



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE  
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

---



**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA**

**PRODUCCIÓN DE LIPASAS CON CEPAS  
TRANSFORMANTES DE *Saccharomyces cerevisiae* Y  
SILVESTRE DE *Kluyveromyces marxianus*, A NIVEL  
BIORREACTOR**

**TESIS presentada por:**

**RENATO CANIZAL GARCÍA**

**A la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de  
Ingeniería Química como requisito parcial para obtener el  
grado de:**

**MAESTRO EN CIENCIAS EN INGENIERÍA QUÍMICA**

**Morelia, Michoacán de Ocampo, Diciembre de 2019.**



**Asunto: Impresión de Tesis.**

**Lic. Ulises Gutiérrez Vazquez**  
**Jefe del Departamento de Titulación**  
**Presente .-**

Por este medio nos dirigimos a usted de la manera mas atenta para notificarle que después de haberle dado seguimiento al desarrollo de la tesis: "PRODUCCIÓN DE LIPASAS CON CEPAS TRANSFORMANTES DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE Y SILVESTRE DE KLUYVEROMYCES MARXIANUS A NIVEL BIORREACTOR", después de haber revisado el manuscrito que presentó el alumno **Renato Canizal García con matrícula 1721835B**, concluimos que cumple con los requisitos académicos y con lo establecido en el Reglamento General de Estudios de Posgrado para el desarrollo de su tesis.

Por lo anterior este Comité Tutorial da el aval para su impresión final.

**Presidente o Asesor:** Dra. Ma. Del Carmen Chávez Parga.

**Coasesor:** Dr. Juan Carlos González Hernández 08006687

**Vocales:**

Dr. Luis Alberto Madrigal Pérez EXT19153

Dr. Rafael Maya Yescas 04002040

Dr. José Apolinar Cortés 82033374

**Atentamente.**

**Morelia, Michoacán a 30 de octubre de 2019.**

  
**Dr. Fabricio Nápoles Rivera**  
**Coordinador de la Maestría en Ciencias en**  
**Ingeniería Química.**



***DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO***

Facultad de Ingeniería Química / Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo  
Francisco J. Mújica S/N / Col. Felicitas del Río / C.P. 58030 / Morelia, Michoacán / Tel. y Fax: 443. 327 3584 Ext. 1211  
<http://posgrado.fiq.umich.mx/>

Morelia, Michoacán de Ocampo, Diciembre de 2019

## PRODUCCIÓN DE LIPASAS CON CEPAS TRANSFORMANTES DE *Saccharomyces cerevisiae* Y SILVESTRE DE *Kluyveromyces marxianus* A NIVEL BIORREACTOR

PRESENTA: I.B.Q. RENATO CANIZAL GARCÍA  
DIRIGIDA POR: D.C. MA. DEL CARMEN CHÁVEZ PARGA (FIQ-UMSNH)  
D.C. JUAN CARLOS GONZÁLEZ HERNÁNDEZ (ITM-TNM)

### RESUMEN

Las lipasas son enzimas que tienen un valor industrial importante por sus aplicaciones en la industria de alimentos; de detergentes y farmacéutica, las cuales alcanzan un valor en el mercado de alrededor de 100 millones de dólares anuales. Debido a esto se han desarrollado metodologías para aumentar los rendimientos de producción de lipasas como la optimización de medios de cultivo; la búsqueda de nuevos microorganismos y la manipulación genética. Por lo cual, el objetivo de este trabajo fue producir las lipasas con cepas transformantes de *S. cerevisiae* y silvestre de *K. marxianus* a nivel biorreactor Applikon® de 3 litros. Para la máxima producción de células se evaluaron las concentraciones de glucosa y extracto de levadura mediante un diseño factorial  $2^2$ , seguido de la validación de las mejores concentraciones predichas por un modelo estadístico del diseño factorial, también se realizó un diseño factorial  $2^2$  para evaluar la concentración del inductor (galactosa) sobre las cepas transformantes y se cuantificó la actividad lipásica extracelular e intracelular, por último se determinaron los parámetros de rendimiento de producción de biomasa y lipasas para cada una de las cepas, las cuales se crecieron en un biorreactor de tanque agitado con un volumen de trabajo de 1.5 L bajo las mejores concentraciones de glucosa; galactosa y extracto de levadura obtenidas a nivel matraz. Las mejores concentraciones de glucosa para las cepas: Lip3, 107w, *S. cerevisiae* y *K. marxianus* fueron de 55, 27, 50 y 100 g/L, respectivamente. Además la mayor concentración de extracto de levadura fue de 10 g/L para las cuatro cepas, así como la concentración de inductor (galactosa) fue de 30 g/L para las dos cepas transformantes, las actividades de las cepas transformantes y silvestres que se obtuvieron en el biorreactor fueron de 1.5; 1.25 y 1.04 U/mg de proteína respectivamente. Mientras que los coeficientes de rendimiento de producto de las cepas transformantes y silvestres fueron de 97.37, 63.55, 0 y 64.04 U/g de células secas respectivamente. De lo que se puede concluir que las lipasas sintetizadas por las cepas transformantes son funcionales ya que en los extractos enzimáticos se detectaron actividad lipásica y lo anterior permitió encontrar que el rendimiento de producción de lipasas se incrementó un 50% con la cepa transformante Lip3 en comparación con la cepa silvestre, y se considera una alternativa para maximizar la producción de lipasas a nivel industrial.

**Palabras claves:** inducción, validación, biomasa, actividad, rendimiento.

## ABSTRACT

The lipases are enzymes that have an important industrial value for their application in the industries food; detergents and pharmaceutical. Which reach a market annual value around 100 million dollars. Because of this, methodologies have been developed for increase the lipase production yields, as the optimization of culture media; the search for new microorganisms and genetic manipulation. Therefore, the objective of this work was produce lipases with transform strains of *S. cerevisiae* and wild strains of *K. marxianus* at the 3 liter Applikon® bioreactor level. Where to get the maximum cell production, the concentration of glucose and yeast extract was evaluated through factorial design  $2^2$ , followed by the validation of the best concentrations predicted by a statistical model of the factorial design. Also a factorial design  $2^2$  was developed to evaluate inducer (galactose) concentration on the transform strains, the extracellular and intracellular lipase activity was quantified. Ultimately, the parameters of biomass and lipase production yield were determined for each of the strains, which were grown in a stirred tank bioreactor with a work volume of 1.5 L and the best concentrations of glucose; galactose, and yeast extract obtained at the flask level. The best concentrations of glucose for the strains Lip3; 107w and wild strains of *K. marxianus* was 55; 27; 50 y 100 g/L, respectively. Also, the highest concentration of yeast extract was 10 g/L for the four strains, as well as inducer concentration was 30 g/L for the two transform strains. The activities of the transform and wild strains that were obtained in the bioreactor were 1.5; 1.25 and 1.04 U/mg of protein, respectively. With respect to product yield, coefficients of the transform and wild strains 97.37, 63.55, 0 y 64.04 U/g of dry cell, respectively. From what we can be concluded that the lipases synthesized for the transform strains was functional, since in the enzymatic extracts was detected lipasic activity and the above allowed to find, that the production yield of lipases was increased by 50% with the transform strain Lip3 compared with the wild strains of *K. marxianus* and is considered an alternative to maximize the lipases at industrial level.

## AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través del soporte financiero otorgado por la Beca 628189.

A los donativos parciales de la Convocatoria de Apoyo a Proyectos de Investigación Científica, Aplicada, Desarrollo Tecnológico e Innovación 2016 al proyecto: Caracterización Bioquímica de lipasas producidas por fermentación con *Kluyveromyces marxianus* utilizando aceite de residuos de aguacate como inductor (5781.6-P, 6131.17-P, y 6525.18-P) de 2016, 2017 y 2018, respectivamente.

A los miembros de la mesa sinodal conformada por: D.C. Ma. del Carmen Chávez Parga; D.C. Juan Carlos Gonzales Hernández; D.C. Rafael Maya Yescas; D.C. José Apolinar Cortés y D.C. Luis Alberto Madrigal Pérez, por sus orientaciones y revisiones durante el desarrollo de este trabajo de investigación.

Así como, a mis compañeros del laboratorio de bioquímica por su apoyo en la realización de los experimentos de este trabajo.

# ÍNDICE

	<b>Página</b>
RESUMEN.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÍNDICE DE TABLAS.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
GLOSARIO.....	ix
ABREVIATURAS.....	xii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. ANTECEDENTES.....	2
1.2. JUSTIFICACIÓN.....	4
1.3. HIPÓTESIS.....	4
1.4. OBJETIVOS.....	4
1.4.1.  Objetivo General.....	4
1.4.2.  Objetivos Particulares.....	5
II. MARCO TEÓRICO.....	6
2.1 Generalidades.....	6
2.1.1  Estructura de las lipasas.....	6
2.1.2  Mecanismo de acción de las lipasas.....	7
2.2 Aplicación industrial de las lipasas.....	8
2.3 Fuentes de lipasas.....	9
2.4 Producción de lipasas.....	10
2.4.1  Producción de lipasas por fermentación sólida.....	10
2.4.2  Producción de lipasas por fermentación sumergida.....	12
2.4.3  Producción heteróloga de lipasas.....	12
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	14

3.1	Evaluación del efecto de las fuentes de carbono y nitrógeno.....	14
3.1.1	Mantenimiento de las cepas .....	14
3.1.2	Diseño factorial 2 <sup>2</sup> .....	14
3.1.3	Crecimiento celular .....	15
3.1.4	Glucosa residual.....	15
3.2	Determinación del efecto de la concentración de inductor y el extracto de levadura sobre la producción de lipasas.....	15
3.2.1	Obtención del extracto enzimático extracelular e intracelular .....	16
3.2.2	Actividad enzimática .....	17
3.2.3	Cuantificación de proteína .....	17
3.3	Producción de lipasas a nivel biorreactor .....	17
3.3.2	Determinación de rendimientos .....	20
3.3.3	Análisis estadístico .....	20
IV.	RESULTADOS.....	21
4.1	Efecto de la fuente de carbono y nitrógeno sobre las variables de respuesta....	21
4.2	Análisis de deseabilidad sobre las variables de respuesta.....	30
4.3	Validación del modelo estadístico sobre las variables de respuesta .....	35
4.4	Inducción de la expresión del vector para la producción de lipasas.....	39
4.5	Efecto de la concentración de galactosa y el extracto de levadura sobre la producción de lipasas en cepas transformantes.....	42
4.6	Producción de lipasas con cepas transformantes de <i>S. cerevisiae</i> y silvestre de <i>K. marxianus</i> a nivel biorreactor .....	44
	Discusión general .....	48
V.	CONCLUSIONES .....	52
VI.	RECOMENDACIONES .....	53
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

## ÍNDICE DE TABLAS

		Página
<b>Tabla 1</b>	Matriz del diseño factorial $2^2$ con cinco puntos centrales para la determinación del efecto de la concentración de la fuente de carbono y nitrógeno.	13
<b>Tabla 2</b>	Matriz del diseño factorial $2^2$ con cinco puntos centrales para la determinación del efecto de la concentración del inductor	15
<b>Tabla 3</b>	Características del biorreactor Applikon®.	18
<b>Tabla 4</b>	Rendimiento de biomasa y producto de las cepas transformantes y silvestres.	45

## ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
<b>Figura 1</b>	Valores de las variables de respuesta en cada tratamiento de la cepa transformante Lip3	21
<b>Figura 2</b>	Valores de las variables de respuesta en cada tratamiento de la cepa transformante 107w	22
<b>Figura 3</b>	Valores de las variables de respuesta en cada tratamiento de la cepa silvestre <i>S. cerevisiae</i>	23
<b>Figura 4</b>	Valores de las variables de respuesta en cada tratamiento de la cepa silvestre <i>K. marxianus</i>	24
<b>Figura 5</b>	Efecto de la glucosa y el extracto de levadura sobre la velocidad específica de crecimiento	25
<b>Figura 6</b>	Efecto de la glucosa y el extracto de levadura sobre la biomasa	26
<b>Figura 7</b>	Efecto de la glucosa y el extracto de levadura sobre la biomasa	27
<b>Figura 8</b>	Efecto de la glucosa y el extracto de levadura sobre la glucosa residual	28
<b>Figura 9</b>	Análisis de deseabilidad para la cepa transformante Lip3	30
<b>Figura 10</b>	Análisis de deseabilidad para la cepa transformante 107w	31
<b>Figura 11</b>	Análisis de deseabilidad para la cepa silvestre de <i>S. cerevisiae</i>	32

BY4742

<b>Figura 12</b>	Análisis de deseabilidad para la cepa de silvestre de <i>K. marxianus</i>	33
<b>Figura 13</b>	Validación de los valores predichos de las concentraciones de glucosa y extracto de levadura para la máxima respuesta de velocidad de crecimiento de las cepas transformantes y silvestres	35
<b>Figura 14</b>	Validación de los valores predichos de las concentraciones de glucosa y extracto de levadura para la máxima respuesta de biomasa de las cepas transformantes y silvestres.	36
<b>Figura 15</b>	Validación de los valores predichos de las concentraciones de glucosa y extracto de levadura para la máxima respuesta de biomasa de las cepas transformantes y silvestres	37
<b>Figura 16</b>	Validación de los valores predichos de las concentraciones de glucosa y extracto de levadura para la mínima respuesta de glucosa residual de las cepas transformantes y silvestres	38
<b>Figura 17</b>	Tiempo en el que inicia la inducción del vector de expresión	39
<b>Figura 18</b>	Actividad extracelular de la inducción con 2% de galactosa	40
<b>Figura 19</b>	Actividad intracelular de la inducción con 2% de galactosa	41
<b>Figura 20</b>	Efecto de la concentración de galactosa y extracto de levadura sobre la actividad lipásica extracelular e intracelular de cepas transformantes	42
<b>Figura 21</b>	Producción de lipasas en biorreactor de cepas transformantes	44
<b>Figura 22</b>	Producción de lipasas en biorreactor de cepas silvestres	46



## GLOSARIO

<b>Alfa-galactosidasa</b>	Proteína homodimérica que hidroliza los grupos terminales alfa-galactosil de glicolípidos y glicoproteínas.
<b>Alfa hélices</b>	Estructura secundaria de las proteínas. Esta hélice mantiene su forma por la presencia de los puentes de hidrógeno que se forman entre los átomos de oxígeno del grupo carbonilo de un aminoácido y el átomo de hidrógeno del grupo amino de otro aminoácido situado a cuatro aminoácidos de distancia en la cadena.
<b>Anillo de imidazol</b>	Intermediario de la biosíntesis de la histidina que se forma desde el imidazol glicerol fosfato con la pérdida de agua.
<b>Anoxia</b>	Falta o disminución de oxígeno en las células.
<b>Autofagia</b>	Proceso catabólico en donde el citoplasma, incluyendo el exceso de orgánulos o aquellos deteriorados, son secuestrados en vesículas de doble membrana y liberados dentro del lisosoma para el de macromoléculas de su descomposición.
<b>Beta-glucosidasa</b>	Enzima que rompe los enlaces glucosídicos de las cadenas de celulosa en los componentes elementales de glucosa.
<b>Beta-glucuronidasa</b>	Enzima que hidroliza selectivamente los enlaces beta-glucosidurónicos y los grupos arilo; acilo y alcohol.
<b>Cepa</b>	Población de células descendientes de una única célula de una sola especie.
<b>codo nucleofílico</b>	Residuo nucleofílico del sitio activo y se localiza se localiza en un giro de 90°, el cual contribuye a la formación de un enlace oxianión.
<b>Endo-beta-1,4-glucanasa</b>	Enzima que cataliza la degradación de las cadenas largas de celulosa en cadenas más cortas.

<b>Esterasa</b>	Enzima que utiliza una molécula de agua para romper enlaces éster en los correspondientes alcoholes y ácidos.
<b>Expresión heteróloga</b>	Proteína que se obtiene de un gen clonado en una línea celular.
<b>Fermentación sumergida</b>	Método de crecimiento de microorganismos en sistemas totalmente líquidos.
<b>Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa</b>	Enzima que cataliza la oxidación del carbonilo del gliceraldehído-3-fosfato hasta un carboxilo.
<b>Hueco oxianión</b>	Incisión más profunda en el sitio activo donde un péptido se desplaza para ocupar una posición antes desocupada y forma un enlace con el oxígeno del carbonilo dando estabilidad al intermediario.
<b>Lactato deshidrogenasa</b>	Enzima que reduce el piruvato hasta lactato mediante la oxidación NADH a NAD <sup>+</sup> .
<b>Lámina beta</b>	Estructura secundaria adoptada por las proteínas y se forma por el posicionamiento paralelo de dos cadenas de aminoácidos dentro de la misma proteína, en el que los grupos N-H de una de las cadenas forman enlaces de hidrógeno con los grupos C=O de la opuesta.
<b>Medio mínimo</b>	Caldo de cultivo que contiene los nutrientes mínimos indispensables para el crecimiento de una colonia.
<b>Peroxidasas</b>	Enzima que cataliza la oxidación de un amplio número de sustratos orgánicos e inorgánicos, utilizando el poder oxidante del peróxido de hidrógeno.
<b>Pliegue hidrolasa <math>\alpha/\beta</math></b>	Estructura terciaria de las proteínas conformadas por la combinación de alfa hélices y láminas beta.
<b>Proteasas</b>	Enzimas que utilizan una molécula de agua para romper los enlaces peptídicos de las proteínas.
<b>Triada catalítica</b>	Son los tres residuos de aminoácidos que funcionan en conjunto en el centro del sitio activo de algunas enzimas.

**Vector de expresión**

Es una molécula de ADN que puede replicarse de manera autónoma e independiente del genoma de la célula hospedera y que produce un transcrito (ARN) o una proteína producto del transcrito.

## ABREVIATURAS

<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>Bcy1p</b>	Subunidad reguladora de la proteína quinasa A
<b>cAMP</b>	Adenosín monofosfato cíclico
<b>EGO</b>	Complejo conformado por las proteínas Ego1; Ego2; Gtr1 y Gtr2
<b>Ego1</b>	Proteína subunidad uno del complejo EGO
<b>Ego3</b>	Proteína subunidad tres del complejo EGO
<b>GAL</b>	Operones activados por galactosa
<b>GAL1</b>	Transportador uno de galactosa
<b>GAL10</b>	Transportador diez de galactosa
<b>GAL2</b>	Transportador dos de galactosa
<b>GAL7</b>	Transportador siete de galactosa
<b>GTP</b>	Guanosina-5'-trifosfato
<b>Gtr1</b>	Trifosfatasas de guanosina uno
<b>Gtr2</b>	Trifosfatasas de guanosina dos
<b>Im11</b>	Proteína asociada a la membrana vacuolar
<b>Npr2</b>	Proteína permeasa dos del regulador de nitrógeno
<b>Npr3</b>	Proteína permeasa tres del regulador de nitrógeno
<b>PKA</b>	Proteína quinasa A
<b>Rim15p</b>	Proteína quinasa de serina/treonina
<b>TORC1</b>	Proteína objetivo del complejo de rapamicina
<b>YPD</b>	<i>Yeast extract Peptone Dextrose</i>
<b><math>\mu_{max}</math></b>	velocidad máxima de crecimiento

### I. INTRODUCCIÓN

Las lipasas son enzimas que tienen diferentes selectividades hacia la clase de lípidos debido a su estructura. Sin embargo, a pesar de las diferencias en el tamaño y la baja identidad de secuencia primaria, las lipasas muestran patrones estructurales de plegado similares como el pliegue hidrolasa  $\alpha/\beta$ ; el hueco oxianión y el sitio activo. El cual consiste de una triada catalítica altamente conservada: un residuo nucleofílico, un residuo de ácido catalítico y una histidina. Debido a la actividad hidrolítica, las lipasas son un grupo de enzimas de importante valor industrial que en el mercado es de 100 millones de dólares, ya que las lipasas se usan ampliamente en diferentes procesos industriales (Ray, 2012; Gupta *et al.*, 2015; Anobom *et al.*, 2017).

Las lipasas se han utilizado en sectores como la industria láctea para la aceleración de la maduración del queso y la generación de sabor, así como en la lipólisis de la mantequilla, la grasa y la crema; en la industria de detergentes para eliminar las manchas que contienen grasa; en la farmacéutica para la síntesis de vitaminas y ésteres fenólicos con actividades antioxidantes. Debido a su amplia aplicación, las lipasas han sido aisladas de animales, plantas y microorganismos (Hasan *et al.*, 2010; El-Hofi, 2011; Anobom *et al.*, 2014).

