

# Comparación de la actividad lipolítica de *Cladosporiumcladosporioides* y *Geotrichumcandidum* en aceite de coco y ésteres de luteína

SARAHÍ NOCELO ROJAS<sup>1</sup>, ALBINA CASTRO MÉNDEZ<sup>2</sup>, MA. GABRIELA ALVARADO CASTILLO<sup>1</sup>, JORGE LOZADA LECHUGA<sup>1</sup>, AND JUAN CARLOS VELÁZQUEZ ARADILLAS<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Posgrado, Universidad Politécnica de Puebla, 3er Carril del Ejido Serrano, S/N, San Mateo Cuanalá, Juan C. Bonilla, CP 72640, Puebla

<sup>2</sup>CYRA, Morelos 2B, Ometoxtla, Juan C. Bonilla, CP 72669, Puebla. Email: sarahi.nocelo@uppuebla.edu.mx

Compiled 25 de septiembre de 2017

En el presente trabajo se llevó a cabo la comparación de la actividad lipolítica de la levadura *Geotrichumcandidum* y el hongo filamentoso *Cladosporiumcladosporioides* utilizando un modelo de crecimiento en estado sólido adicionado con aceite de coco y ésteres de luteína suplementado con Rodamina B como indicador lipolítico incubados durante un periodo de 14 días a temperatura ambiente. Se llevó a cabo de manera paralela la identificación morfológica y genética de ambas cepas en el presente estudio. La actividad lipolítica resultante en medio adicionado con aceite de coco no presentó diferencias estadísticamente significativas entre las medias de las dos cepas, sin embargo, *Geotrichum candidum* presentó mayor actividad lipolítica sobre los ésteres de luteína, debido a la presencia de fluorescencia de tono anaranjado comparada con *Cladosporiumcladosporioides* que solo presentó la fluorescencia alrededor de la colonia.

**Palabras clave:** actividad lipolítica, *Geotrichum candidum*, *Cladosporium cladosporioides*, aceite de coco y ésteres de luteína. © 2017 Universidad Politécnica de Puebla

**OCIS codes:** (140.3490) Lasers, distributed feedback; (060.2420) Fibers, polarizationmaintaining; (060.3735) Fiber Bragg gratings.

<http://dx.doi.org/10.1364/ao.XX.XXXXXX>

## 1. INTRODUCCIÓN

Las lipasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de triacilglicerol insolubles en disolventes polares para generar ácidos grasos libres, diacilglicerol, monoglicerol y glicerol sobre una interfase agua-aceite como se muestra de forma general en la Figura 1, donde las R's pueden ser ácidos grasos de C<sub>4</sub>-C<sub>18</sub> [1], [2].

La habilidad de las lipasas para efectuar muchas transformaciones químicas específicas (biotransformaciones) ha hecho

que su interés incremente en las industrias alimentaria, detergente, química, papelería, energética y farmacéutica; así como en tratamientos ambientales y en el diseño de biosensores[3],[4].

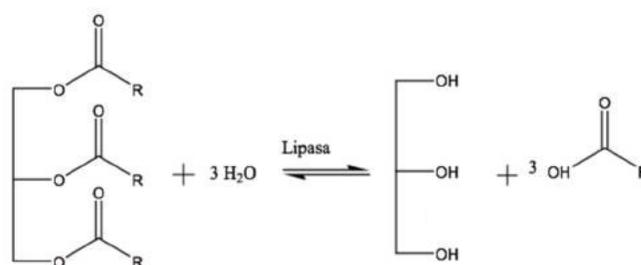


Fig. 1. Acción catalítica de las lipasas.

Las lipasas son producidas por animales, plantas y microorganismos[5]. Sin embargo, las enzimas a partir de fuentes microbianas reciben actualmente más atención por poseer características interesantes como su acción bajo condiciones normales, por su estabilidad en disolventes orgánicos, regio y enantioselectividad, alta especificidad al sustrato, simplicidad en manipulación genética, crecimiento rápido sobre medios baratos y altos rendimientos[2], [4].

