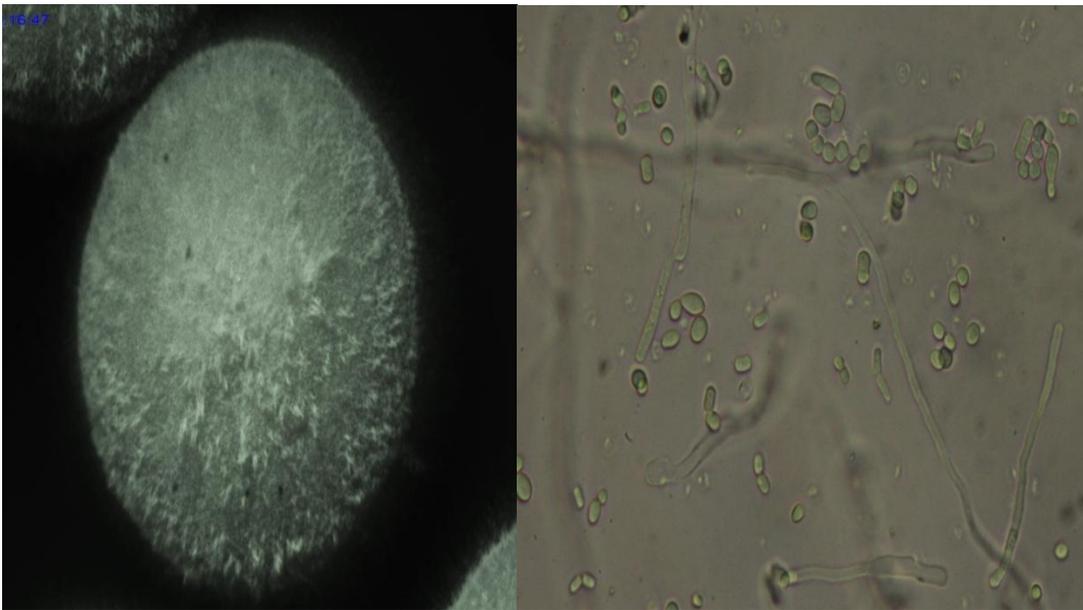
Colonias en YPDA, 7 días

C. Nombre específico: *Candida fusiformata* (Buhagiar, 1979)

Morfología:

- a) **Descripción morfológica de la colonia:** colonias circulares, de tamaño mediano, 1-2 mm de diámetro, bordes enteros, color blanco, con pelos.
- b) **Descripción micro-morfológica:** células globosas, alargadas, con un tamaño de 0,4 - 0,5 micras de ancho y 0,5 - 0,7 micras de largo, pseudohifas de hasta 32,5 micras, con gemación unipolar.

Fotografías



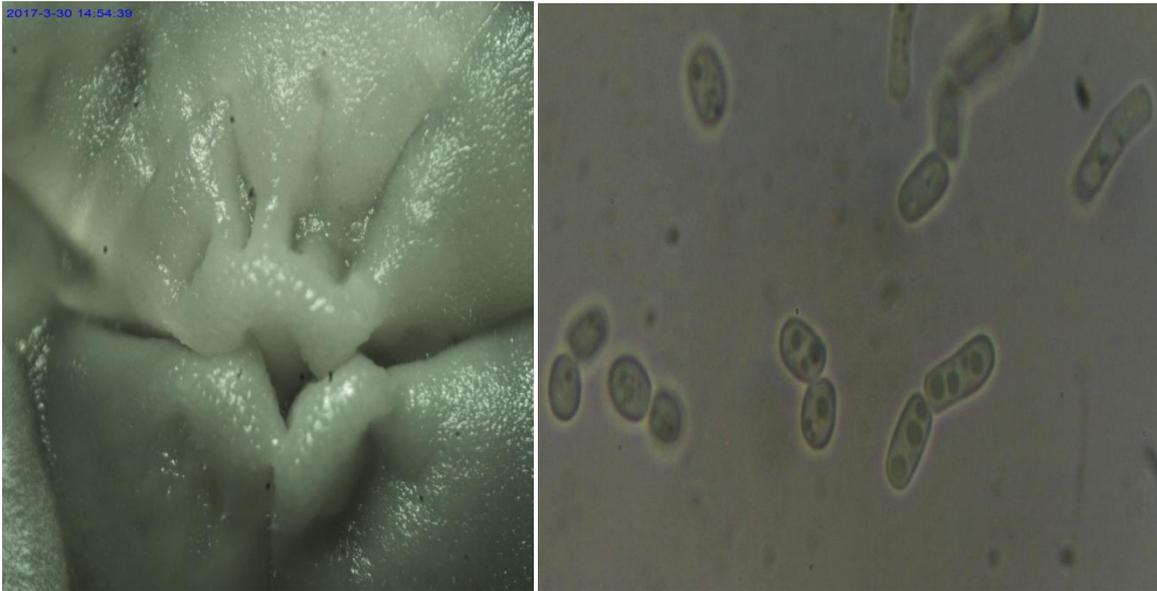
Colonia en YPDA, 7 días

D. Nombre específico: *Cryptococcus albidus* (Skinner, 1950)

Morfología:

- a) **Descripción morfológica de la colonia:** colonias circulares, de 2-3 mm de diámetro, bordes septados, con elevación abultadas, de color crema
- b) **Descripción micro-morfológica:** células globosas, alargadas, multinucleadas, con un tamaño de 0,3 - 0,4 micras de ancho y 0,4 - 0,5 micras de largo, pseudohifas de hasta 30 micras, con gemación unipolar.

Fotografías



Colonia en YPDA, 7 días

E. Fisiología de las cepas aisladas

	<i>Rhodotorula glutinis</i>	<i>Cryptococcus curvatus</i>	<i>Candida fusiformata</i>	<i>Cryptococcus albidus</i>
Ensayos de fermentación de azúcares				
D-Glucosa	-	-	-	-
Inulina	-	-	-	-
Ensayos de asimilación y crecimiento aeróbico				
D-galactosa	+	+	+	N
L-sorbosa	+	D	D	-
D-glucosamina	D	+	+	N
D-xilosa	N	N	N	N
L- arabinosa	N	N	N	N
D-arabinosa	D	D	D	D
sacarosa	+	+	+	+
maltosa	+	+	+	+
α,α -trealosa	+	+	+	N
Me α -D-glucosidasa	+	+	+	+
celobiosa	D	+	+	+
melibiosa	-	-	+	-
lactosa	-	D	+	+
rafinosa	+	+	+	-
melezitosa	N	N	N	N
almidón	-	-	-	-
eritritol	-	+	+	-
xilitol	+	D	D	-
D-manitol	D	D	D	-
galactitol	-	-	D	N
D-glucono-1,5- lactona	+	+	+	-
2-ceto-D-gluconato	N	N	N	N
DL- lactato	D	+	+	-
citrato	D	-	+	-
etanol	-	D	D	-
nitrito	D	-	D	D
etilamina	-	-	-	-
cadaverina	+	+	+	D
L-lisina	+	+	+	N
sin biotina	+	+	+	+
sin tiamina	D	+	+	+
sin piridoxina	D	+	+	+
sin PABA	+	D	+	+
D-glucosa 50 %	+	+	+	+
D-glucosa 60 %	+	+	+	+
cicloheximida 0,01 %	N	N	N	N
cicloheximida 0,1 %	N	N	N	N
Ensayos de termotolerancia				
25 ° C	+	+	+	+
30 ° C	+	+	+	+
37 ° C	D	D	+	+

42 ° C	-	-	-	-
Otras pruebas				
Formación de almidón	-	-	-	-
Hidrólisis de la urea	+	+	+	+
Balistoconidia	N	N	N	N
Colonias rosas	+	-	-	-
Pseudohifas	-	+	+	+
Hifas septadas	-	-	-	-

Legenda: +, respuesta positiva; -, negativa; D, débil (> 9 días); N, ensayo no realizado

Anexo 6. Clasificación taxonómica de las levaduras identificadas

Categorías taxonómicas	Cepa 30	Cepa 74	Cepa 73	Cepa37
Reino	Fungi	Fungi	Fungi	Fungi
Filo	<u>Basidiomycota</u>	Basidiomycota	Ascomycota	Basidiomycota
Clase	<u>Microbotryomycetes</u>	Tremellomycetes	Saccharomycetes	Tremellomycetes
Orden	<u>Sporidiobolales,</u>	Tremellales	Saccharomycetales	Tremellales
Familia	<u>Sporidiobolaceae</u>	Tremellaceae	Saccharomycetaceae	Tremellaceae
Género	Rhodotorula	Cryptococcus	Candida	Cryptococcus
Especie	<i>Rhodotorula glutinis</i>^a	<i>Cryptococcus curvatus</i>^b	<i>Candida fusiformata</i>^c	<i>Cryptococcus albidus</i>^d

^aSegún Harrison, 1928

^bSegún Diddens&Lodder, Golubev, 1980

^cSegún Buhagiar, 1979

^dSegún Skinner, 1950