Las lipasas de animales utilizadas en procesos industriales incluyen lipasas pancreáticas y pregástricas. Las lipasas de plantas han sido purificadas de las semillas de arroz; trigo; cebada; avena y maíz. Las lipasas bacterianas han sido aisladas de bacterias como: *Pseudomonas fluorescens*, *Burkholderia cepacia*, *Bacillus thermocatenuatus* entre otras y las lipasas fúngicas han sido aisladas de hongos filamentosos como *Fusarium heterosporum*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus oryzae* entre otros, mientras que las de levaduras son de *Candida antártica* y *Candida rugosa*. Las lipasas de levaduras y hongos se consideran las más relevantes para uso comercial (El-Hofi, 2011; Moussavou *et al.*, 2013; Hwang *et al.*, 2014).

En la producción industrial de enzimas, los microorganismos son la fuente preferida debido a que tienen un tiempo de generación más corto, alto rendimiento de conversión de sustrato en producto, gran versatilidad para las condiciones ambientales,

simplicidad en la manipulación genética y condiciones de cultivo. Por lo cual, un sistema para la producción de lipasas es mediante la fermentación en estado sólido, donde se utilizan residuos agroindustriales pretratados mediante la hidrólisis térmica o química y se inoculan con esporas de hongos filamentosos en diversos tipos de biorreactores (Azeredo *et al.*, 2007).

Sin embargo, la fermentación sólida tienen la desventaja de largos tiempos de retraso asociados con el proceso de germinación de las esporas, así como la eliminación de calor del sustrato tiende a ser ineficiente, lo que lleva al establecimiento de gradientes de temperatura y el sobrecalentamiento del sustrato, de igual manera el control de la actividad del agua; el pH; la temperatura; las concentraciones de sustratos y productos es limitado. No obstante, los procesos de fermentación sumergidas tienen algunas ventajas sobre los procesos de fermentación en estado sólido, como una mayor homogeneidad del medio de cultivo y mejor facilidad para controlar parámetros como la temperatura y el pH (Haack *et al.*, 2006; Coradi *et al.*, 2012).

Mientras que las lipasas producidas de manera heteróloga pueden usarse como enzimas libres después de la purificación o contenidas dentro del organismo, por lo cual se calculó el rendimiento de producción de lipasas por fermentación sumergida a nivel biorreactor con cepas transformantes de *Saccharomyces cerevisiae*. Bajo la metodología de optimización del crecimiento celular y la inducción de la síntesis de las lipasas (López-Álvarez *et al.*, 2012; Diniz *et al.*, 2012; Raimondi *et al.*, 2013).

### 1.1. ANTECEDENTES

Las lipasas producidas de manera heteróloga pueden usarse como enzimas libres después de la purificación o pueden usarse mientras están contenidos dentro del organismo (Christensen *et al.*, 2003). Por lo cual se han construido cepas de *S. cerevisiae* que metabolizan sustratos lipídicos mediante la expresión de los genes LIP2 de *Yarrowia lipolytica*, la cual produce una actividad de 15 U mL<sup>-1</sup> (Darvishi, 2012).

También se ha reportado la sobreexpresión de genes exógenos en *K. marxianus* para la producción de enzimas como una alfa-galactosidasa de la planta *Cyamopsis tetragonoloba* a 153 mg/L con un 99% de eficiencia de secreción (Bergkamp *et al.*, 1993); una beta-glucuronidasa en niveles de 10 U/mg de proteína y a 30 U/L (Ball *et al.*, 1999; Pecota y Da silva, 2005); una gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (Almeida *et al.*, 2003), una lactato deshidrogenasa de *Bacillus megaterium* que condujo a la producción extracelular de 24 g/L de ácido láctico (Pecota *et al.*, 2007), una endo-beta-1,4-glucanasa termoestable en conjunto con una celobiohidrolasa y beta-glucosidasa, que conducen a una cepa que puede crecer en celobiosa o carboximetilcelulosa como única fuente de carbono (Hong *et al.*, 2007) y una glucosa oxidasa de *Aspergillus niger* (Rocha *et al.*, 2010).

Una característica importante para alcanzar altas productividades volumétricas de proteínas recombinantes, es la velocidad de crecimiento y el rendimiento de biomasa del microorganismo utilizado. Por lo cual, se han estudiado algunas propiedades fisiológicas de las levaduras *S. cerevisiae* como la respuesta a diferentes concentraciones de fuente de carbono y nitrógeno, donde reportan que existe una interacción de segundo orden entre la concentración y el tipo de fuente de carbono, y nitrógeno. Sin embargo, una concentración alta de sulfato de amonio (5%) es tóxica para la levadura. Además, la prolina favoreció el fenotipo de crecimiento fermentativo independientemente de la presencia o ausencia de RIM15 (Olivares-Marin *et al.*, 2018). Las cuales son variables que se consideran en la producción de lipasas extracelulares con cepas transformantes de *S. cerevisiae*.

### 1.2. JUSTIFICACIÓN

Las lipasas son un grupo de enzimas que actúan en una interfase acuosa-orgánica para catalizar la hidrólisis de los enlaces éster de carboxilato, la liberación de ácidos grasos libres y alcoholes orgánicos. Por lo cual se usan ampliamente en la industria oleoquímica, en la manufactura de detergentes y en la industria alimenticia, teniendo un importante valor industrial que alcanza los 100 millones de dólares.

A la fecha, la producción industrial de lipasas se realiza mediante fermentación en estado sólido, la cual requiere de largos tiempos de fermentación; ofrece control limitado de la actividad de agua, de la temperatura; del pH y de la concentración de sustratos, generando bajos rendimientos. Por el contrario, en fermentaciones sumergidas se tienen algunas ventajas sobre los procesos de fermentación en estado sólido como mayor homogeneidad del medio de cultivo y mejor control de parámetros como la temperatura y el pH; además la recuperación de las enzimas es menos complicada.

### 1.3. HIPÓTESIS

Mediante el suministro controlado de las fuentes de glucosa y nitrógeno, así como la inclusión de galactosa en el medio de cultivo, se podrá mejorar el rendimiento de la producción de lipasas de *K. marxianus* con cepas transformantes de *S. cerevisiae*, con respecto a la obtención de estas enzimas con la cepa silvestre.

### 1.4. OBJETIVOS

#### 1.4.1. Objetivo General

Establecer las condiciones de producción de lipasas con cepas transformantes de *S. cerevisiae* y silvestre de *K. marxianus*, a un volumen de trabajo de 1.5 litros en un biorreactor Applikon®.

### 1.4.2. Objetivos Particulares

- Evaluar el efecto de la concentración de la fuente de carbono (glucosa) y nitrógeno (extracto de levadura) en el crecimiento de las cepas transformantes de *S. cerevisiae* y silvestre de *K. marxianus*, respectivamente.
- Determinar si la concentración de inductor (galactosa) tiene un efecto sobre la producción de lipasas con cepas transformantes de *S. cerevisiae*.
- Estimar los rendimientos de producción de lipasas con cepas transformantes de *S. cerevisiae* y silvestre de *K. marxianus* a un volumen de trabajo de 1.5 litros en un biorreactor.

## **II. MARCO TEÓRICO**

### **2.1 Generalidades**

Las lipasas son enzimas que actúan en una interfase acuoso-orgánico para catalizar la hidrólisis de los enlaces éster de carboxilato, la liberación de ácidos grasos libres y alcoholes orgánicos (Rahaman *et al.*, 2006). Las lipasas exhiben diferentes selectividades hacia la clase de lípidos (triacilglicerol, diacilglicerol y monoacilglicerol) (Villeneuve, 2003). Además, las lipasas se clasifican en función del hueco oxianión siendo tres clases: GX; GGGX e Y (Gupta *et al.*, 2015).

#### **2.1.1 Estructura de las lipasas**

A pesar de las diferencias en el tamaño y la baja identidad de secuencia primaria, las lipasas muestran patrones estructurales de plegado similares. La estructura de las lipasas es un pliegue hidrolasa  $\alpha/\beta$  y es común en otras hidrolasas como; esterasas; proteasas; deshalogenasas; epóxido hidrolasas y peroxidasas (Carr y Ollis, 2009). El pliegue canónico de  $\alpha/\beta$  es caracterizado por la presencia de una lámina  $\beta$  central plegada que contiene 8 láminas  $\beta$  paralelas, con la excepción de la lámina  $\beta_2$ , debido a que es anti paralela con respecto a las otras laminas. Las láminas  $\beta_3$  a  $\beta_8$  son conectadas por  $\alpha$  hélices que empaacan los dos lados de la lámina  $\beta$  central (Anobom *et al.*, 2017).

Otra característica importante de las lipasas es el hueco oxianión, el cual promueve la estabilización del intermediario cargado negativamente generado durante la hidrólisis del enlace éster. El hueco oxianión consiste en dos residuos, uno de los cuales siempre sigue al residuo nucleofílico mientras que el otro tiene una posición variable.

En las lipasas de clase GX el hueco oxianión está posicionalmente cerca del residuo del carbono terminal X que contacta con el codo nucleofílico de un residuo de glicina. En la clase GGGX, el hueco oxianión se desplaza en una posición hacia el extremo del carbono terminal, en comparación con el tipo GX y es un residuo de glicina que está seguido de un residuo hidrofóbico X conservado. Mientras que en la clase Y,

el residuo del orificio de oxianión posicionalmente variable es una tirosina (Anobom *et al.*, 2014).

### 2.1.2 Mecanismo de acción de las lipasas

El sitio activo de las hidrolasas  $\alpha/\beta$  consiste en una triada catalítica altamente conservada: un residuo nucleofílico (serina, cisteína y ácido aspártico), un residuo de ácido catalítico (ácido aspártico y ácido glutámico) y una histidina que actúa como residuo catalítico de base general. En las lipasas, el residuo nucleofílico siempre es una serina que se encuentra en el llamado "codo nucleofílico" y se identifica por el pentapéptido GX SXG altamente conservado. El sitio activo de las lipasas contiene un ácido graso hidrófobo de cadena corta que acomoda la cadena de acilo del enlace de éster que se hidrolizará. Además, los huecos de las otras cadenas de acilo del sustrato contribuyen frecuentemente a mantener el sustrato anclado a los residuos del sitio pentapéptido y la catálisis de las lipasas sigue el mecanismo clásico de serina hidrolasa (Jaeger *et al.*, 1999).

La hidrólisis del sustrato comienza con la unión de lípidos y el ataque catalítico de serina sobre el átomo de carbono del carbonilo del enlace de éster susceptible. Esto genera un intermedio tetraédrico que se caracteriza por la formación de una carga negativa en el átomo de oxígeno del carbonilo y la unión de cuatro átomos al átomo de carbono carbonilo dispuesto como un tetraedro. El intermediario es estabilizado por dos enlaces de hidrógeno entre el átomo de oxígeno del carbonilo cargado negativamente y la cadena principal de grupos amino de los dos residuos de aminoácidos del hueco oxianión. Mientras que en las lipasas de la clase Y, uno de los dos enlaces de hidrógeno se forman con el grupo hidroxilo de una cadena lateral de tirosina (Jaeger *et al.*, 1999).

El nucleófilo del residuo de serina se ve reforzado por la histidina catalítica a la que se transfiere un protón del grupo hidroxilo de la serina, esta transferencia es facilitada por el catalizador de residuo ácido que orienta el anillo de imidazol de la histidina de forma tal que neutraliza la carga que se genera en él. Posteriormente, el protón se dona al átomo de oxígeno del enlace susceptible de éster, el cual es cortado,

con la consiguiente liberación del producto alcohólico, mientras que la cadena de acilo de la serina nucleofílica está esterificada.

El siguiente paso es la desacilación, en el que una molécula de agua hidroliza el enlace covalente con la consiguiente liberación del producto de acilo y la regeneración de la enzima (Jaeger *et al.*, 1999). Debido a la actividad hidrolítica las lipasas se han utilizado en sectores como la industria láctea; de agroquímicos; la fabricación de papel; la nutrición; los cosméticos y farmacéutica. Por lo cual, la industria de las enzimas ha crecido constantemente (Ray, 2012).

### 2.2 Aplicación industrial de las lipasas

Las lipasas son un grupo de enzimas de importante valor industrial debido a su naturaleza versátil, en el 2015 el mercado global de enzimas industriales alcanzó 8 mil millones de dólares. De este gran mercado, las lipasas son el segmento que más ha crecido y el valor actual del mercado de lipasas es de 100 millones de dólares (Ray, 2012), ya que las lipasas se usan ampliamente en diferentes procesos industriales.

Las lipasas se utilizan en la industria de alimentos para la aceleración de la maduración del queso y la generación de sabor, así como en la lipólisis de la mantequilla, la grasa y la crema (El-Hofi, 2011). También se utilizan para la síntesis de ésteres de cadena corta como compuestos de sabor y ésteres de azúcar como emulsionantes, en la industria de la panificación se utilizan para mejorar el volumen, la suavidad y la vida útil del pan y otros productos horneados (Rajendra *et al.*, 2009). Además, se han usado en la eliminación selectiva de ácidos grasos hidrogenados poco saludables de aceites vegetales, en la síntesis de vitaminas y ésteres fenólicos que presentan mayor actividad antioxidante en comparación con las moléculas libres correspondientes, en la trans-esterificación de triacilglicerol a ésteres alquílicos de ácidos grasos, así como diacilglicerol y monocilglicerol que son ésteres de azúcar empleados como emulsionantes (Rajendra *et al.*, 2009; Hou y Yuji, 2009; Anobom *et al.*, 2014). Debido a su amplia aplicación, las lipasas han sido aisladas de animales, plantas y microorganismos.

De igual manera, las lipasas se utilizan en las formulaciones de detergente para eliminar las manchas que contienen grasa, además son biodegradables; no dejan residuos nocivos; no tienen impacto negativo en los procesos de tratamiento de aguas residuales y no representan ningún riesgo para la vida acuática (Hasan *et al.*, 2010).

De acuerdo con la lista de enzimas compiladas por la Asociación de Fabricantes y Formuladores de Productos de Enzimas, las principales fuentes de lipasas usadas en procesos industriales son de hongos, seguidos de levaduras, bacterias y animales (AMFEP, 2015).

### 2.3 Fuentes de lipasas

Las lipasas son producidas por animales, plantas y microorganismos. Las lipasas animales utilizadas en procesos industriales incluyen lipasas pancreáticas y pregástricas, las lipasas animales son purificadas de las gargantas de ternera, cabra y cordero (El-Hofi, 2011).

Las lipasas de semillas oleaginosas tienen la característica particular de que son muy activas cuando la actividad acuosa es baja; son resistentes a altas temperaturas y condiciones alcalinas, por lo que estas enzimas son adecuadas para funcionar como biocatalizadores en varios disolventes orgánicos y han sido purificadas de las semillas de arroz; trigo; cebada; avena y maíz (Mohamed *et al.*, 2000; Bhardwaj *et al.*, 2001; Barros *et al.*, 2010; Moussavou *et al.*, 2013).

Las lipasas de levaduras y hongos son las más relevantes para uso comercial, seguidas por las producidas por bacterias. Las bacterias productoras de lipasas son: *Pseudomonas fluorescens*, *Burkholderia cepacia*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Pseudomonas mendocina*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Pseudomonas glumae* y *Bacillus cepacia* (Gupta *et al.*, 2004; Hwang *et al.*, 2014). Mientras que los hongos productores de lipasas son: *Rhizopus oryzae*, *Rhizomucor miehei*, *Thermomyces lanuginosus*, *Fusarium heterosporum*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Penicillium roqueforti*, *Penicillium camemberti*, *Penicillium cyclopium*, *Rhizomucor javanicus* (Singh y Mukhopadhyay *et al.*, 2012; Ferreira-Dias *et al.*, 2013; Hwang *et al.*, 2014). Así mismo

las levaduras productoras de lipasas son: *Candida antárctica* y *Candida rugosa* (Lock *et al.*, 2007).

### 2.4 Producción de lipasas

En la producción industrial de enzimas, los microorganismos son la fuente preferida debido a que tienen un tiempo de generación más corto, alto rendimiento de conversión de sustrato en producto, gran versatilidad para las condiciones ambientales y simplicidad en la manipulación genética, y en las condiciones de cultivo. Además, los microorganismos producen varios tipos de lipasas con distintas propiedades fisicoquímicas. Las lipasas pueden ser producidas por bacterias, hongos filamentosos y levaduras, lo que permite a estos microorganismos utilizar los lípidos de origen animal o vegetal como fuentes de carbono y energía para su proliferación (Ribeiro *et al.*, 2011).

#### 2.4.1 Producción de lipasas por fermentación sólida

Un sistema para la producción de lipasas es mediante la fermentación en estado sólido, en la cual se utilizan residuos agroindustriales (granos de arroz, tubérculos de yuca, soja, arroz, trigo, harina y paja de trigo) pretratados mediante hidrólisis térmica o química y se inoculan con esporas de hongos filamentosos como *Penicillium restrictum* (Palma *et al.*, 2000; Azeredo *et al.*, 2007), *P. simplicissimum* (Gutarra *et al.*, 2005), *Candida rugosa*, *Rhizopus homothallicus* (Mateos *et al.*, 2006; Rodríguez *et al.*, 2006), *Aspergillus niger* (Mahadik *et al.*, 2006), *Rhizopus rhizopodiformis*, *R. oligosporus* y *Rhizomucor pusillus* (ul-Haq *et al.*, 2002). Diversos tipos de biorreactores se han utilizado en los procesos de fermentación en estado sólido como: biorreactores de lecho empacados; tambores giratorios, lechos fluidizados gas-sólido (Pandey, 1991).

Los biorreactores de bandejas consisten en salas que contienen un número de bandejas, donde la humedad; la temperatura en la habitación son controladas por la circulación e introducción de aire fresco dentro de la habitación, la cual es promovido por sopladores y la efectividad de la circulación depende del tamaño y la geometría de la habitación, así como la ubicación de las entradas y salidas (Cuero, 1985).

Los biorreactores de lecho empacado es una columna llena de sustrato, con aire soplado de un extremo a otro (Pandey, 1992). A medida que el hongo crece en la

superficie del sustrato, se extiende a los espacios vacíos entre partículas y aumenta la resistencia del lecho al flujo de aire. Lo cual incrementa el requerimiento energético para la aireación y la probabilidad de canalización, donde aparecen grietas dentro del lecho de la pared del reactor y el aire fluye preferencialmente a través de estas grietas (Auria *et al.*, 1993; Auria *et al.*, 1995). La temperatura del aire de entrada puede proporcionar un control adecuado de la temperatura en la parte superior de la columna, pero causará un enfriamiento excesivo en el extremo de la entrada de aire y por lo tanto el aire de la entrada debe estar cerca de la temperatura óptima para el crecimiento (Sangsurasak y Mitchell, 1995).

Los reactores de tambor agitado y giratorio es un cilindro horizontal o ligeramente inclinado que contiene un lecho de sustrato entre el 10 y 40% del volumen del tambor y se introduce aire en el espacio superior sobre el lecho (de Reu *et al.*, 1993).

Los biorreactores de lecho fluidizado gas-sólido, el sustrato es soportado por una placa base perforada y el aireado es introducido desde abajo, se utiliza un agitador mecánico para mezclar el lecho. En el diseño del tambor oscilante, el sustrato se mantiene entre dos cilindros horizontales perforados concéntricos, con aire que se introduce en el cilindro central y que pasa radialmente hacia afuera a través del lecho y la agitación es causada por la rotación del segundo cilindro en relación con el primero (Sargantanis *et al.*, 1993).

Un análisis económico mostró que la producción de lipasas de *Penicillium restrictum* por fermentación sólida es 68% más baja económicamente que su producción por fermentación sumergida (Castilho *et al.*, 2000). Además, tienen la desventaja de largos tiempos de retraso asociados con el proceso de germinación de las esporas, así como la eliminación de calor del sustrato tiende a ser ineficiente, lo que lleva al establecimiento de gradientes de temperatura y el sobrecalentamiento del sustrato, de igual manera el control de la actividad del agua; el pH; la temperatura; las concentraciones de sustratos y productos es limitado (Mitchell *et al.*, 1999, Mitchell *et al.*, 2000; Mitchel *et al.*, 2002).

Por esta razón, los sistemas a gran escala generalmente tienen que desarrollarse a partir de los resultados en sistemas piloto, otra limitante del escalamiento del fermentador es la transferencia de calor y masa ya que dependen de la etapa de fermentación.

### 2.4.2 Producción de lipasas por fermentación sumergida

Las enzimas industriales se producen principalmente a través de fermentación sumergida con *Aspergillus Rhizopus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Geotrichum* y *Fusarium* (ul-Haq *et al.*, 2002; D'Annibale *et al.*, 2006; Haack *et al.*, 2006).

Los procesos de fermentación sumergidas tienen algunas ventajas sobre los procesos de fermentación en estado sólido, como una mayor homogeneidad del medio de cultivo y mejor facilidad para controlar parámetros como la temperatura y el pH (Pandey *et al.*, 2000). Además, la recuperación de las enzimas extracelulares y la determinación de la biomasa se ven facilitados por ser realizado mediante filtración o centrifugación (Coradi *et al.*, 2012).