Diversos métodos han sido desarrollados para la cuantificación de la actividad lipolítica en preparaciones crudas o mediante lipasas purificadas [6]. Los métodos son clasificados en: screening sobre medio sólido, titulometría, espectroscopía (fotometría, fluorometría, e infrarrojos), cromatografía, tensiometría interfacial, la radioactividad, conductimetría, turbidimetría, inmunológica y microscopía[1].

Uno de los métodos de mayor aplicación es el screening sobre medio sólido, donde la lipólisis es observada directamente por los cambios producidos en la apariencia del sustrato. El colorante fluorescente Rodamina B también puede ser usado en ensayos en placa conteniendo aceite emulsionado para detectar al microorganismo lipolítico; la hidrólisis del sustrato genera la liberación de los ácidos grasos, que se unen a la Rodamina B produciendo la formación de halos fluorescentes anaranjados visibles alrededor de las colonias mediante la irradiación de

UV[6].

Considerando lo anterior, el presente trabajo tiene como objetivo la comparación de la actividad lipolítica de dos cepas aisladas previamente sobre medio con aceite de coco o ésteres de luteína como sustratos lipolíticos y utilizando la Rodamina B como indicador fluorescente.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

Para lograr los objetivos de este trabajo de investigación, se realizaron las siguientes etapas:

### A. Microorganismos y medios

*G. candidum* y *C. cladosporioides* fueron aisladas en la empresa CYRA S.A de C.V. *G. candidum* fue aislada de arroz cocido y *C. cladosporioides* fue aislada del aceite de coco. Ambos microorganismos fueron sembrados en placas con medio Agar Papa Dextrosa (PDA) a temperatura ambiente e incubadas durante 7 y 14 días, respectivamente.

La composición del medio utilizado para la identificación cualitativa de la actividad lipolítica fue la siguiente: glucosa 10g/L, NaNO<sub>3</sub> 1 g/L, MgSO<sub>4</sub> 1 g/L, peptona de caseína 30 g/L, agar 15 g/L y sustrato lipídico al 1%. Las placas fueron suplementadas con Rodamina B con una concentración de 0.01 % a partir de una solución stock de 1 mg/mL, la cual se sometió a un proceso de asepsia mediante filtros de tamaño de poro de 0.2 µm y añadida al medio después de esterilizarlo a 121°C por 15 min.

### B. Identificación morfológica de las cepas

Para la identificación de las cepas se observó su morfología colonial, tomando en cuenta textura, color, borde y forma sobre medio PDA a temperatura ambiente por 7 y 14 días.

En el caso de la morfología microscópica se utilizó la técnica de microcultivo, la cual se realizó por triplicado para cada cepa en medios PDA a temperatura ambiente por 7 días. Los microcultivos se fueron desmontando sucesivamente después de cuatro días de incubación para analizar las principales estructuras fúngicas utilizando un microscopio LEIKA a 40X y 100X de aumentos.

### C. Identificación molecular de las cepas

La caracterización genotípica de las cepas fue desarrollada como a continuación se describe: Para la extracción del DNA se utilizaron 100 mg de cada microorganismo aproximadamente y se añadieron a un tubo de lisis del sistema de extracción basado en resinas de intercambio iónico "DNA ZR Fungal/Bacterial" marca ZYMO RESEARCH. La extracción de ADN se llevó a cabo según las instrucciones del fabricante. El DNA obtenido de este modo se cuantificó por espectroscopía de luz UV, y se verificó la integridad del mismo mediante la electroforesis de 5µl de cada una de las muestras de DNA en un gel al 0.8 % m/v de agarosa. Se amplificó por PCR la región espaciadora transcrita Interna, ITS1-5.8S-ITS2 del ADNr, utilizando en cada tubo de reacción; 1 µl de cada iniciador ITS1 e ITS4[5], a una concentración de 10µM, 10 µl del Buffer de reacción, 0.4 µl de DNA polimerasa (Promega), 3 µl de MgCl<sub>2</sub> 1.5 µM y 2 µg de ADN a un volumen final de 25 µl. La mezcla de la reacción se sometió al termociclador bajo el siguiente programa: 94° C por 10 segundos para la desnaturalización, 58° C a 30 segundos para la hibridación, y 72° C por 40 segundos para la extensión, repitiendo esto durante 30 ciclos.