### 2.4.3 Producción heteróloga de lipasas

Las lipasas producidas de manera heteróloga pueden usarse como enzimas libres después de la purificación o pueden usarse mientras están contenidos dentro del organismo (Christensen *et al.*, 2003). No obstante, *S. cerevisiae* no puede metabolizar sustratos lipídicos de bajo costo como los triacilgliceroles de los medios de cultivo (Roermund *et al.*, 2003; Ciafardini *et al.*, 2006). No obstante, se han construido cepas de *S. cerevisiae* que metabolizan sustratos lipídicos mediante la expresión de los genes LIP2 de *Yarrowia lipolytica*, la cual produce una actividad de 15 U mL<sup>-1</sup> (Darvishi, 2012).

Mientras que *K. marxianus* es una levadura aeróbica y su capacidad para generar energía mediante la respiración, así como sus capacidades productoras de proteínas eucariotas y secretoras le ha dado la propiedad de ser una levadura alternativa para para la expresión de genes heterólogos, ya que modifica las proteínas de acuerdo con un esquema eucariótico general (Rocha *et al.*, 2010; Raimondi *et al.*, 2010; Rocha *et al.*, 2011).

Sin embargo, la mayor característica importante para alcanzar altas productividades volumétricas de proteínas recombinantes, es la velocidad de crecimiento y el rendimiento de biomasa del microorganismo utilizado. Debido a algunas propiedades fisiológicas de las levaduras *S. cerevisiae* y *K. marxianus* como la capacidad de crecer dentro de un intervalo de temperaturas que van desde 15 a 45° C (Raimondi *et. al.*, 2013), la capacidad catabólica de una amplia gama de sustratos como lactosa, suero e inulina (López-Álvarez *et. al.*, 2012; Diniz *et al.*, 2012) y altas velocidades de crecimiento. Lo que conduce a altos rendimientos de biomasa en sustratos de azúcar y (Groeneveld *et al.*, 2009). Por lo cual son microorganismos atractivos para aplicaciones biotecnológicas como la producción heteróloga de lipasas por fermentación sumergida (Nevoigt, 2008).

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Evaluación del efecto de las fuentes de carbono y nitrógeno

##### 3.1.1 Mantenimiento de las cepas

Las cepas transformantes de *S. cerevisiae* (Lip3 y 107w) se conservaron en placas con medio mínimo (1.8 g/L de YNB sin aminoácidos, 10 g/L de drop-out y 20 g/L de glucosa) (Sigma Aldrich), mientras que las cepas silvestres de *S. cerevisiae* BY4742 y *K. marxianus* en placas de YPD (10 g/L de extracto de levadura, 20 g/L de peptona de caseína y suplementado con 20 g/L de glucosa) (Sigma Aldrich) a 4° C para su posterior procesamiento.

##### 3.1.2 Diseño factorial 2<sup>2</sup>

Para observar el efecto de la concentración de la fuente de carbono y nitrógeno sobre la velocidad específica de crecimiento ( $h^{-1}$ ); número de células (células/mL) biomasa (g/L) y la concentración de glucosa residual (g/L), se realizó un diseño factorial 2<sup>2</sup> con cinco puntos centrales en el paquete estadístico de datos JMP v. 10 para Windows (*JMP Statistical Discovery. TM From SAS.*) (**Tabla 1**).

**Tabla 1.** Matriz del diseño factorial 2<sup>2</sup> con cinco puntos centrales para la determinación del efecto de la concentración de las fuentes de carbono y nitrógeno.

Tratamiento	Glucosa (g/L)	Extracto de levadura (g/L)
1	55	5.5
2	100	1
3	100	10
4	55	5.5
5	55	5.5
6	55	5.5
7	10	1
8	55	5.5
9	10	10

#### 3.1.3 Crecimiento celular

Se prepararon los diferentes tratamientos conforme al diseño factorial  $2^2$  y de cada tratamiento se recolectó 1 mL de cultivo en intervalos de 2 h y se cuantificó el número de células en una cámara de Neubauer, la densidad celular a una longitud de onda de 600 nm con un espectrofotómetro UV/VIS VELAB, se determinaron los parámetros cinéticos con las siguientes ecuaciones:

$$x_f = x_0 e^{\mu t} \quad (1)$$

Donde  $x_f$  es la población celular final;  $x_0$  es la población celular inicial;  $\mu$  es la velocidad específica de crecimiento y  $t$  es el tiempo.

$$t_d = \ln \frac{2}{\mu} \quad (2)$$

Donde  $t_d$  es el tiempo de duplicación (Madrigal-Pérez *et. al.*, 2016).

#### 3.1.4 Glucosa residual

La cuantificación de la glucosa residual en el medio de cultivo se realizó por el método de Miller. Se recolectó 1 mL de medio de cultivo en un tubo de 1.5 mL y se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 min, se recuperó 0.5 mL de sobrenadante y se colocaron en tubos de ensaye de 8 mL donde se añadió 1 mL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS, Sigma Aldrich) y se colocaron en baño maría durante 15 minutos, los tubos de ensaye se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 540 nm, los datos de la absorbancia se interpolaron a la curva patrón con glucosa (Miller, 1959).

### 3.2 Determinación del efecto de la concentración de inductor y el extracto de levadura sobre la producción de lipasas.

Para determinar la concentración de galactosa y el extracto de levadura sobre la producción de lipasas, se realizó un diseño factorial  $2^2$  con cinco puntos centrales donde se evaluó la respuesta de la actividad enzimática lipídica (U/mg). Se prepararon los diferentes tratamientos en base a la matriz del diseño factorial  $2^2$  (**Tabla 2**) y se inocularon con 200 millones de células/mL, se recuperó 1 mL de cultivo en un tubo de 1.5 mL y se almacenó a  $-4^\circ$  C para su posterior procesamiento.

**Tabla 2.** Matriz del diseño factorial  $2^2$  con cinco puntos centrales para la determinación del efecto de la concentración del inductor.

Tratamiento	Galactosa (g/L)	Extracto de levadura (g/L)
1	20	10
2	10	15
3	20	10
4	20	10
5	20	10
6	30	5
7	20	10
8	10	5
9	30	15

### 3.2.1 Obtención del extracto enzimático extracelular e intracelular

Para obtener el extracto enzimático extracelular, el medio de cultivo se centrifugó a  $5,000 \times g$  durante 20 minutos en una centrifuga y el sobrenadante (extracto enzimático) se transfirió a un tubo nuevo de 1.5 mL.

Mientras que para obtener el extracto enzimático intracelular, las células cosechadas re-suspendieron en 1 mL de agua destilada estéril y se centrifugaron a  $5000 \times g$  durante 5 minutos en una centrifuga, el sobrenadante se decantó y se repitió dos veces el lavado. La pastilla de células se re-suspendió en 0.5 mL de amortiguador de carga hipotónico (50 mM de amortiguador de carga fosfato de sodio (PBS, pH 7.4), 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 15 mM KCl y 5% de glicerol) y se mantuvieron en hielo durante 5 minutos, los tubos se sonicaron durante 20 minutos en un baño de ultrasónico CIVEQ 8892 y se agregaron 0.1 g de perlas de vidrio lavadas con ácido, se agitaron en un vortex CScientific VTX-5 durante 30 segundos seguido de 30 segundos sobre hielo y se repitió cuatro veces durante un total de cuatro minutos, los tubos se centrifugaron durante 5 minutos a la máxima velocidad y el sobrenadante se transfirió a un tubo eppendorf limpio de 1.5 mL, se almacenó a  $-4^\circ \text{C}$  para su posterior procesamiento (Qi *et. al.*, 2015).

#### 3.2.2 Actividad enzimática

En tubos de ensaye se colocaron 0.775 mL de amortiguador de carga pH 8 (7.88 mg/mL de Tris HCL, 1 mg/mL de goma arábica y 0.4% v/v de Triton X-100) (Sigma Aldrich), 0.2 mL de extracto enzimático y 0.025 mL de solución sustrato (3 mg/mL de p-nitrofenil palmitato (p-NPP) (Sigma Aldrich), la reacción se incubó a 37° C por 5 min y la absorbancia se midió a una longitud de onda de 410 nm.

Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1  $\mu$ mol de p-nitrofenol en un minuto y se calculó con la siguiente ecuación:

$$U = \frac{P*VR}{T*E} / PR \quad (3)$$

Donde P es  $\mu$ Mol de producto que se liberó; VR es el volumen de la reacción; T es el tiempo de la reacción; E es el volumen del extracto que se utilizó en la mezcla de reacción y PR es la concentración de proteína en el extracto enzimático (Fernández-Jerí *et. al.*, 2013).

#### 3.2.3 Cuantificación de proteína

La concentración de proteína se determinó por el método de Bradford (1976), en tubos de ensaye se colocaron 0.2 mL de extracto enzimático, 0.8 mL de agua destilada y 0.250 mL de reactivo de Bradford 5X, la mezcla se agito en vortex por 5 minutos y se incubó en obscuridad por 5 min, la absorbancia se midió a una longitud de onda de 595 nm (Bradford, 1976).

### 3.3 Producción de lipasas a nivel biorreactor

La producción de lipasas se escaló en un biorreactor de tanque agitado Applikon® de 3 L (**Tabla 3**) con un volumen de trabajo de 1.5 L y se utilizaron las mejores concentraciones de glucosa, extracto de levadura y galactosa para cada cepa, mientras que las variables de agitación (300 rpm), temperatura (30° C) y aireación (2 vvm) se mantuvieron fijas, el biorreactor y los accesorios (sensores de pH y oxígeno disuelto, mangueras, algodón y aluminio) se esterilizaron en una autoclave a 121° C por 15 min.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

Los sensores y el motor del agitador se conectaron al biocontrolador, la temperatura se mantuvo constante a 30° C por baño maría con un Controlador de Temperatura Science® y la aireación se controló con un Rotámetro Aalborg® conectado a un compresor. El biorreactor se inoculó con el volumen de pre-inoculo (cepas transformantes crecidas en medio mínimo y silvestres en medio YPD durante 24 horas a 30° C y 200 rpm) necesario para obtener una concentración inicial de  $3 \times 10^6$  células/mL bajo condiciones asépticas y para la cepa silvestre de *K. marxianus* se agregaron 45 mL de aceite de aguacate.

**Tabla 3.** Características del biorreactor Applikon®.

<b>Sección del biorreactor</b>	<b>Dimensión</b>
Tanque del biorreactor	3 L
Volumen de trabajo	1.5 L
Diámetro del biorreactor	0.13 m
Tipo de agitador	Rushton
Número de paletas del agitador	6
Diámetro del agitador	0.045 m
Ancho de la paleta	0.011 m
Longitud de la paleta	0.011 m
Número de agitadores	2
Posición desde la base del 1er agitador	0.04 m
Posición desde la base del 2do agitador	0.125 m
Número de deflectores	3
Ancho de un deflector	0.013 m
Tipo de distribuidor de aire	Tubo perforado
Número de orificios del distribuidor	7
Diámetro de orificios del distribuidor	0.001 m

#### 3.3.2 Determinación de rendimientos

El rendimiento de biomasa/sustrato ( $Y_{x/s}$ ) y producto/sustrato ( $Y_{p/s}$ ) se calcularon con las ecuaciones (4) y (5) respectivamente.

$$Y_{\frac{x}{s}} = \frac{X}{S} \quad (4)$$

$$Y_{\frac{p}{x}} = \frac{P}{X} \quad (5)$$

Donde X es la formación de biomasa, S es el peso de glucosa y P es el peso de proteína con actividad lipásica.

#### 3.3.3 Análisis estadístico

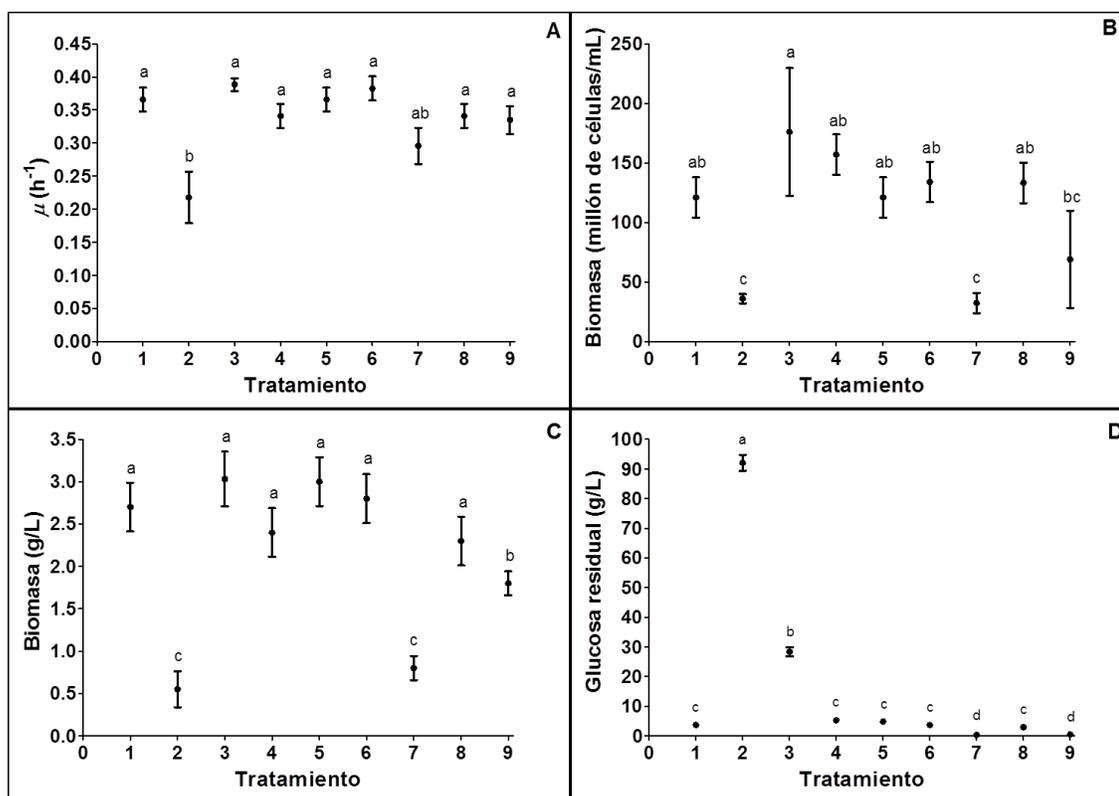
Se compararán las medias de los tratamientos de cada diseño factorial con un análisis estadístico ANOVA de una vía, con una prueba de Tukey. El comportamiento de las variables de respuesta se analizó mediante un perfil de maximización y minimización de los factores con el programa análisis de datos JMP v. 10 para Windows (*JMP Statistical Discovery.™ From SAS.*).

## IV. RESULTADOS

### 4.1 Efecto de la fuente de carbono y nitrógeno sobre las variables de respuesta

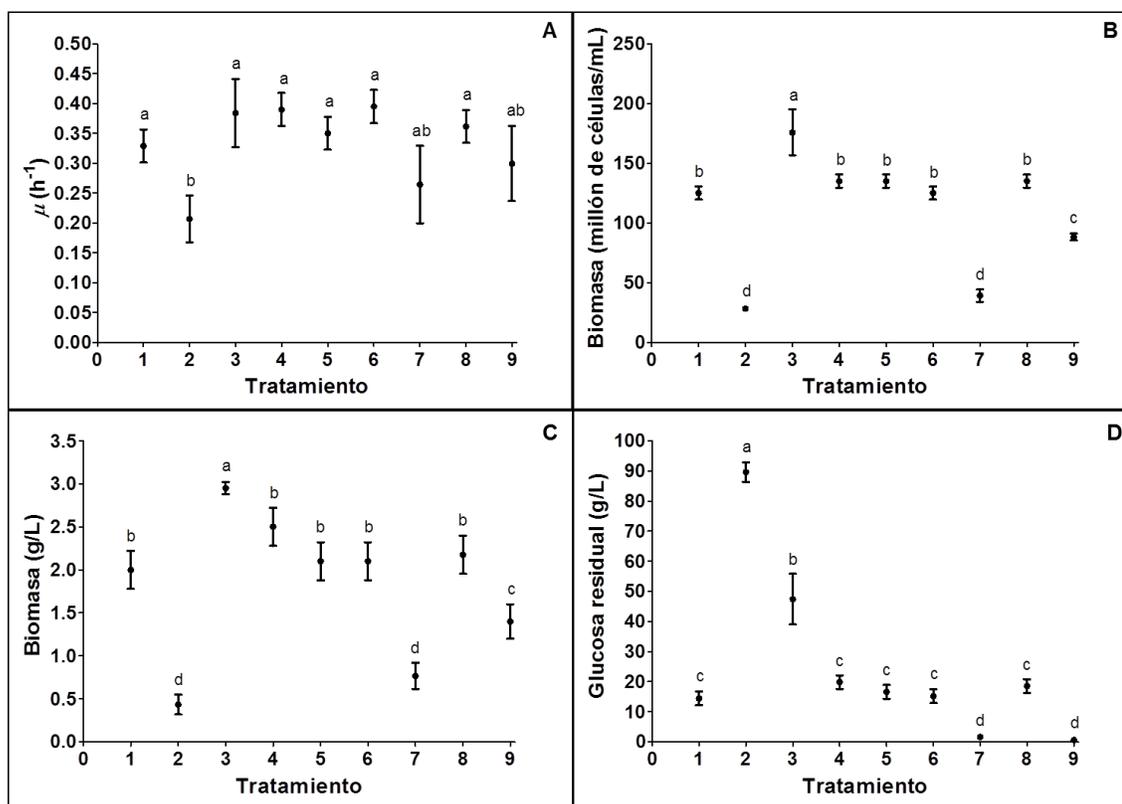
Para evaluar el efecto de la concentración de glucosa y el extracto de levadura sobre las variables de respuesta de la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ); la concentración de células; la biomasa y la glucosa residual, se realizó mediante un diseño factorial  $2^2$  con cinco puntos centrales (**Tabla 1**) y las corridas experimentales se realizaron bajo las condiciones de cada tratamiento del diseño factorial  $2^2$  para las cepas transformantes y silvestres.

Donde la mayor velocidad específica de crecimiento para las cepas transformantes Lip3 y 107w se obtuvieron en el tratamiento 3 ( $0.3883 \pm 0.005595$  y  $0.3841 \pm 0.03296 \text{ h}^{-1}$ ), así mismo la mayor cantidad de células fue de  $176 \pm 38$  y  $175.8 \pm 10.2$  millones de células/mL; y de biomasa fue de  $3.033 \pm 0.1856$  y  $2.950 \pm 0.05$  g/L, respectivamente. Mientras que la mayor concentración de glucosa residual fue de  $92.1 \pm 1.553$  y  $89.6 \pm 1.87$  g/L en el tratamiento 2. Además, el valor de la velocidad específica de crecimiento y de biomasa no fue diferente entre el tratamiento 3 con los puntos centrales. Sin embargo, la concentración de glucosa residual entre el tratamiento 3 y los puntos centrales si fue diferente en la cepa Lip3 ( $28.35 \pm 0.875$  y  $4.086 \pm 0.42$  g/L) y 107w ( $47.41 \pm 4.87$  y  $16.92 \pm 1.02$  g/L) (**Figuras 1 y 2**, respectivamente).



**Figura 1. Valores de las variables de respuesta en cada tratamiento de la cepa transformante Lip3.**

A: velocidad específica de crecimiento, B: número de células, C: biomasa en g y D: glucosa residual. Los datos representan la media  $\pm$  la desviación estándar (DE) de tres experimentos independientes; las letras representan la diferencia de los tratamientos de un análisis ANOVA de una vía, con un análisis de medias de Tukey ( $P < 0.001$ ).



**Figura 2. Valores de las variables de respuesta en cada tratamiento de la cepa transformante 107w.** A: velocidad específica de crecimiento, B: número de células, C: biomasa y D: glucosa residual. Los datos representan la media  $\pm$  la desviación estándar (DE) de tres experimentos independientes; las letras representan la diferencia de los tratamientos de un análisis ANOVA de una vía, con un análisis de medias de Tukey ( $P < 0.001$ ).

Para las cepas silvestre de *S. cerevisiae* BY4742 y *K. marxianus*, la mayor velocidad específica crecimiento fue de  $0.2697 \pm 0.004$  y  $0.6797 \pm 0.0239$   $h^{-1}$  y corresponden al tratamiento 3, así mismo la mayor cantidad de células fue de  $131.7 \pm 29.79$  y  $319.2 \pm 10.1$  millones de células/mL; y de biomasa fue  $2.100 \pm 0.3$  y  $6.1 \pm 0.5$  g/L, las cuales se obtuvieron en el mismo tratamiento, mientras que la mayor concentración de glucosa residual fue en el tratamiento 2 ( $89.11 \pm 0$  y  $75.11 \pm 1.77$  g/L). Además, el valor de la velocidad específica de crecimiento y de biomasa producida no fue diferente entre el tratamiento 3 con los puntos centrales para la cepa silvestre de *S. cerevisiae*, no obstante para la cepa silvestre de *K. marxianus* si fueron diferentes. Sin embargo, la concentración de glucosa residual entre el tratamiento 3 y los puntos centrales si fue diferente en la cepa silvestre de *S. cerevisiae* ( $27.09 \pm 0$  y  $6.638 \pm 0.0367$

g/L) pero iguales en *K. marxianus* ( $3.001 \pm 0.04657$  y  $1.191 \pm 0.079$  g/L) (Figura 3 y 4 respectivamente).

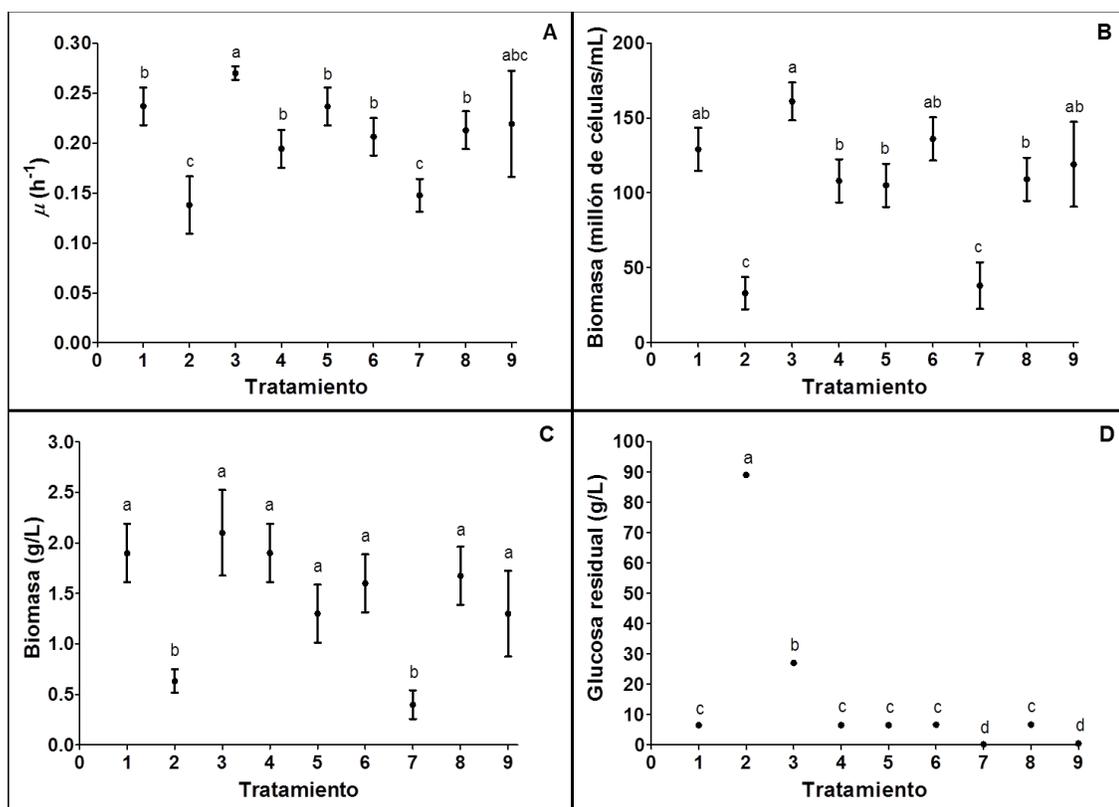


Figura 3. Valores de las variables de respuesta en cada tratamiento de la cepa silvestre *S. cerevisiae*. A: velocidad específica de crecimiento, B: número de células, C: biomasa y D: glucosa residual. Los datos representan la media  $\pm$  la desviación estándar (DE) de tres experimentos independientes; las letras representan la diferencia de los tratamientos de un análisis ANOVA de una vía, con un análisis de medias de Tukey ( $P < 0.001$ ).

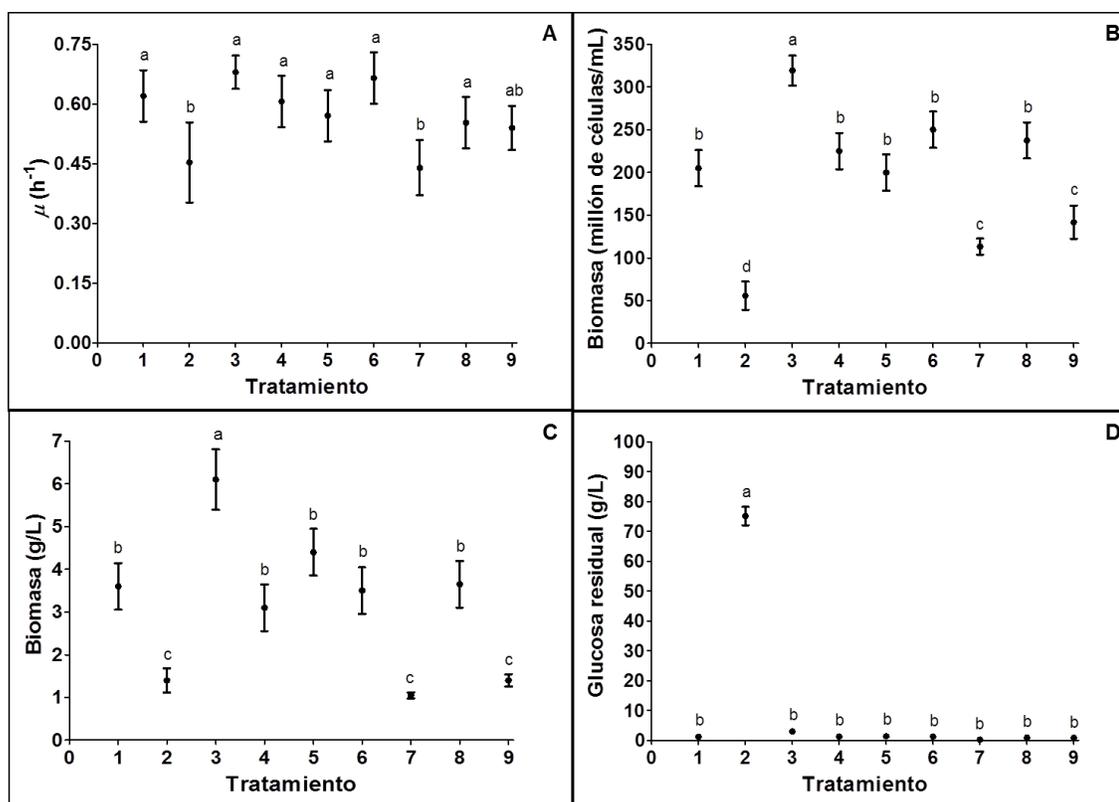


Figura 4. Valores de las variables de respuesta en cada tratamiento de la cepa silvestre *K. marxianus*. A: velocidad específica de crecimiento, B: número de células, C: biomasa y D: glucosa residual. Los datos representan la media  $\pm$  la desviación estándar (DE) de tres experimentos independientes; las letras representan la diferencia de los tratamientos de un análisis ANOVA de una vía, con un análisis de medias de Tukey ( $P < 0.001$ ).

Por lo cual, la concentración del extracto de levadura tuvo un efecto positivo sobre la velocidad específica de crecimiento; el número de células y la biomasa para las cepas transformantes y silvestres. Sin embargo, la concentración de glucosa no tuvo efecto sobre la velocidad de específica de crecimiento; el número de células y la biomasa para las cepas transformantes y silvestre de *S. cerevisiae*, pero para la cepa silvestre de *K. marxianus* si tuvo un efecto positivo, no obstante para la respuesta de glucosa residual si presentó un efecto (**Figura 5-8**).

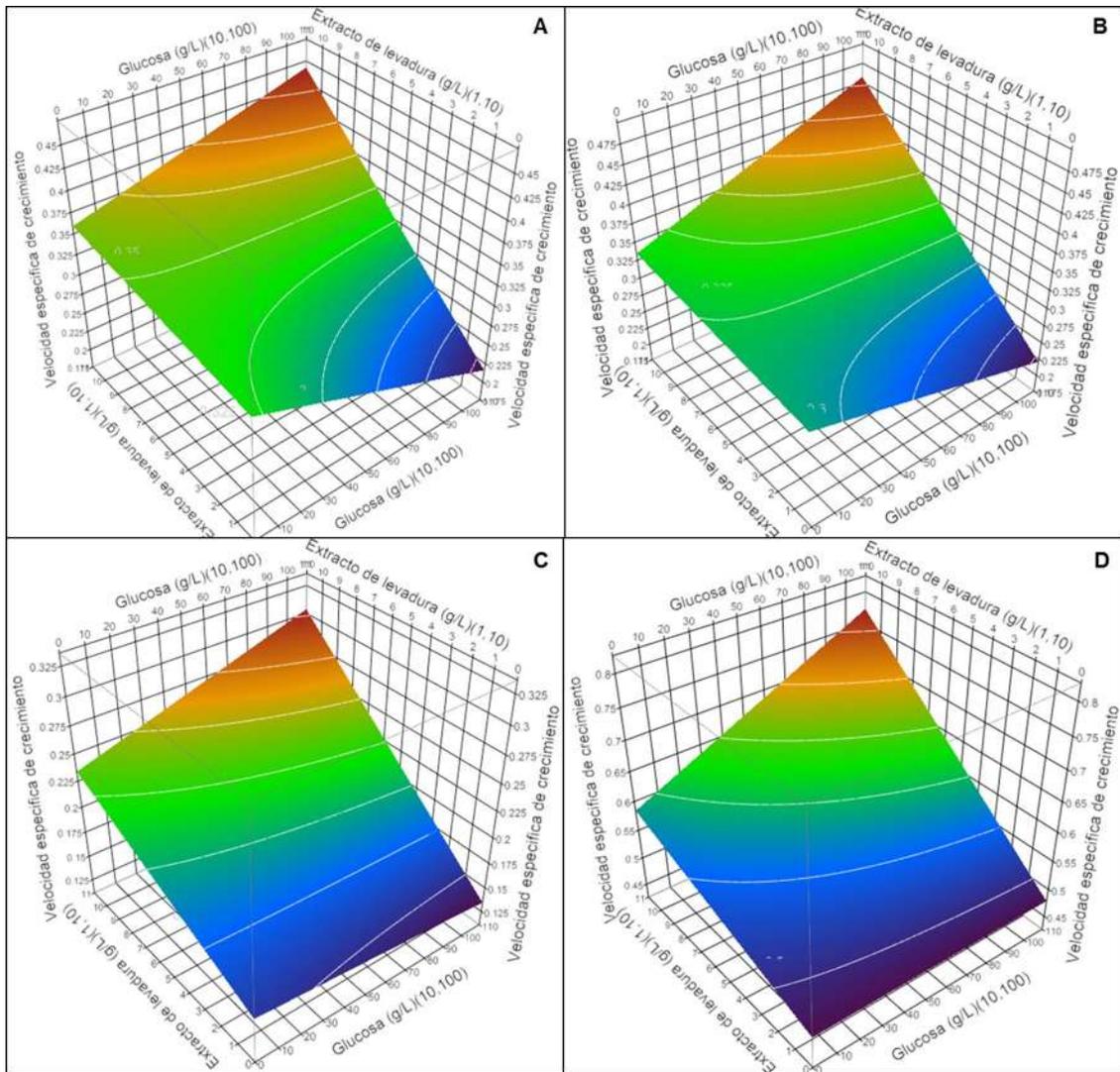


Figura 5. Efecto de la glucosa y el extracto de levadura sobre la velocidad específica de crecimiento. A: Lip3, B: 107w, C: *S. cerevisiae* BY4742 y D: *K. marxianus*.

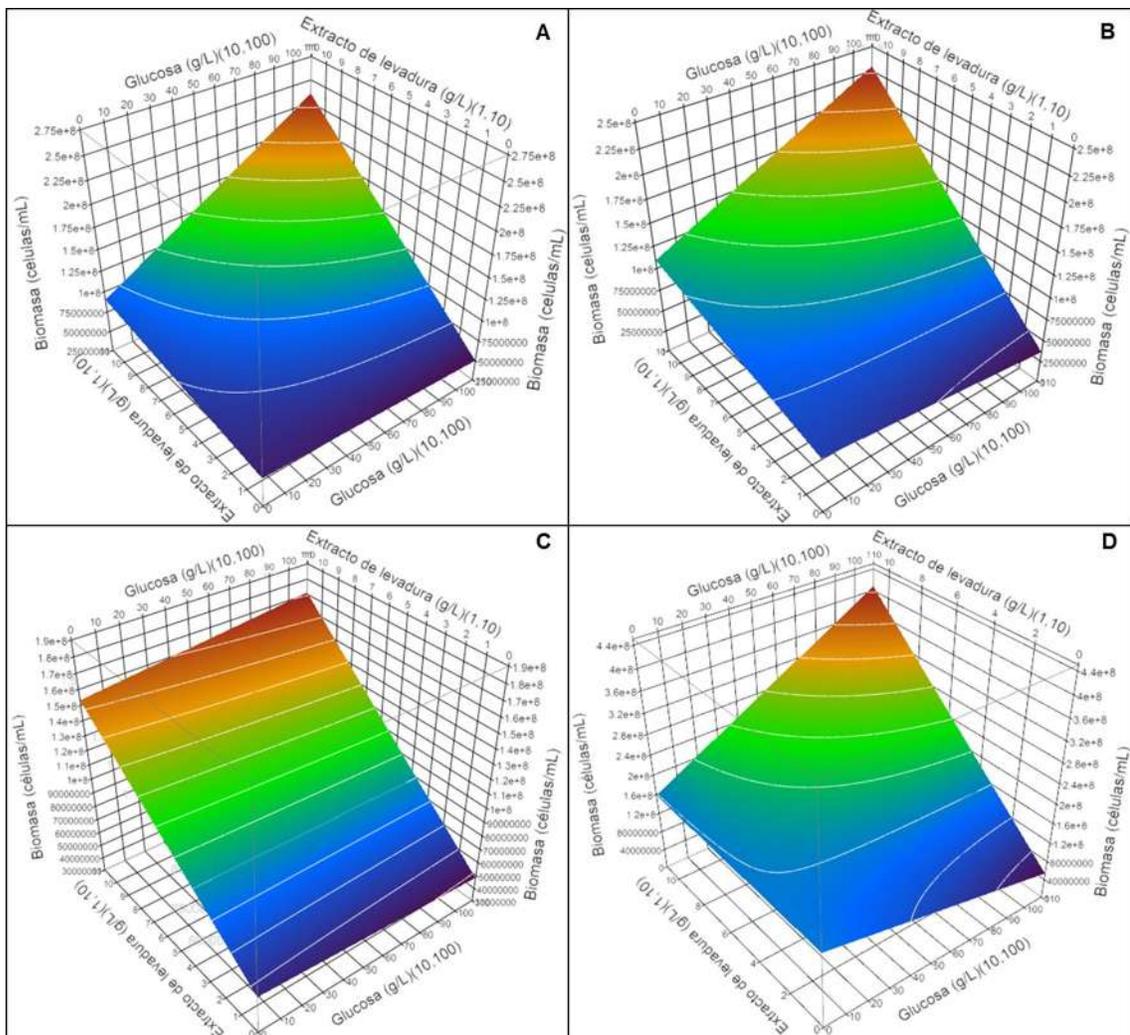


Figura 6. Efecto de la glucosa y el extracto de levadura sobre la biomasa. A: Lip3, B: 107w, C: *S. cerevisiae* BY4742 y D: *K. marxianus*.

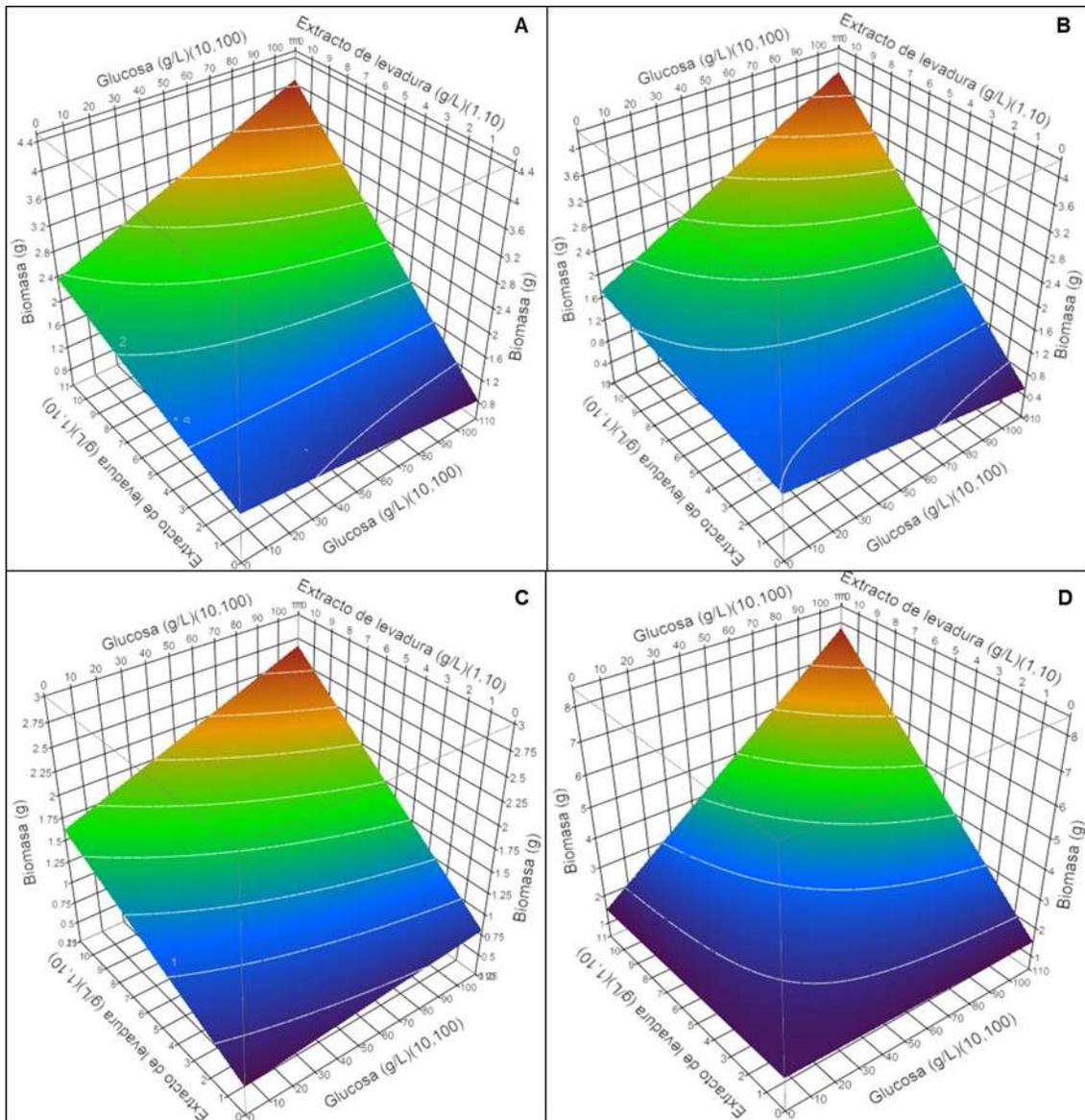
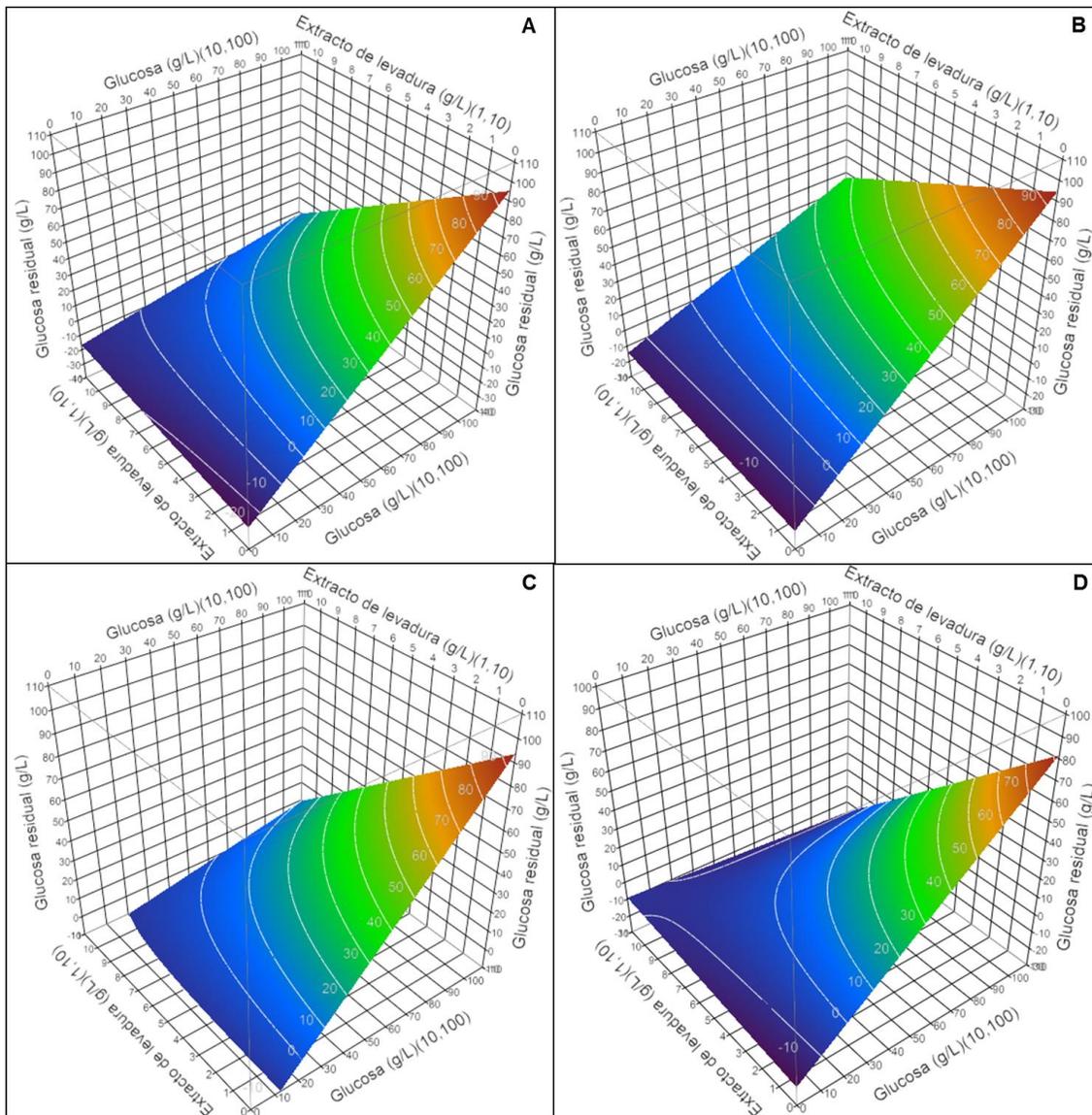


Figura 7. Efecto de la glucosa y el extracto de levadura sobre la biomasa. A: Lip3, B: 107w, C: *S. cerevisiae* BY4742 y D: *K. marxianus*.