Los fragmentos obtenidos de la amplificación fueron concentrados con el sistema de purificación en columna "Wizard SV Gel and PCR CleanUp System" para retirar el exceso de sales e iniciadores residuales de la reacción. La integridad y el peso molecular del DNA fueron verificados por la migración electroforética de las muestras en un gel de agarosa al 2 %.

Los fragmentos de ADN purificados tuvieron una longitud de 249 pb para la levadura y 530 pb para el hongo filamentoso. La secuenciación de estos fragmentos de ADN (ambas hebras, sentido y antisentido) se llevó a cabo en la Unidad de Servicios Genómicos de Irapuato, Gto, México.

Estas secuencias fueron comparadas con otras secuencias publicadas en la base de datos del NCBI, Gene Bank, utilizando alineamientos locales mediante el programa BLASTn y tomando en cuenta solamente aquellas secuencias con un porcentaje de similitud mayor o igual al 98 %.

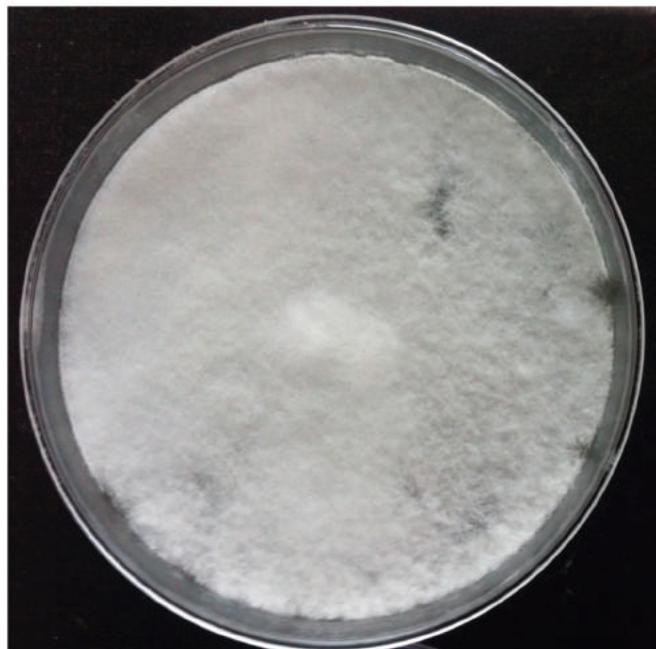
### D. Método de rastreo para la producción de lipasas

*G. candidum* y *C. cladosporioides* fueron sembradas en agar antes mencionado suplementado con Rodamina B a temperatura ambiente e incubados durante 14 días, el crecimiento y la aparición del halo fluorescente anaranjado fueron monitoreados dos veces mediante una lámpara de UV (modelo UVGL-25 de 254/365 nm).

## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

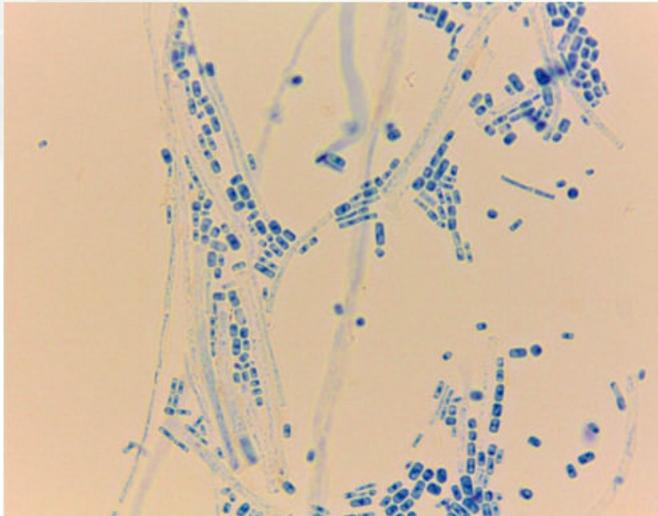
### A. Identificación de las cepas

La identificación morfológica macroscópica en placa de la levadura mostró micelio blanco (Figura 2) y artroconidias hialinas (Figura 3) en su morfología microscópica sobre medio PDA.



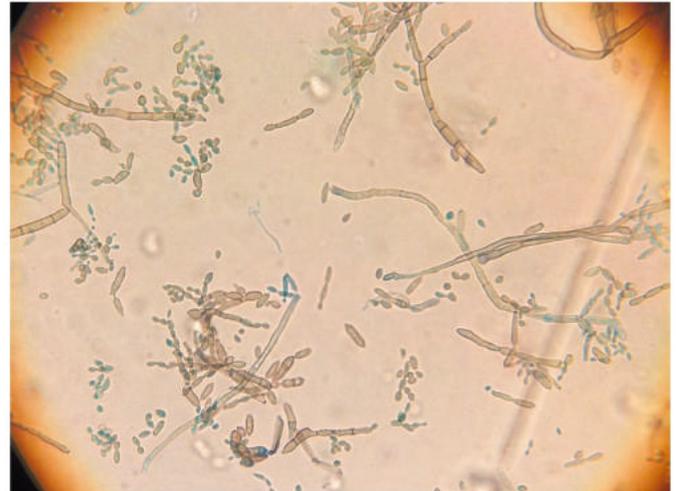
**Fig. 2.** Colonia de *Geotrichum candidum* sobre medio PDA, 7 días de crecimiento a temperatura ambiente.

En el caso del hongo filamentoso se observaron colonias aterciopeladas y sabulosas de color marrón oliváceo, de topografía elevada rugosa (Figura 4) en su morfología macroscópica sobre medio PDA con 14 días de incubación a temperatura ambiente,



**Fig. 3.** Arthroconidias de *Geotrichum candidum* a 100X.

y para el caso de la morfología microscópica se observaron hifas septadas hialinas con conidias en cadenas cortas de forma elipsoidal (figura 5).



**Fig. 5.** Morfología microscópica de *Cladosporium cladosporioides* a 100X.

figuras 6 y 7.

En la figura 6 se puede apreciar que en *G. candidum* se formó un halo más definido que el de *C. cladosporioides* que se ve más difuminado, aunque el color es un poco más intenso.



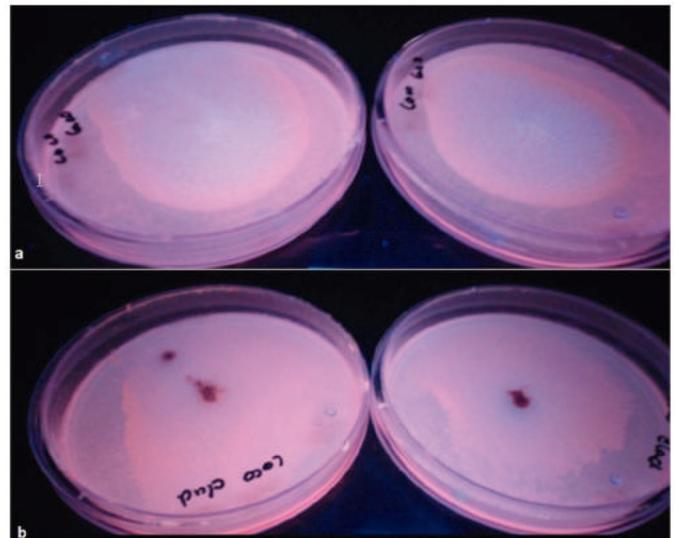
**Fig. 4.** Colonia de *Cladosporium cladosporioides* sobre medio PDA incubado por 14 días a temperatura ambiente.