**Figura 8. Efecto de la glucosa y el extracto de levadura sobre la glucosa residual. A:** Lip3, **B:** 107w, **C:** *S. cerevisiae* BY4742 y **D:** *K. marxianus*.

Además, debido a que el vector de expresión es reprimido por la presencia de glucosa en el medio de cultivo y como en todos los tratamientos presentaron glucosa residual, no se factible utilizar los tratamientos en los que se obtuvieron las mejores respuestas, por lo cual es necesario encontrar los niveles de los factores de glucosa y extracto de levadura en los que la respuesta de glucosa residual sea de 0 g/L.

#### 4.2 Análisis de deseabilidad sobre las variables de respuesta

Debido a que el vector de expresión es reprimido por la presencia de glucosa en el medio de cultivo, se realizó un análisis de deseabilidad para obtener los niveles de glucosa y extracto de levadura en donde se obtuvieran las mayores respuestas posibles de velocidad de crecimiento y biomasa, así como un consumo total de glucosa.

Las mejores condiciones de cultivo para la cepa transformante Lip3 fueron 55 g/L de glucosa y 10 g/L de extracto de levadura, con las cuales se obtuvieron los valores teóricos de  $0.38943 \text{ h}^{-1}$  para la velocidad específica de crecimiento; 153 millones de células/mL; 3.02 g/L de biomasa; y un consumo total de glucosa. Mientras que para la cepa transformante 107w fueron 27 g/L de glucosa y 10 g/L de extracto de levadura, con las cuales se obtuvieron los valores teóricos de  $0.3578 \text{ h}^{-1}$  para la velocidad específica de crecimiento; 131.6 millones de células/mL; 2.13 g/L de biomasa; y un consumo total de glucosa, como se observa en la **Figura 9 y 10** respectivamente.

Mientras que para la cepa silvestre de *S. cerevisiae* fueron 50 g/L de glucosa y 10 g/L de extracto de levadura, con las cuales se obtuvieron los valores teóricos de  $0.2548 \text{ h}^{-1}$  para la velocidad específica de crecimiento; 151.6 millón de células/mL; 2.13 g/L de biomasa. Con respecto a la cepa silvestre de *K. marxianus* fueron 100 g/L de glucosa y 10 g/L de extracto de levadura, con las cuales se obtuvieron los valores teóricos de  $0.7308 \text{ h}^{-1}$  para la velocidad específica de crecimiento; 355.9 millones de células/mL; 6.74 g/L de biomasa y un consumo total de glucosa en ambas cepas, de acuerdo a la **Figura 11 y 12**.

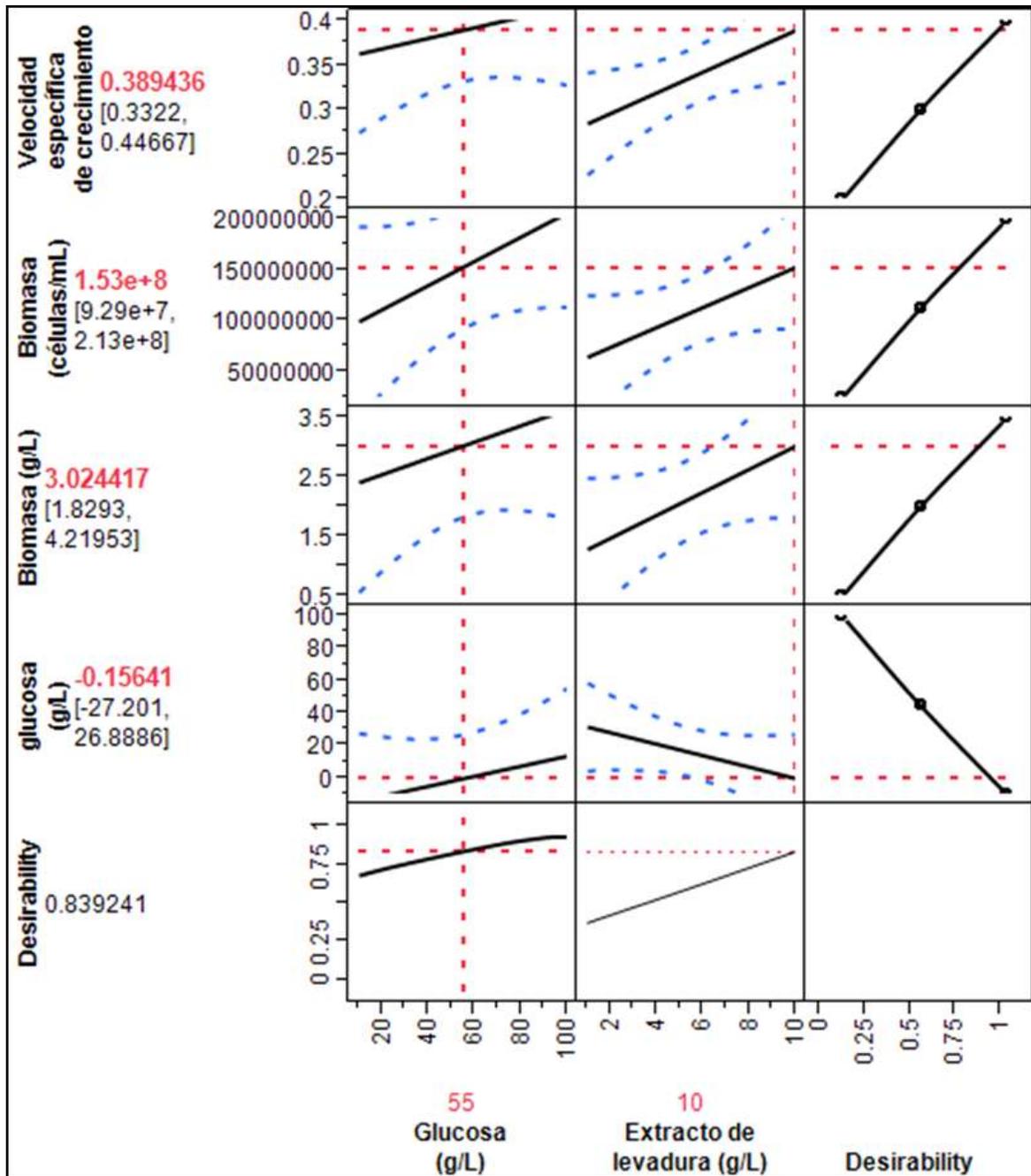


Figura 9. Análisis de deseabilidad para la cepa transformante Lip3. Eje y: valores teóricos de las variables de respuesta; eje x: valores de los factores; líneas negras: comportamiento de las variables de respuesta en los intervalos de cada factor, líneas punteadas rojas verticales: valor de los factores, líneas punteadas rojas horizontales: valor de las variables de respuesta con respecto al valor los factores y líneas azules: error estándar.

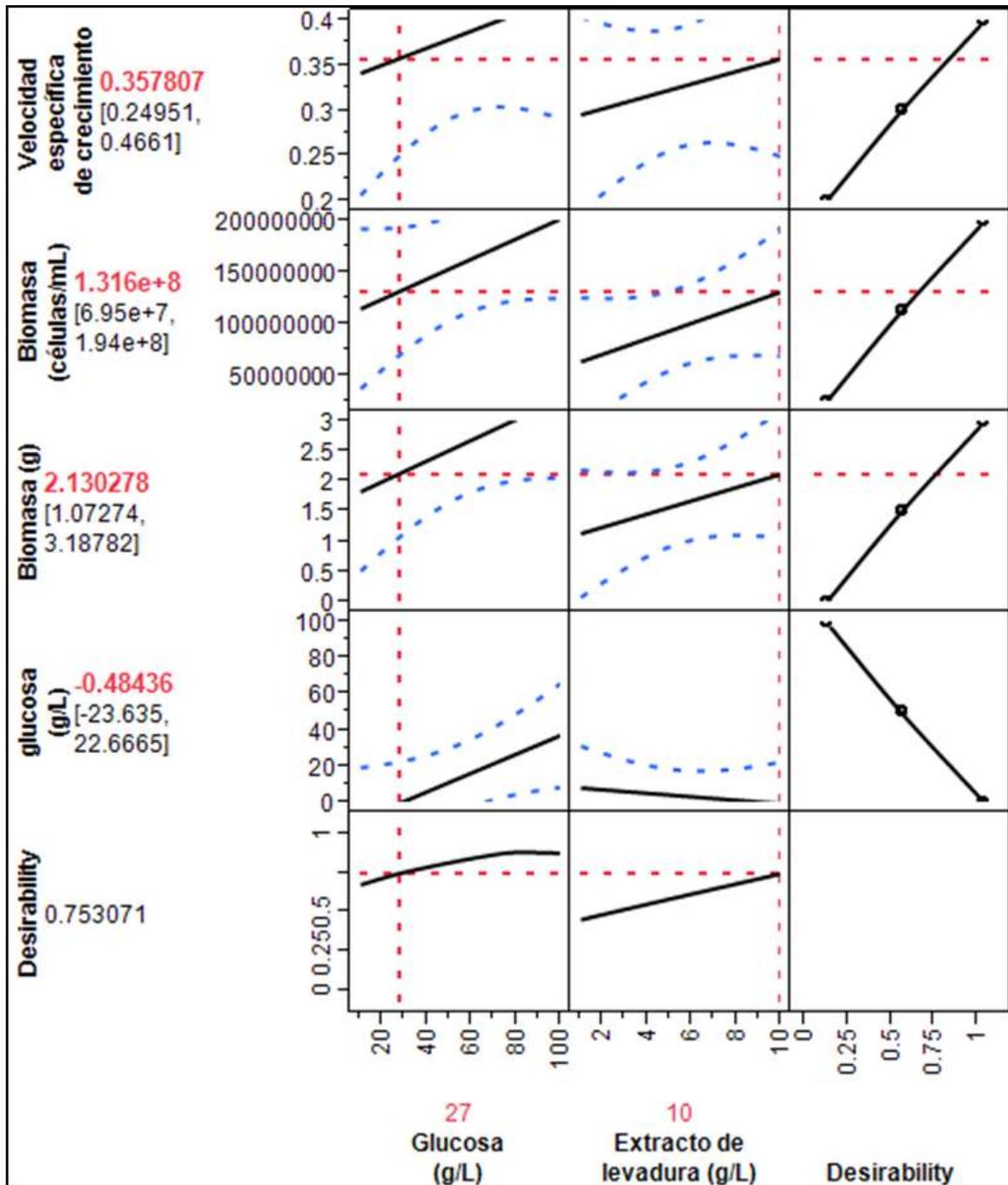


Figura 10. Análisis de deseabilidad para la cepa transformante 107w. Eje y: valores teóricos de las variables de respuesta; eje x: valores de los factores; líneas negras: comportamiento de las variables de respuesta en los intervalos de cada factor, líneas punteadas rojas verticales: valor de los factores, líneas punteadas rojas horizontales: valor de las variables de respuesta con respecto al valor los factores y líneas azules: error estándar.

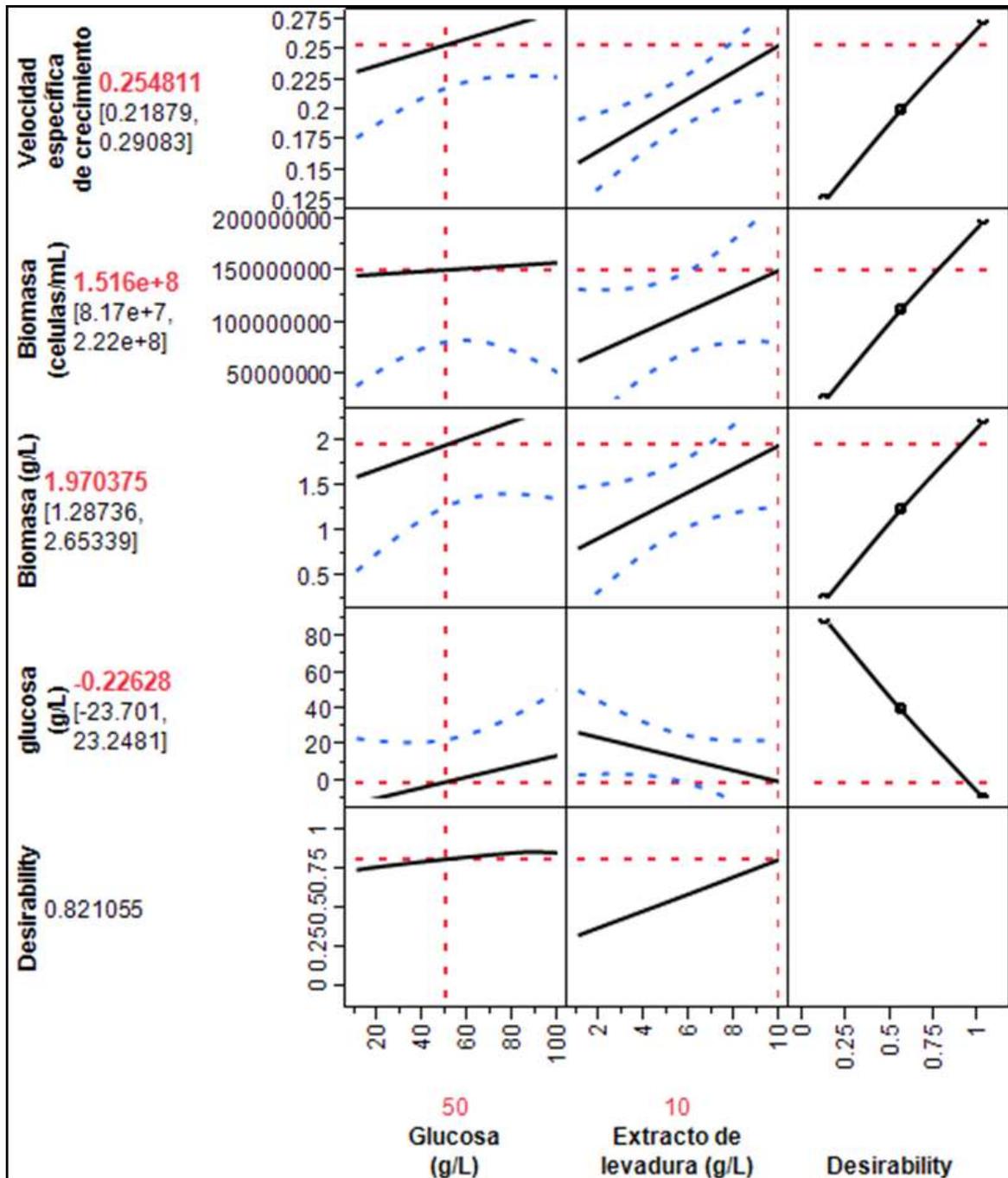


Figura 11. Análisis de deseabilidad para la cepa silvestre de *S. cerevisiae* BY4742. Eje y: valores teóricos de las variables de respuesta; eje x: valores de los factores; líneas negras: comportamiento de las variables de respuesta en los intervalos de cada factor, líneas punteadas rojas verticales: valor de los factores, líneas punteadas rojas horizontales: valor de las variables de respuesta con respecto al valor los factores y líneas azules: error estándar.