El análisis de las secuencias utilizando el programa estadístico BLASTn demostró un 99% de similitud del fragmento de 530 pb con la secuencia de *Cladosporium cladosporioides* y un 99% de similitud de la secuencia de 249 pb con secuencias de *Geotrichum candidum*, con una estimación del error menor a 0.1 usando el segmento ITS1-5.8S-ITS2 del RNA ribosomal 18S, por lo que se confirmó la identidad de las dos cepas.

### B. Producción de lipasas

La actividad lipolítica fluorescente inducida por Rodamina B adicionada en las placas con aceite de coco y ésteres de luteína fue monitoreada en dos ocasiones con intervalos de 7 días.

La aparición de halos fluorescentes anaranjados al día 7 de la incubación sobre los medios lipolíticos suplementados con Rodamina B fue muy tenue como se puede observar en las

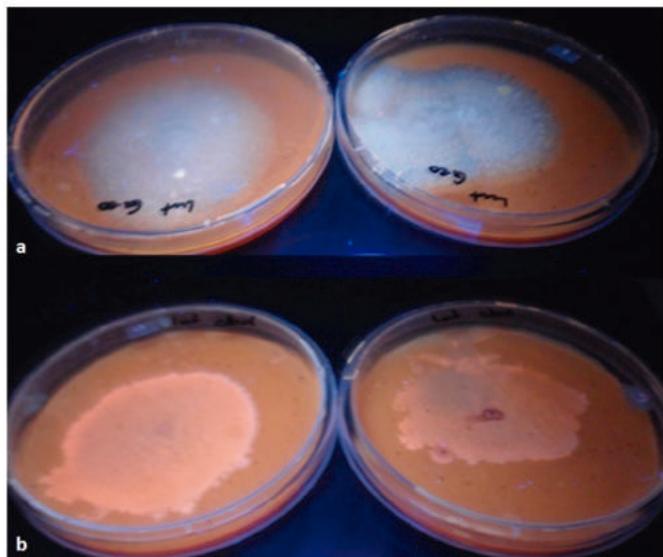


**Fig. 6.** Crecimiento de a) *Geotrichum candidum* y b) *Cladosporium cladosporioides* sobre medio con aceite de coco y Rodamina B a los 7 días.

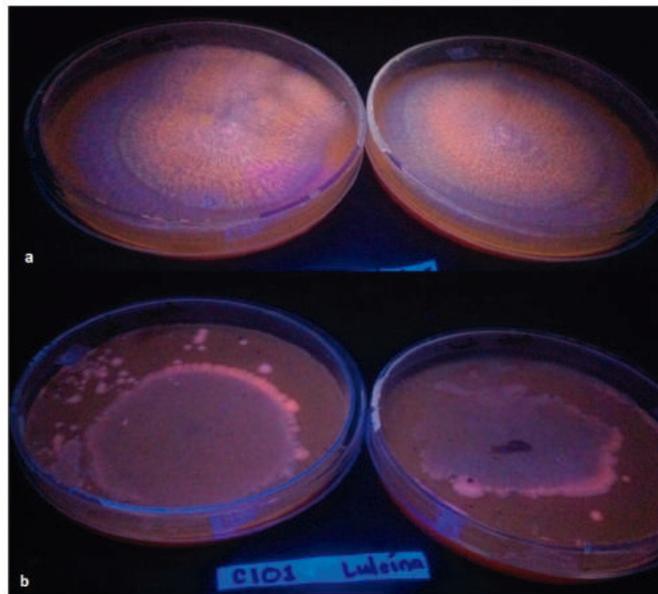
En el caso del medio con ésteres de luteína y Rodamina B a los 7 días, se observó que la aparición del halo fluorescente fue notoria con *C. cladosporioides*, mientras que en *G. candidum* fue mínima la producción de fluorescencia como se puede observar en la figura 7.

A los 14 días de incubación fue posible distinguir en mayor medida la fluorescencia para ambos sustratos. Para el caso de la cepa de *Geotrichum* no solo se observa la fluorescencia alrededor de la cepa, sino que también se presenta en todo el micelio (pero) de forma más tenue en comparación de *Cladosporium*, Figura 8. Es notable que esta cepa presenta un menor crecimiento de biomasa, sin embargo presentó una fluorescencia más intensa.

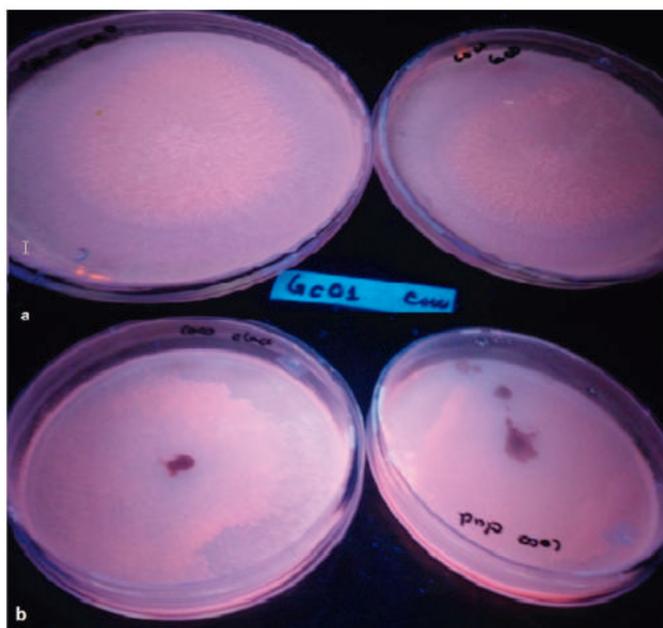
En las placas enriquecidas con ésteres de luteína y Rodamina



**Fig. 7.** Crecimiento de a) *Geotrichumcandidum* y b) *Cladosporiumcladosporioides* sobre medio con ésteres de luteína y Rodamina B a los 7 días.



**Fig. 9.** Crecimiento de a) *Geotrichumcandidum* y b) *Cladosporiumcladosporioides* sobre medio con ésteres de luteína y Rodamina B a los 14 días.



**Fig. 8.** Crecimiento de a) *Geotrichumcandidum* y b) *Cladosporiumcladosporioides* sobre medio con aceite de coco y Rodamina B a los 14 días.

B a los 14 días se presentó fluorescencia anaranjada en las dos cepas de manera diferencial. Para *G.candidum* la fluorescencia se presenta localizada en el micelio, por otra parte, *C. cladosporioides* presenta fluorescencia de mayor intensidad, pero focalizada en la periferia de las colonias. Es probable que sean las regiones de mayor crecimiento en el medio las que se encuentren con una actividad lipasa magnificada debido al metabolismo primario.

#### 4. CONCLUSIONES

La actividad lipolítica de hidrólisis de aceite de coco cuantificada mediante fluorescencia presentó una actividad similar en ambos cultivos. Sin embargo, para el caso de la hidrólisis de los ésteres de luteína, se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas entre las actividades de *Geotrichumcandidum* y *Cladosporiumcladosporioides*, siendo *Geotrichum* la cepa con mayor actividad lipolítica.

#### 5. AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca con número: 563214.

#### REFERENCIAS

1. A. K. Singh and M. Mukhopadhyay, Applied biochemistry and biotechnology **166**, 486 (2012).
2. H. Treichel, D. de Oliveira, M. A. Mazutti, M. Di Luccio, and J. V. Oliveira, Food and bioprocess technology **3**, 182 (2010).
3. J. González-Bacero, J. Rodríguez Hernández, and A. d. Monte Martínez, Revista Colombiana de Biotecnología **12** (2010).
4. F. Hasan, A. A. Shah, and A. Hameed, Enzyme and Microbial technology **39**, 235 (2006).
5. T. J. White, T. Bruns, S. Lee, J. Taylor *et al.*, PCR protocols: a guide to methods and applications **18**, 315 (1990).
6. F. Hasan, A. A. Shah, and A. Hameed, Biotechnology advances **27**, 782 (2009).