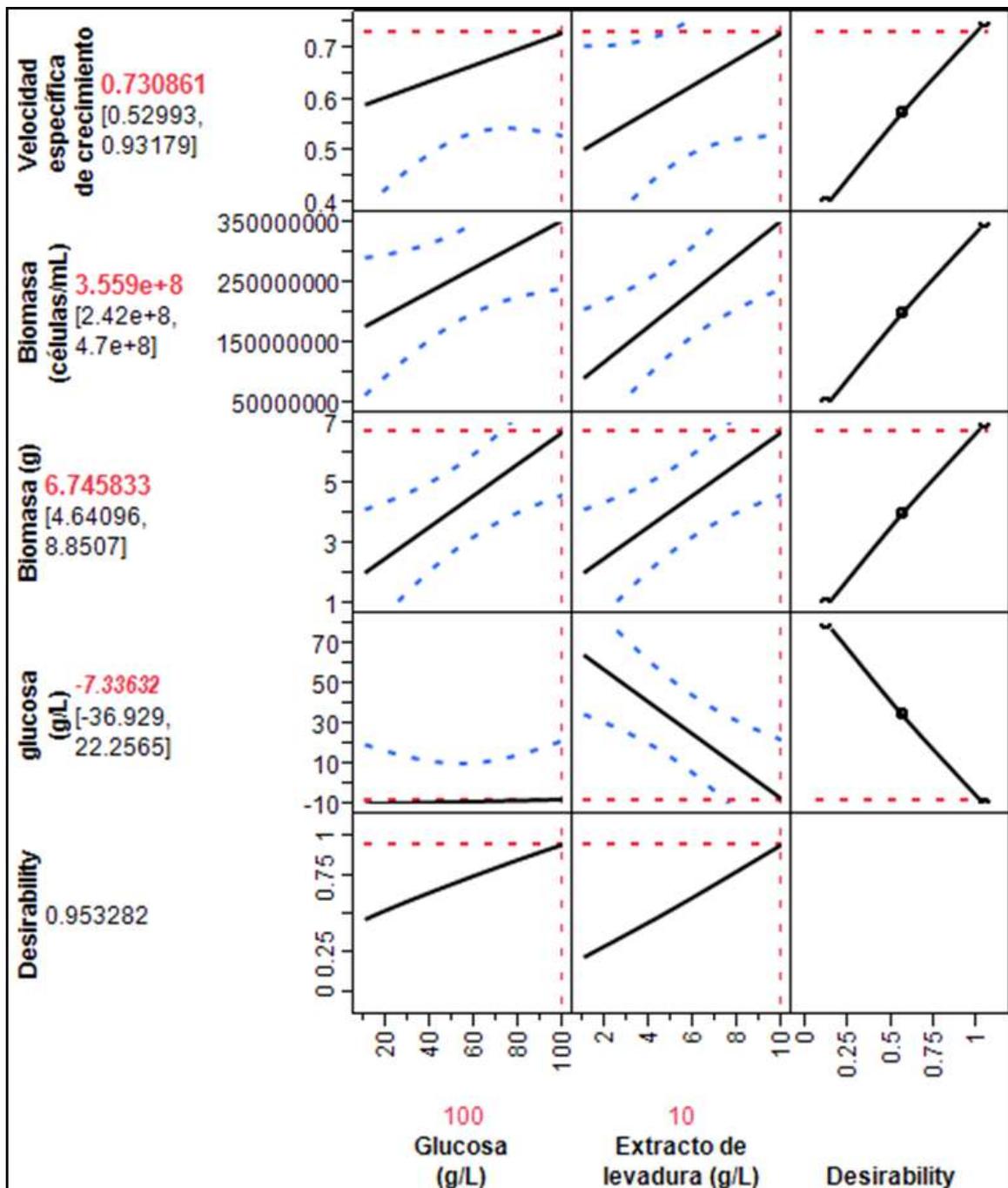
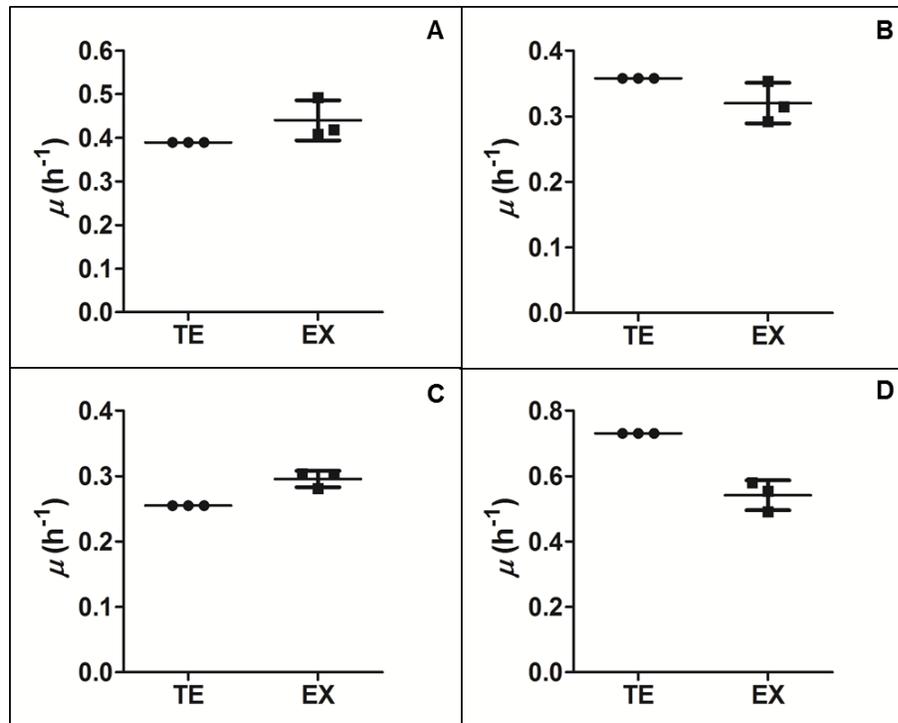


Figura 12. Análisis de deseabilidad para la cepa de silvestre de *K. marxianus*. Eje y: valores teóricos de las variables de respuesta; eje x: valores de los factores; líneas negras: comportamiento de las variables de respuesta en los intervalos de cada factor, líneas punteadas rojas verticales: valor de los factores y líneas punteadas rojas horizontales: valor que adquieren las variables de respuesta con respecto a los de los factores.

### 4.3 Validación del modelo estadístico sobre las variables de respuesta

Para validar los valores predichos por los modelos matemáticos contruidos experimentalmente, se realizó una corrida experimental con las concentraciones de glucosa y extracto de levadura teóricas con las que se obtuvieron la máxima respuesta de velocidad específica de crecimiento; biomasa y la mínima respuesta de glucosa residual para las cepas transformantes (Lip3 y 107w) y silvestres (*S. cerevisiae* BY4742 y *K. marxianus*). La velocidad específica de crecimiento teórica de la cepa transformante Lip3 fue de  $0.3894 \text{ h}^{-1}$  y la experimental de  $0.440 \pm 0.04585 \text{ h}^{-1}$ , mientras que la velocidad específica de crecimiento teórica de la cepa 107w fue de  $0.3578 \text{ h}^{-1}$  y la experimental de  $0.3200 \pm 0.03095 \text{ h}^{-1}$ . Así mismo, la velocidad específica de crecimiento teórica de la cepa silvestre de *S. cerevisiae* fue de  $0.2548 \text{ h}^{-1}$  y la experimental de  $0.2956 \pm 0.01255 \text{ h}^{-1}$ , la velocidad específica de crecimiento teórica de la cepa silvestre *K. marxianus* fue de  $0.7308 \text{ h}^{-1}$  y la experimental  $0.5416 \pm 0.04572 \text{ h}^{-1}$  (Figura 13).

Las velocidades específicas experimentales de las cepas transformantes Lip3, 107w y silvestre de *S. cerevisiae* BY4742 no son diferentes de las predichas por el modelo matemático, por lo que las concentraciones de glucosa y extracto de levadura fueron las mejores para obtener la máxima respuesta de velocidad específica de crecimiento para las cepas transformantes y silvestre de *S. cerevisiae*. Mientras que la velocidad específica de crecimiento experimental de la cepa silvestre *K. marxianus* fue menor que la predicha por el modelo matemático, esto se puede atribuir a la regulación metabólica que tiene la levadura a las condiciones ambientales que no se pueden predecir que este modelo estadístico.

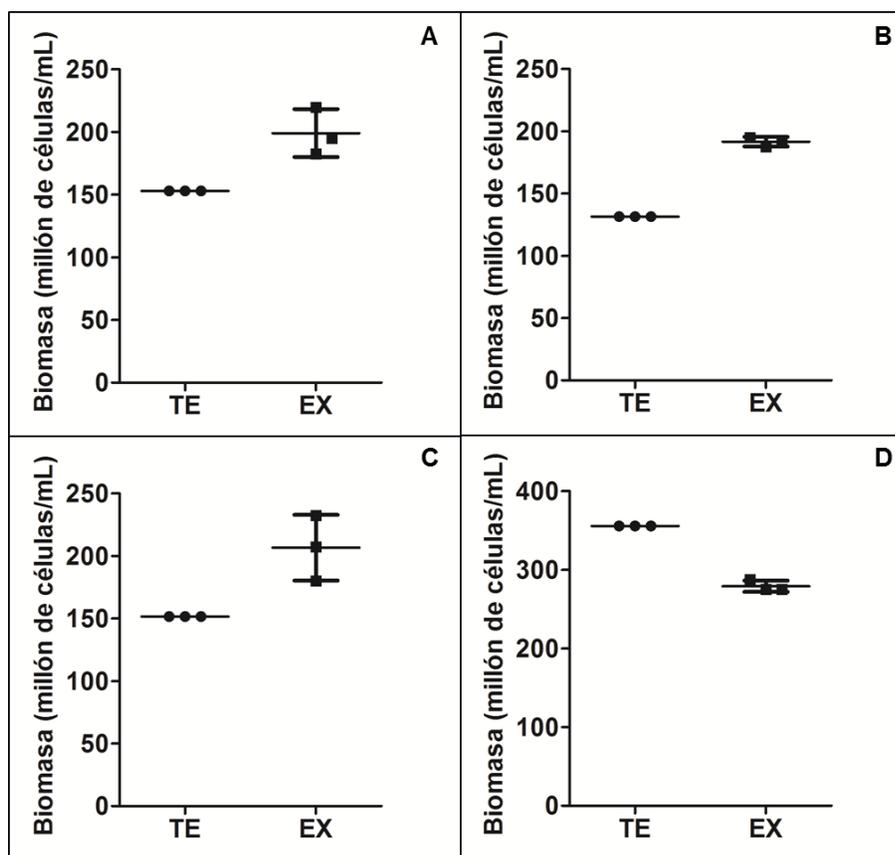


**Figura 13.** Validación de los valores predichos de las concentraciones de glucosa y extracto de levadura para la máxima respuesta de velocidad de crecimiento de las cepas transformantes y silvestres. Eje y: velocidad específica de crecimiento, eje x: tratamiento teórico (TE) y experimental (EX), A: Lip3, B: 107w, C: *S. cerevisiae* BY4742 y D: *K. marxianus*. Los datos representan la media  $\pm$  la desviación estándar (DE) de tres experimentos independientes.

De igual manera se realizó para la variable de respuesta de biomasa y concentración celular, donde la concentración teórica de células de la cepa transformante Lip3 fue de 153 millones de células/mL y de biomasa 3.024 g/L, mientras que la experimental fue de  $199.2 \pm 19.09$  millones de células/mL y  $4.100 \pm 0.3606$  g/L de biomasa. Con respecto a la cepa transformante 107w los valores teóricos de la concentración de celular fue de 131.6 millones de células/mL y 2.130 g/L de biomasa, mientras que las experimentales fueron de  $191.7 \pm 3.819$  millones de células/mL y  $2.967 \pm 0.05773$  g/L de biomasa (**Figuras 14** y **15**, respectivamente).

La concentración teórica de células de la cepa silvestre *S. cerevisiae* BY4742 fue de 151.6 millones de células/mL y la biomasa teórica fue de 1.970 g/L, así como la biomasa experimental fue de  $206.7 \pm 26.26$  millones de células/mL y  $3.367 \pm 0.05774$  g/L. Así mismo, la concentración teórica de células de la cepa silvestre *K. marxianus* fue de

355.9 millones de células/mL y la biomasa teórica fue de 6.740 g/L, mientras que la biomasa experimental fue de  $279.2 \pm 7.217$  millones de células/mL y  $6.767 \pm 0.4163$  g/L de biomasa (**Figuras 14 y 15**, respectivamente). La biomasa experimental expresada en millones de células/mL de la cepa transformante Lip3 y silvestre *S. cerevisiae* BY4742 no fue diferente de la teórica, pero expresada en g/L la experimental fue mayor que la teórica. Sin embargo, la concentración experimental de células y la biomasa para la cepa transformante 107w fueron mayores que las teóricas, no obstante, para cepa *K. marxianus* fueron menores que la teórica. Por lo cual, las concentraciones de glucosa y extracto de levadura predichos por el modelo estadístico son las mejores para obtener la máxima respuesta de biomasa.



**Figura 14.** Validación de los valores predichos de las concentraciones de glucosa y extracto de levadura para la máxima respuesta de biomasa de las cepas transformantes y silvestres. Eje y: Biomasa (millón de células/mL), eje x: tratamiento teórico (TE) y experimental (EX), A: Lip3, B: 107w, C: *S. cerevisiae* BY4742 y D: *K. marxianus*. Los datos representan la media  $\pm$  la desviación estándar (DE) de tres experimentos independientes.

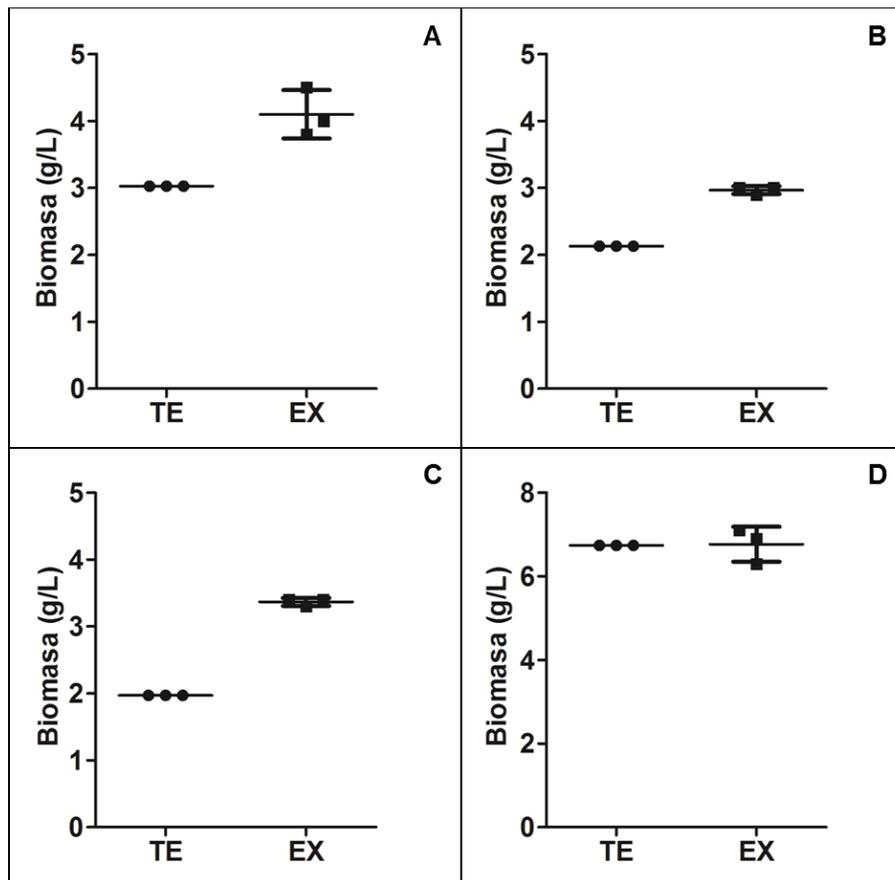


Figura 15. Validación de los valores predichos de las concentraciones de glucosa y extracto de levadura para la máxima respuesta de biomasa de las cepas transformantes y silvestres. Eje y: Biomasa (g/L), eje x: tratamiento teórico (TE) y experimental (EX), A: Lip3, B: 107w, C: *S. cerevisiae* BY4742 y D: *K. marxianus*. Los datos representan la media  $\pm$  la desviación estándar (DE) de tres experimentos independientes.

Debido a que el vector de expresión es reprimido por la presencia de glucosa en el medio de cultivo, el valor predicho de la variable de respuesta de glucosa residual fue de 0 g/L, los valores experimentales de la glucosa residual obtenidos para las cepas transformantes Lip3; 107w y silvestres *S. cerevisiae* BY4742; *K. marxianus* fueron de  $1.062 \pm 0.4232$ ;  $0.5454 \pm 0.1568$ ;  $1.120 \pm 0.2202$  y  $2.097 \pm 0.7049$  g/L respectivamente (Figura 16). Por consiguiente, las concentraciones de glucosa y extracto de levadura predichos por el modelo matemático son las mejores para obtener la mínima concentración de glucosa residual.

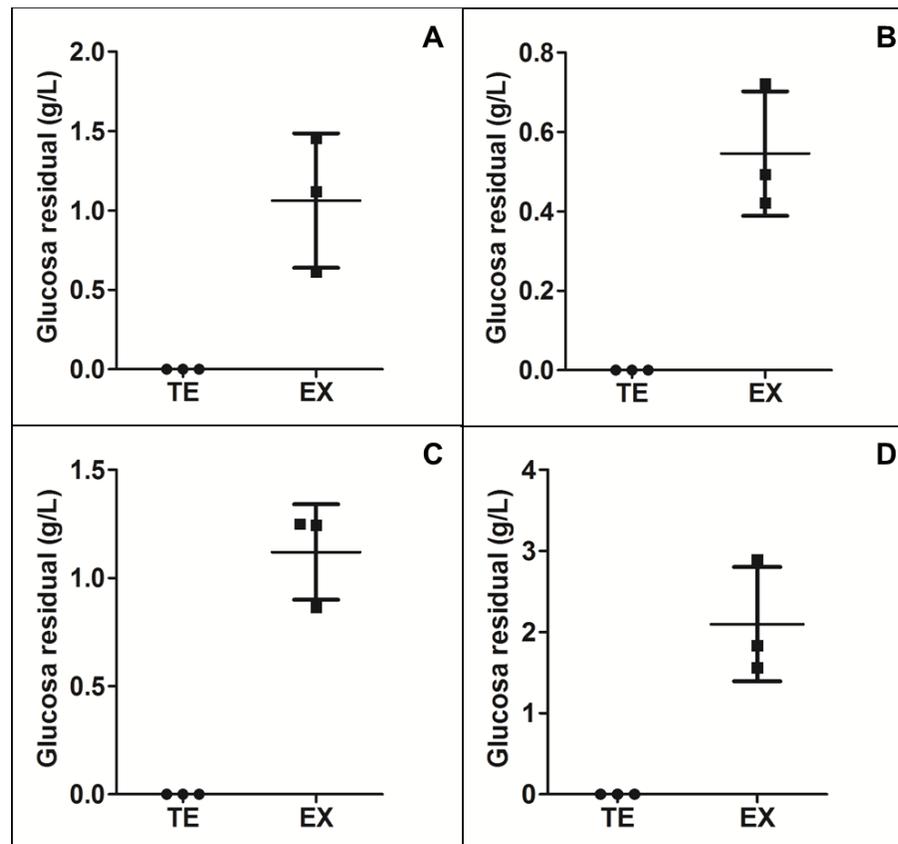
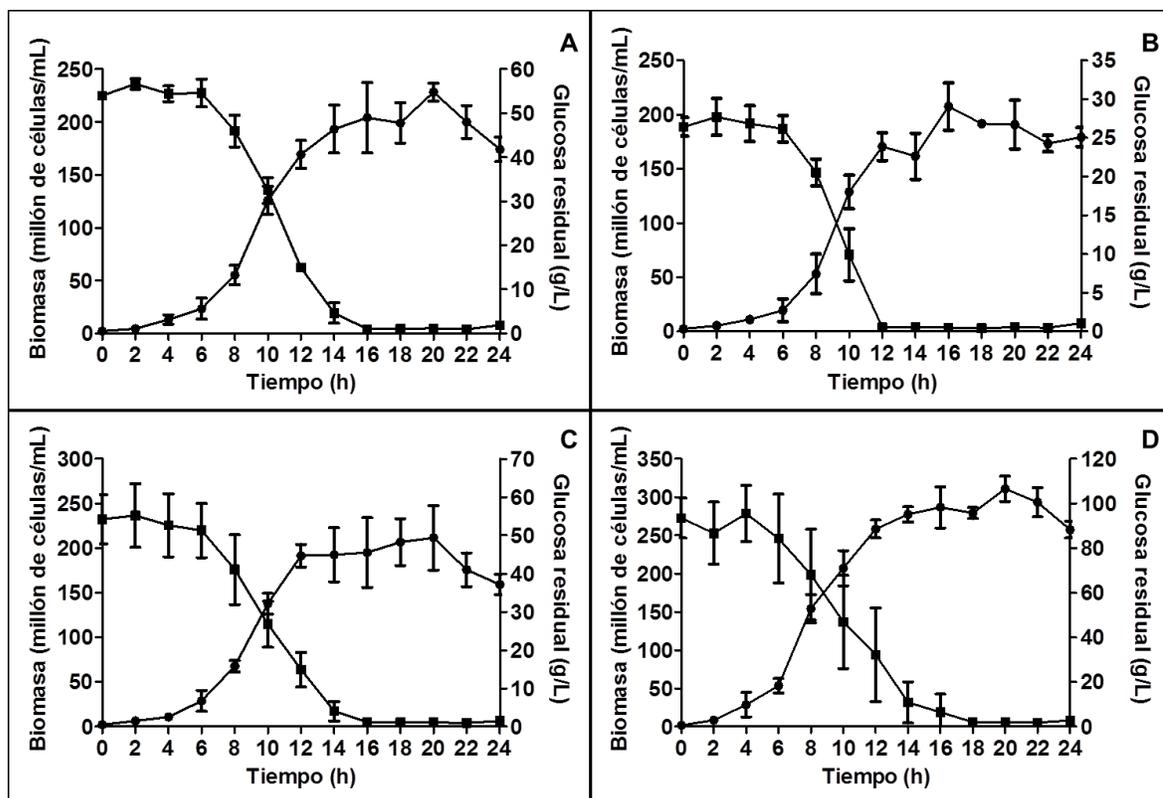


Figura 16. Validación de los valores predichos de las concentraciones de glucosa y extracto de levadura para la mínima respuesta de glucosa residual de las cepas transformantes y silvestres. Eje y: Glucosa residual (g/L), eje x: tratamiento teórico (TE) y experimental (EX), A: Lip3, B: 107w, C: *S. cerevisiae* BY4742 y D: *K. marxianus*. Los datos representan la media  $\pm$  la desviación estándar (DE) de tres experimentos independientes.

#### 4.4 Inducción de la expresión del vector para la producción de lipasas

Debido a que la cepa transformante reprime la expresión del vector que codifica el transcrito para la producción de lipasas en presencia de glucosa en el medio de cultivo, se realizó una cinética bajo las mejores concentraciones de glucosa y extracto de levadura, con el cual se estimó el tiempo en el que las cepas transformantes dan inicio a la expresión del vector. El tiempo en el que la glucosa residual alcanzó la mínima concentración fue a la hora 16 para las cepa transformante Lip3 y silvestres (*S. cerevisiae* BY4742 y *K. marxianus*), mientras que la para la cepa transformante 107w

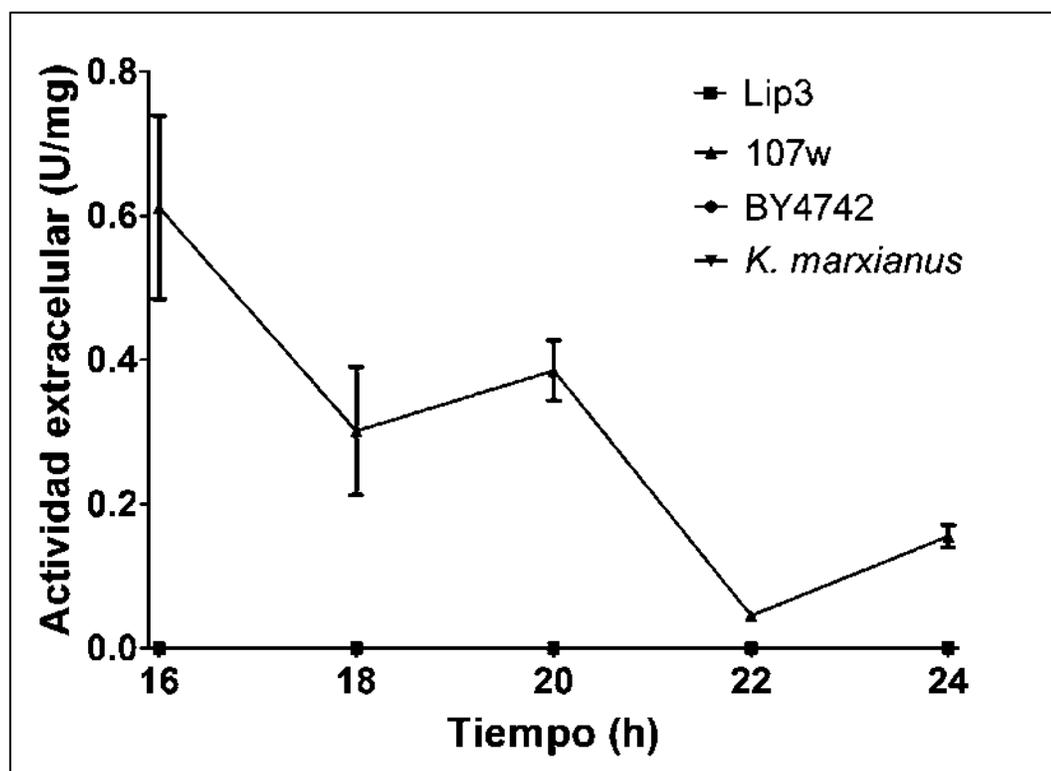
fue a la hora 12 después de haber inoculado el medio de cultivo (**Figura 17**). Por lo cual, la inducción del vector de expresión en las cepas transformantes Lip3 y 107w inicia a la hora 16 y 12, respectivamente.



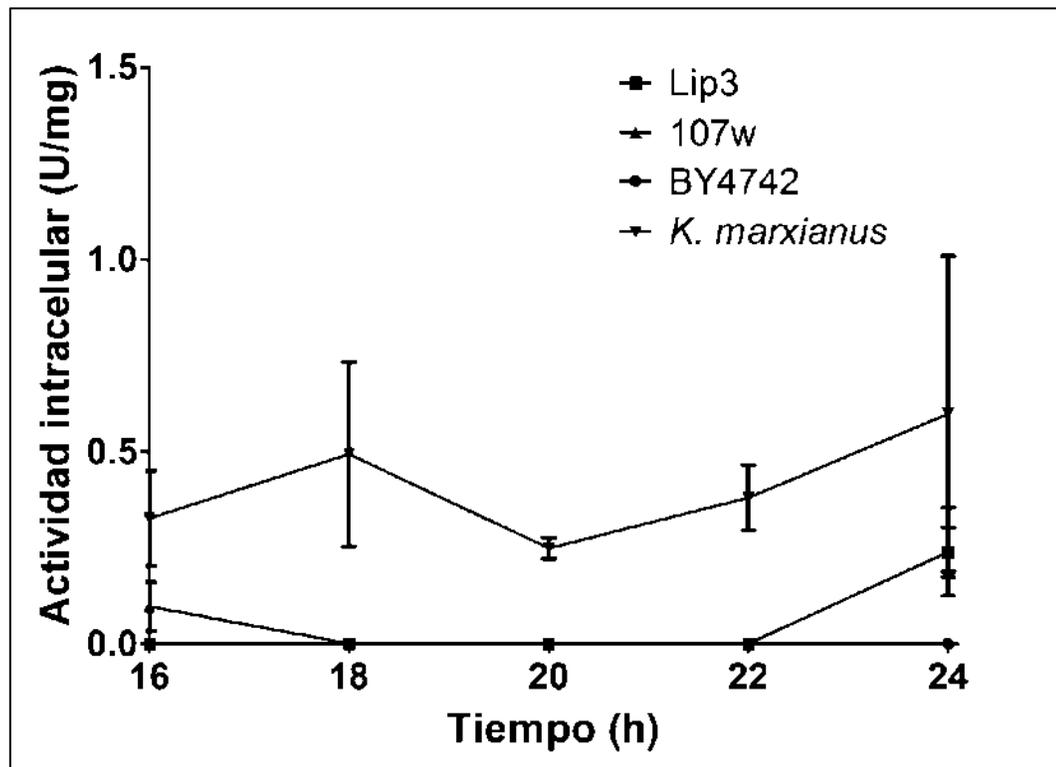
**Figura 17. Tiempo en el que inicia la inducción del vector de expresión.** Eje y: Biomasa (millón de células) y Glucosa residual (g/L); eje x: Tiempo (h); círculos: biomasa; cuadros: glucosa residual; A: cinética Lip3; B: cinética de 107w; C: cinética de *S. cerevisiae* BY4742; D: cinética de *K. marxianus*.

El inicio de la inducción del vector de expresión es debido a la presencia de galactosa y ausencia de glucosa en el medio de cultivo, por lo cual se midió la actividad extracelular e intracelular de las cepas transformantes (Lip3 y 107) y silvestres (*S. cerevisiae* BY4742 y *K. marxianus*) inducidas con galactosa en el medio de cultivo. El extracto extracelular de la cepa 107w tuvo una actividad enzimática de  $0.6117 \pm 0.1271$  U/mg a la hora 16 y disminuyó a  $0.04528 \pm 0.07843$  U/mg a la hora 22 después de haber inoculado el medio de cultivo. Mientras que el extracto extracelular de la cepa transformante Lip3 no tuvo actividad enzimática, así como el extracto extracelular de las cepas silvestres (**Figura 18**).

Mientras que el extracto intracelular de la cepa 107w tuvo una actividad enzimática de  $0.0967 \pm 0.0632$  U/mg a la hora 16 y disminuyó a 0 U/mg durante la hora 18 a 22, pero en la hora 24 incrementó a  $0.2384 \pm 0.0645$  U/mg, asimismo el extracto intracelular de la cepa Lip3 presentó una actividad enzimática de  $0.239 \pm 0.115$  U/mg a la hora 24. Además, extracto intracelular de la cepa silvestre *K. marxianus* tuvo una actividad de  $0.3262 \pm 0.1232$  U/mg a la hora 16 y sin ningún cambio significativo durante el tiempo evaluado. No obstante, el extracto intracelular de la cepa silvestre de *S. cerevisiae* no presentó actividad enzimática (**Figura 19**). Por lo cual, la cepa transformante Lip3 no transporta las lipasas al medio extracelular y la cepa silvestre de *K. marxianus* produce las lipasas de manera basal sin expórtalas al medio extracelular, ya que el medio de cultivo no contenía un inductor como lo es un aceite vegetal.



**Figura 18. Actividad extracelular de la inducción con 2% de galactosa.** Eje y: actividad específica (U/mg); eje x: tiempo de inducción (h); cuadrados: actividad del sobrenadante del cultivo de Lip3; triángulos: actividad del sobrenadante del cultivo de 107w; círculos: actividad del sobrenadante del cultivo de *S. cerevisiae* BY4742; triángulos invertidos: actividad del sobrenadante del cultivo de *K. marxianus*. Los datos representan la media  $\pm$  la desviación estándar (DE) de tres experimentos independientes.



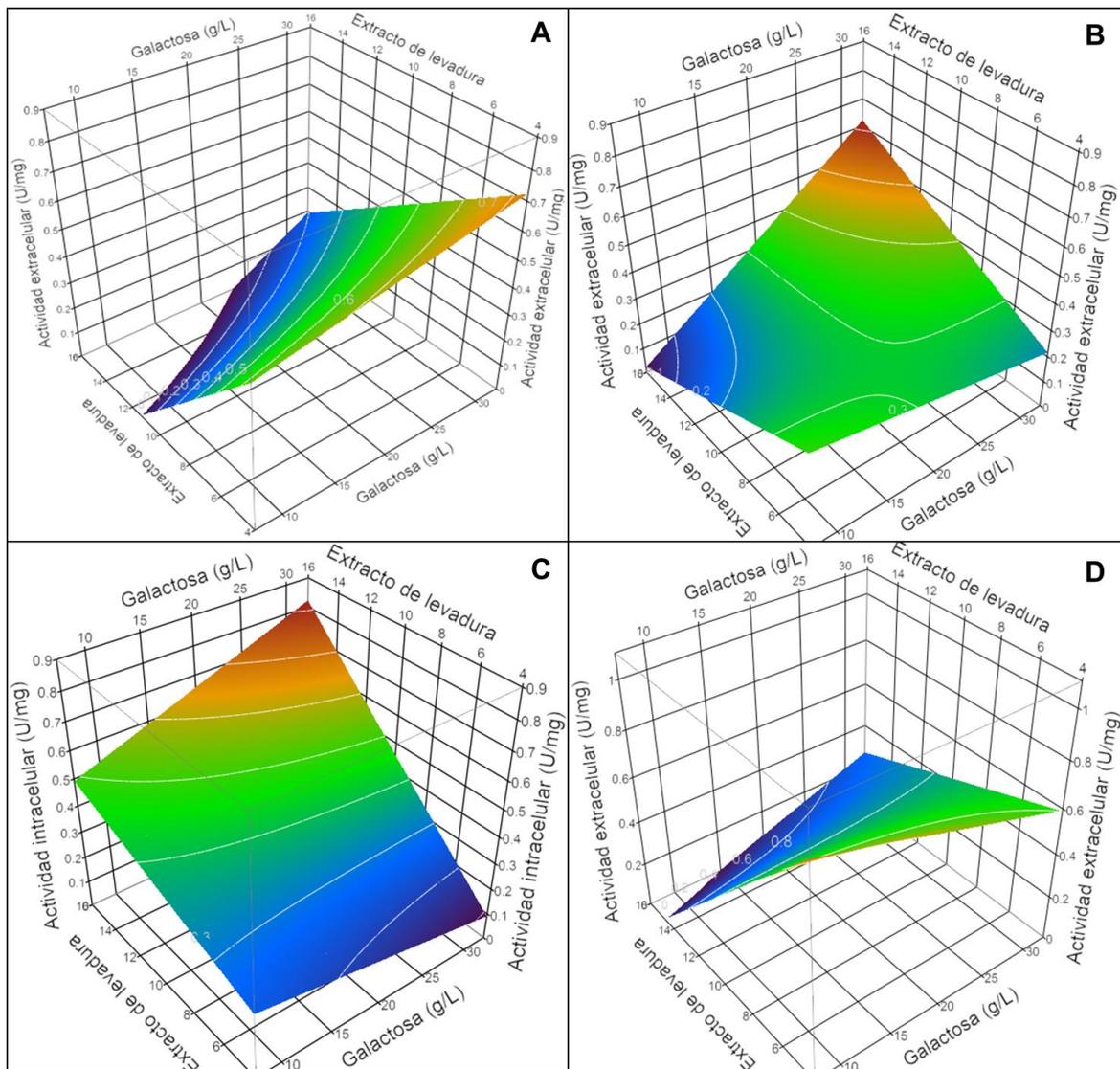
**Figura 19. Actividad intracelular de la inducción con 2% de galactosa.** Eje y: actividad específica (U/mg); eje x: tiempo de inducción (h); cuadrados: actividad del extracto intracelular de Lip3; triángulos: actividad del extracto intracelular de 107w; círculos: actividad del extracto intracelular de *S. cerevisiae* BY4742; triángulos invertidos: actividad del extracto intracelular de *K. marxianus*. Los datos representan la media  $\pm$  la desviación estándar (DE) de tres experimentos independientes.

#### 4.5 Efecto de la concentración de galactosa y el extracto de levadura sobre la producción de lipasas en cepas transformantes

Para evaluar el efecto de la concentración de galactosa y extracto de levadura se determinó mediante un diseño factorial  $2^2$  con cinco puntos centrales (**Tabla 2**), donde la máxima actividad extracelular de la cepa Lip3 fue de  $0.6592 \pm 0.0435$  U/mg proteína y la máxima actividad extracelular de la cepa 107w fue de  $0.5355 \pm 0.0944$  U/mg de proteína que corresponde al tratamiento 6 y 9, respectivamente. Por lo cual, la galactosa generó un efecto positivo en ambas cepas, de igual manera el extracto de levadura tuvo un efecto positivo en la cepa 107w pero negativo en la cepa Lip3, además el mayor efecto que se observó en la cepa 107w fue por la interacción entre la galactosa y el extracto de levadura (**Figura 20**).

#### IV. RESULTADOS

No obstante, la máxima actividad intracelular de la cepa Lip3 y 107w ( $0.7335 \pm 0.1430$  y  $0.8140 \pm 0.2612$  U/mg proteína) se obtuvieron en los tratamientos 6 y 9 respectivamente. Por lo cual, la galactosa generó un efecto positivo en ambas cepas, de igual manera el extracto de levadura tuvo un efecto positivo en la cepa 107w pero negativo en la cepa Lip3, además el mayor efecto que se observó en la cepa 107w fue por la interacción entre la galactosa y el extracto de levadura (**Figura 20**).



**Figura 20.** Efecto de la concentración de galactosa y extracto de levadura sobre la actividad lipásica extracelular e intracelular de cepas transformantes. Eje y: actividad específica (U/mg de proteína); eje x: galactosa y extracto de levadura (g/L), A: actividad extracelular de Lip3; B: actividad extracelular de 107w; C: actividad intracelular de Lip3 y D: actividad intracelular de 107w.

#### 4.6 Producción de lipasas con cepas transformantes de *S. cerevisiae* y silvestre de *K. marxianus* a nivel biorreactor

Para producir las lipasas a nivel biorreactor, se utilizaron las mejores concentraciones de glucosa, extracto de levadura y galactosa en cada cepa, mientras que las variables de agitación (300 rpm), temperatura (30° C) y aireación (2 vvm) se mantuvieron fijas. Con las cuales la cepa Lip3 presentó un crecimiento fermentativo hasta la hora 16, seguido de un crecimiento respiratorio donde en la hora 24 se detectó actividad lipásica extracelular (0.2 U/mg de proteína) y se mantuvo constante hasta la hora 36, lo que indica que la inducción da inicio 8 horas después de que la levadura inició el crecimiento respiratorio. No obstante, en la hora 40 y 44 alcanzó la máxima actividad lipásica extracelular (1.35 y 1.56 U/mg de proteína), mientras que en la hora 48 disminuyó hasta 0.45 U/mg de proteína debido a la reutilización de los aminoácidos por la acción de proteasas presentes en el medio de cultivo. Además se detectó actividad lipásica intracelular (0.71 U/ mg de proteína) en las primeras horas de la fermentación (4 h) y disminuyó hasta un promedio de 0.1 U/mg de proteína (**Figura 21**).

De igual manera, la cepa 107w tuvo un crecimiento fermentativo de 12 h y respiratorio de 16 a 32 horas, además en la hora 24 se detectó actividad lipásica extracelular (0.47 U/mg de proteína) la cual incrementó a 1.25 U/mg de proteína en la hora 32 y disminuyó a un promedio de 0.625 U/mg de proteína durante las horas siguientes (34 a 48). No obstante, en la hora 28 se detectó actividad lipásica intracelular de 0.21 U/mg de proteína la cual incrementó y disminuyó periódicamente las siguientes horas, sin embargo la máxima actividad intracelular fue de 0.49 U/mg de proteína en la hora 48 (**Figura 21**).

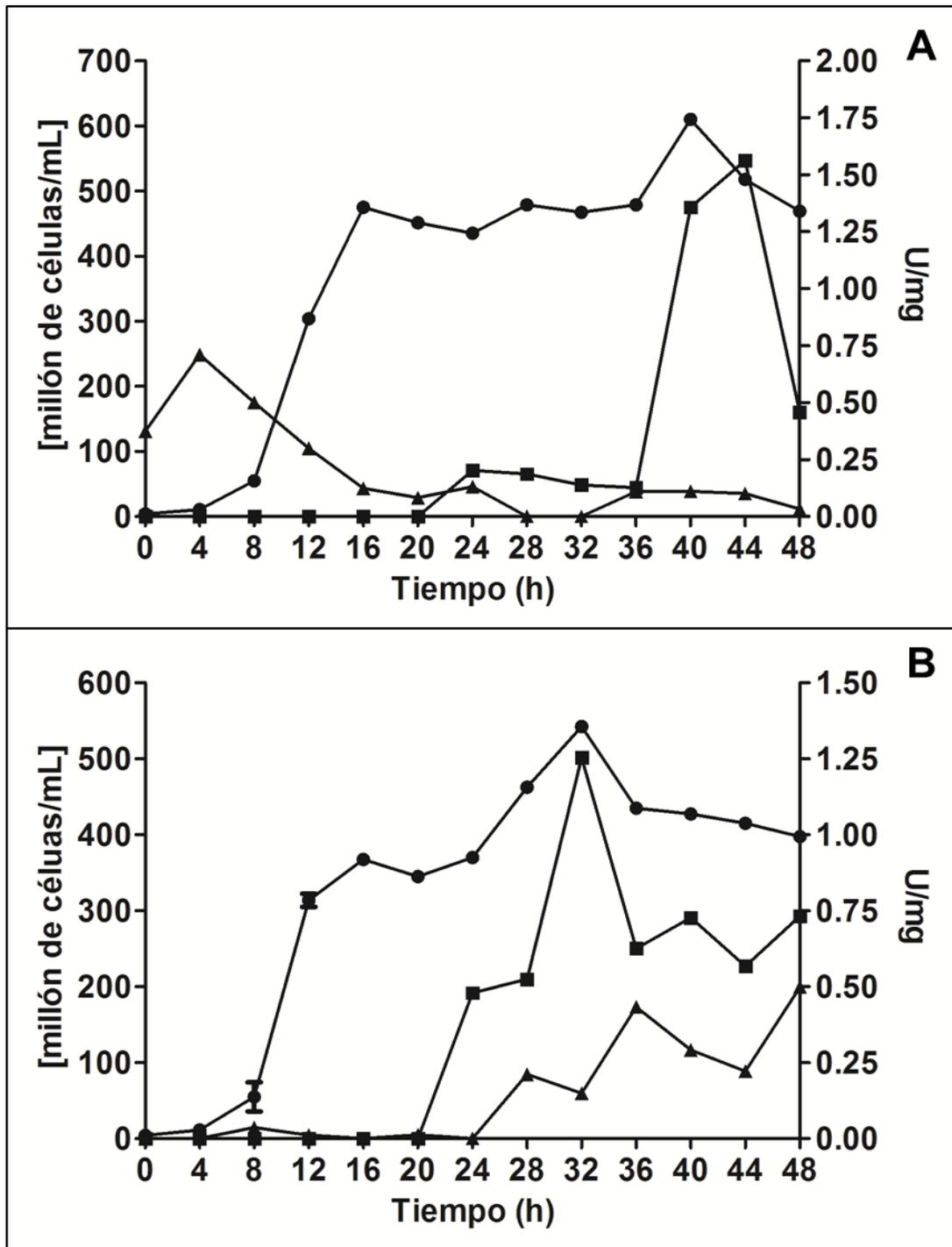


Figura 21. Producción de lipasas en biorreactor de cepas transformantes. A: cepa transformante Lip3; B: cepa transformante 107w; círculos: crecimiento celular; cuadrados: actividad lipásica del extracto enzimático extracelular y triángulos: actividad del extracto enzimático intracelular.

La cepa silvestre de *S. cerevisiae* BY4742 también presentó crecimiento diaúxico, sin embargo, no se detectó actividad en los extractos enzimáticos extracelular e intracelular (**Figura 22**). Mientras que la cepa silvestre de *K. marxianus* alcanzó su máximo crecimiento en la hora 16 y en la hora 20 se observó actividad lipásica extracelular de 0.84 U/mg de proteína, la cual disminuyó a 0 U/mg de proteína durante las siguientes 8 horas y nuevamente incrementó a 1.04 U/mg de proteína, este comportamiento se observó de manera periódica, además no se detectó actividad lipásica en el extracto enzimático intracelular (**Figura 22**), por cual se confirma que *K. marxianus* transporta las lipasas al medio extracelular.

El rendimiento de biomasa ( $Y_{x/S}$ ) de la cepa transformante 107w fue mayor que el de la cepa Lip3 y silvestres, sin embargo el rendimiento de producto ( $Y_{P/X}$ ) fue mayor en la cepa transformante Lip3 y la cepa 107w fue igual que en la silvestre de *K. marxianus* (**Tabla 4**). Por lo cual, la producción heteróloga de lipasas en *S. cerevisiae* BY4742 fue 1.5 más que con la cepa silvestre de *K. marxianus*.

**Tabla 4.** Rendimiento de biomasa y producto de las cepas transformantes y silvestres.

Cepa	$Y_{x/S}$ g de células secas/g de glucosa	$Y_{P/X}$ extracelular (U/g de células secas)	$Y_{P/X}$ intracelular (U/g de células secas)
Lip3	0.083	97.37	11.82
107w	0.18	63.55	26.29
BY4742	0.0645	0	0 U/g
<i>K. marxianus</i>	0.1255	64.04	0 U/g

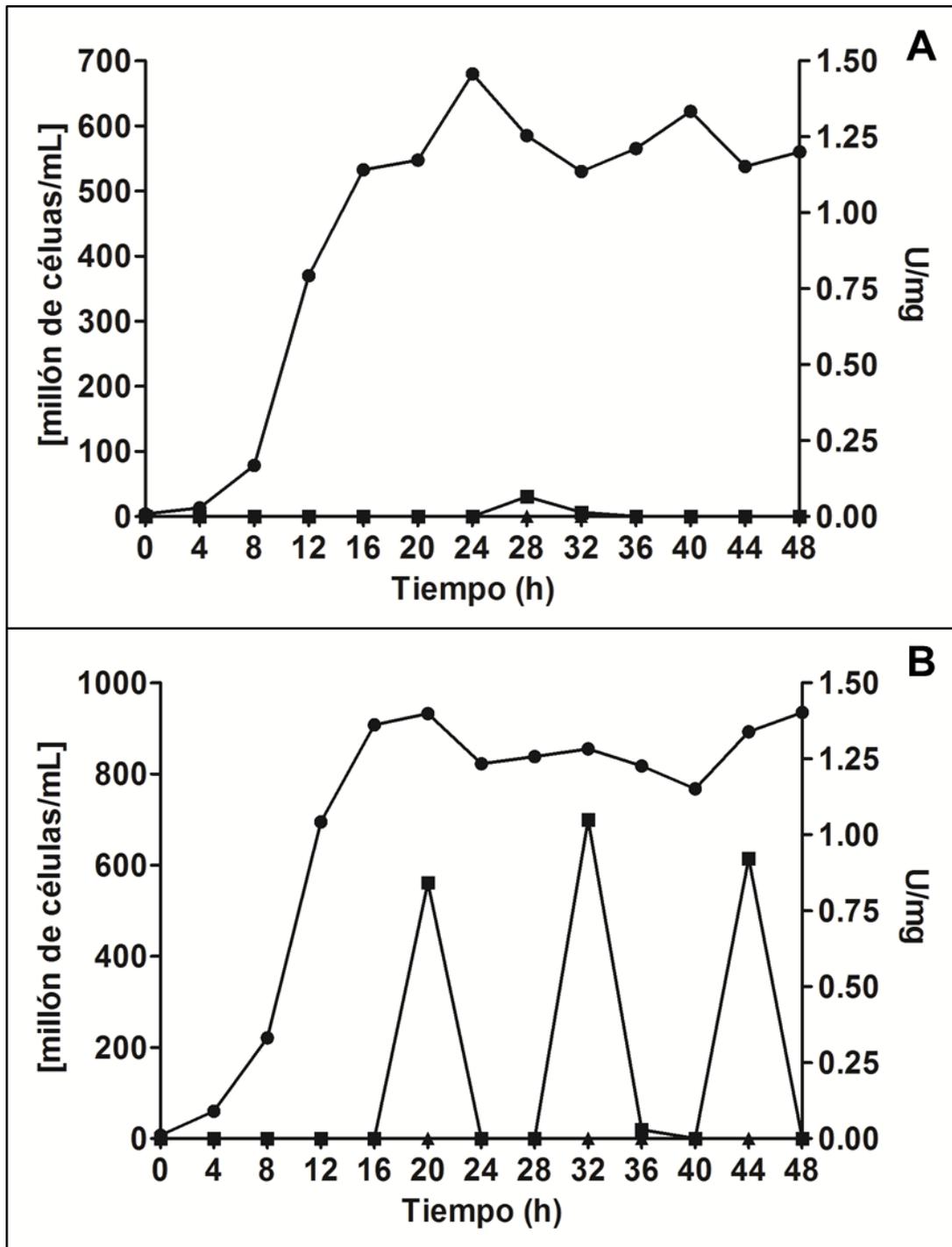


Figura 22. Producción de lipasas en biorreactor de cepas silvestres. A: cepa silvestre de *S. cerevisiae* BY4742; B: cepa silvestre de *K. marxianus*; círculos: crecimiento celular; cuadrados: actividad lipásica del extracto enzimático extracelular y triángulos: actividad del extracto enzimático intracelular.

### Discusión general

El continuo desarrollo de nuevos productos y las nacientes necesidades han provocado un amplio estudio de las lipasas, como: la modificación de los genes implicados en la síntesis de lipasas y su expresión heteróloga en organismos competentes que pueda traer una mayor producción que el organismo natural. Por cual, se utilizó a la levadura *S. cerevisiae* para la producción heteróloga de LIP3 y YJR107w debido a su capacidad metabólica, donde la galactosa promueve una de las inducciones más fuertes conocidas para los genes eucarióticos con un aumento de 1000 veces en la expresión de algunos genes estructurales (Lohr y López, 1995).

No obstante, la levadura *S. cerevisiae* utiliza la fermentación alcohólica como una vía para la generación de energía y esto se observa solo bajo ciertas condiciones de cultivo; como la alta disponibilidad de carbohidratos fermentables (De Deken, 1966) o la anoxia (Dashko *et al.*, 2014). Por lo cual, las máximas velocidades de crecimiento se observaron en concentraciones de glucosa de 50 a 100 g/L que corresponden a los tratamientos de los puntos centrales y al de nivel alto de concentración de glucosa, esto es debido a que la adición de glucosa provoca un incremento en los niveles de cAMP (a través del sistema Gpr1p-Gpa2p) y a su vez activa a la proteína-cinasa (PKA) que tiene una función importante en la percepción de la situación nutricional del medio y a la respuesta a estrés induciendo al crecimiento fermentativo de la levadura (Thevelein, 1994). Por lo cual al incrementar la concentración de glucosa en el medio de cultivo tiene un efecto positivo sobre el crecimiento de las levaduras.

Además, la fuente de nitrógeno es un nutriente esencial para el crecimiento fermentativo debido a que la síntesis de proteínas, la biogénesis de los ribosomas, la transcripción, el ciclo celular, la meiosis, la absorción de nutrientes y la autofagia están regulados por la actividad de TORC1 (Loewith *et al.*, 2002; Wedaman *et al.*, 2003; Reinke *et al.*, 2004), la cual se regula en la membrana vacuolar mediante la interacción de cuatro proteínas: Ego1, Ego3, Gtr1 y Gtr2, que juntas forman el complejo EGO (Dubouloz *et al.*, 2005), donde Gtr1 unido a GTP en complejo heterodimérico con Gtr2 unido a GDP estimula a TORC1 en respuesta a aminoácidos, así como la privación de leucina desencadena la interacción transitoria Iml1, dependiente de Npr2 y Npr3

inhibiendo la función de TORC1 (Kim *et al.*, 2008; Sancak *et al.*, 2008). Por lo cual, la baja concentración de aminoácidos en el medio de cultivo provenientes de la fuente de nitrógeno empleada (extracto de levadura) afectó de manera negativa el crecimiento de las levaduras en los tratamientos con concentraciones bajas de extracto de levadura 1 g/L, aun en concentraciones altas de glucosa 100 g/L causando fermentaciones lentas. Por lo cual, el incremento de la concentración del extracto de levadura ejerció un efecto positivo sobre el crecimiento de las levaduras.

No obstante, ya que las vías de señalización de nutrientes están interconectadas, las cuales pueden ser activadas por más de un nutriente y diversas situaciones de estrés. La baja concentración de glucosa disminuyen la actividad de la vía cAMP-PKA dando lugar a la expresión de genes de respuesta a estrés como la proteína quinasa Rim15p, que ha sido propuesta como una proteína integradora de las vías de señalización de carbono y nitrógeno (Zaman *et al.* 2008; Conrad *et al.* 2014). Donde al disminuir los niveles de cAMP la subunidad regulatoria Bcy1p se une a las subunidades catalíticas inactivándolas y Rim15p se activa estimulando la entrada a la fase estacionaria (Reinders *et al.*, 1998), ya que levaduras con genes de RIM15 desactivados tienen un crecimiento fermentativo aun en condiciones estresante (Olivares-Marin *et al.*, 2018), debido a esto se observó una interacción entre la glucosa y el extracto de levadura en concentraciones altas. Por consiguiente se demostró que el incremento en la concentración de la fuente de carbono (glucosa) y nitrógeno (extracto de levadura) ejercen un efecto positivo en el crecimiento de las cepas transformantes de *S. cerevisiae* y silvestre de *K. marxianus*.

Además, la levadura *S. cerevisiae* muestra cinco fases de crecimiento bien definidas cuando se cultiva en medios líquidos con glucosa como fuente de carbono: la fase *lag*, la fase logarítmica, el cambio diáuxico, la fase postdiáuxica y la fase estacionaria. La fase *lag* es un periodo de adaptación en el cual la célula se prepara para dividirse (Tortora *et al.*, 1986). Durante la fase logarítmica las células alcanzan su máxima velocidad de duplicación y llevan a cabo un metabolismo fermentativo del que se produce etanol. Al disminuir la concentración de glucosa, las células atraviesan por el cambio diáuxico, un periodo breve de tiempo en el cual no hay división celular y la

célula cambia de un metabolismo fermentativo a uno respiratorio. En la fase postdiáxica las células usan como fuente de carbono el etanol producido durante la fase logarítmica e incrementan su resistencia al estrés gradualmente; en tanto que la fase estacionaria se presenta cuando los nutrientes del medio se han agotado y no hay división celular (Werner *et al.*, 1993).

Mientras que la galactosa presente en el medio de cultivo debe convertirse en el intermediario glucolítico glucosa-6-fosfato mediante la vía Leloir altamente conservada (Kew y Douglas, 1976) y la mayoría de los genes que codifican los componentes de esta vía, así como los transportadores de galactosa (GAL1, GAL10, GAL7 y GAL2) se agrupan en el regulon GAL (Campbell *et al.*, 2008; Sellick *et al.*, 2008) y debido a que el vector de expresión para producir las lipasas contiene el promotor GAL1, las lipasas se produjeron después del cambio diáxico ya que los genes GAL están fuertemente regulada por el tipo de fuente de carbono y en presencia de glucosa están reprimidos. Por lo cual, la concentración de galactosa tuvo un efecto positivo debido a la inducción ejercida en el incremento de la actividad metabólica en la vía Leloir y consecuentemente en el vector de expresión.

Una de las estrategias para el diseño de biorreactores a nivel industrial es el modelado con ecuaciones de escalamiento de los parámetros cinéticos obtenidos a partir de biorreactores a nivel piloto y laboratorio. Por lo cual se estudiaron los parámetros cinéticos en un biorreactor de tanque agitado de 3 L con un volumen de trabajo de 1.5 L donde la producción de lipasas fue mayor que en los experimentos realizados a nivel matraz debido a que la levadura consume más oxígeno con galactosa como fuente de carbono (Olivares-Marin *et al.*, 2017). Además de que un biorreactor permite controlar la aireación, el pH y la temperatura para obtener mayores cantidades de células o productos. Las levaduras transformantes tuvieron una fase de adaptación de cuatro horas seguida de una fase de crecimiento exponencial, donde no se observó la formación de lipasas ya que es un producto no asociado con el crecimiento. Mientras que en la fase estacionaria si se observó la formación de producto, debido a que la producción de proteínas es proporcional a la velocidad de absorción de oxígeno presente en el medio de cultivo y la producción de lipasas puede incrementar al

modificar los niveles de aireación suministrado al biorreactor. Así como otras variables: pH del medio de cultivo, fuentes de nitrógeno, temperatura; velocidad de agitación.

**V. CONCLUSIONES**

Con base al estudio realizado, se determinó que la concentración de glucosa y el extracto de levadura tiene un efecto positivo sobre el crecimiento de las cepas Lip3; 107w; *S. cerevisiae*; *K. marxianus*, y las mejores concentraciones de glucosa para el crecimiento de cada cepa fueron diferentes: 55, 27, 50 y 100 g/L, respectivamente. Además, las lipasas exportadas al medio extracelular por las cepas Lip3 y 107w mantuvieron la actividad y la mejor respuesta de actividad lipásica fue con una concentración de galactosa de 30 g/L.

El coeficiente de rendimiento de producto que se obtuvieron bajo una velocidad de agitación de 300 rpm; temperatura de 30° C y aireación de 2 vvm para de la cepa transformante Lip3 107w; *S. cerevisiae* y *K. marxianus* fueron de 97.37 U/g, 63.55, 0 y 64.04 U/g de células secas, respectivamente. Por consiguiente la producción de lipasas de manera heteróloga es una alternativa para maximizar la producción de enzimas a nivel industrial con un rendimiento de 50% más a diferencia de la cepa silvestre de *K. marxianus*.

### VI. RECOMENDACIONES

Debido a que la levadura sintetiza las lipasas bajo la actividad metabólica respiratoria, se considera interesante evaluar niveles de aireación superiores a los 2 vvm y agitación de 300 rpm, para determinar parámetros de transferencia de masa como el  $k_La$  y el coeficiente  $Q_{O_2}$ .

Determinar el efecto principal de factores como: pH del medio, temperatura, fuentes de carbono no fermentables, fuentes de nitrógeno, tiempo de residencia, entre otros, sobre el rendimiento de producción de lipasas.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida C., Queiros O., Wheals A., Teixeira J., y Moradas-Ferreira P. (2003). Acquisition of flocculation phenotype by *Kluyveromyces marxianus* when overexpressing GAP1 gene encoding an isoform of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J. Microbiol. Methods*, 55(2), 433-440.
- Anobom C. D., Pinheiro A. S., De-Andrade R. A., Aguiéiras E. C. G., Andrade G. C., Moura M. V., Almeida R. V., y Freire D. M. (2014). From Structure to Catalysis: Recent Developments in the Biotechnological Applications of Lipases. *BioMed Research International*.
- Auria R., Ortiz I., Villegas E., y Revah S. (1995). Influence of growth and high mould concentration on the pressure drop in solid state fermentations. *Proc. Biochem.*, 30(8), 751-756.
- Azeredo L. A. I., Gomes P. M., Sant'Anna G. L. Jr., Castilho L. R., y Freire D. M. G. (2007). Production and regulation of lipase activity from *Penicillium restrictum* in submerged and solid-state fermentations. *Current Microbiology*, 54, 361-365.
- Ball M. M., Raynal A., Guerineau M., y Iborra F. (1999). Construction of efficient centromeric, multicopy and expression vectors for the yeast *Kluyveromyces marxianus* using homologous elements and the promoter of a purine-cytosine-like permease. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 1(2), 347-353.
- Barros M., Fleuri L. F., y Macedo G.A. (2010). Seed lipases: Sources, applications and properties—A review. *Braz. J. Chem. Eng*, 27, 15-29.
- Bergkamp R. J., Bootsman T. C., Toschka H. Y., Mooren A. T., Kox L., Verbakel J. M., Geerse R. H., y Planta R. J., (1993), Expression of an alpha-galactosidase gene under control of the homologous inulinase promoter in *Kluyveromyces marxianus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 40(3), 309-317.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bhardwaj K., Raju A., y Rajasekharan R. (2001). Identification; purification; and characterization of a thermally stable lipase from rice bran. A new member of the (phospho) lipase family. *Plant Physiol*, 127(4), 1728-38.
- Bradford M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Campbell R. N., Leverentz M. K., Ryan L. A., y Reece R. J. (2008). Metabolic control of transcription: paradigms and lessons from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.*, 414, 177-187.
- Carr P. D. y Ollis D. L. (2009).  $\alpha/\beta$  Hydrolase Fold: An Update. *Protein & Peptide Letters*, 16, 1137-1148.
- Castilho L. R., Polato C. M. S., Baruque E. A., Sant'Anna G. L. Jr., y Freire D. M. G. (2000). Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state and submerged fermentations. *Biochemical Engineering Journal*, 4(3), 239-247.
- Christensen M. W., Andersen L., Husum T. L., y Kirk O. (2003). Industrial lipase immobilization. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 105(6), 318-321.
- Ciafardini G., Zullo B. A., y Iride A. (2006). Lipase production by yeasts from extra virgin olive oil. *Food. Microbiol.*, 23(1), 60-67.
- Conrad M., Schothorst J., Kankipati H. N., Zeebroeck G. V., Rubio-Teixeira M. y Thevelein J. M. (2014). Nutrient sensing and signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev.*, 38, 254-299.
- Coradi G. V., da Visitacão V. L., Lima E. A., Tsuchida L. Y. S., Palmier D. A., Takita M. A., Neto P. O., y De lima V. M. G. (2012). Comparing submerged and solid-state fermentation of agro-industrial residues for the production and characterization of lipase by *Trichoderma harzianum*. *Ann. Microbiol.*, 63(2), 533-540.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Cuero R. G., Smith J. E., y Lacey J. A. (1985). A novel containment system for laboratory scale solid particulate fermentations, *Biotechnol. Lett.*, 7(7), 463-466.
- D'Annibale A., Sermanni G. G., Federici F., y Petruccioli M. (2006). Olive-mill wastewaters: a promising substrate for microbial lipase production. *Bioresour. Technol.*, 97(15), 1828-1833.
- Darvishi F. (2012). Expression of native and mutant extracellular lipases from *Yarrowia lipolytica* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Biotechnology*, 5(5), 634-641.
- Dashko S., Zhou N., Compagno C., y Piškur J. (2014). Why, when, and how did yeast evolve alcoholic fermentation? *FEMS Yeast Res*, 14, 826-832.
- De Deken R. H. (1966). The Crabtree effect: a regulatory system in yeast. *Microbiology*, 44, 149-156.
- De Reu J. C., Zwietering M. H., Rombouts F. M., y Nout M. J. R. (1993). Temperature control in solid substrate fermentation through discontinuous rotation. *App. Microbiol. Biotechnol.*, 40, 261-265.
- Ribeiro B. D., Castro A. M. de, Coelho M. A. Z., y Freire D. M. G. (2011). Production and Use of Lipases in Bioenergy: A Review from the Feedstocks to Biodiesel Production, *Enzyme Research*.
- Diniz R. H., Silveira W. B., Fietto L. G., y Passos F. M. (2012). The high fermentative metabolism of *Kluyveromyces marxianus* UFV-3 relies on the increased expression of key lactose metabolic enzymes. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 101, 541-550.
- Dubouloz F., Deloche O., Wanke V., Camerini E., y De Virgilio C. (2005). The TOR and EGO protein complexes orchestrate microautophagy in yeast. *Mol. Cell.*, 19, 15-26.
- Ferreira-Dias, S., Sandoval G., Plou F., y Valero F. (2013). The potential use of lipases in the production of fatty acid derivatives for the food and nutraceutical industries. *Electron. J. Biotechnol.*, 16(3), 1-34.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Groeneveld P., Stouthamer A. H, y Westerhoff H. V. (2009). Super life—how and why ‘cell selection’ leads to the fastest-growing eukaryote. *The Febs J.*, 276(1), 254-270.
- Gupta R., Gupta N., y Rathi P. (2004). Bacterial lipases: An overview of production, purification and biochemical properties. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 64(6), 763-81.
- Gupta R., Kumari A., Syal P., y Sinhh Y. (2015). Molecular and functional diversity of yeast and fungal lipases: Their role in biotechnology and cellular physiology. *Prog. Lipid Res*, 57, 40-54.
- Gutarra M. L., Cavalcanti E. D., Castilho L. R., Freire D. M., y Sant'Anna G. L. (2005). Lipase production by solid-state fermentation: cultivation conditions and operation of tray and packed-bed bioreactors. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 121(124), 105-16.
- Haack M. B., Olsson L., Hansen K., y Lantz A. E. (2006). Change in hyphal morphology of *Aspergillus oryzae* during fed-batch cultivation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 70(4), 482-487.
- Hasan F., Shah A. A., Javed S., y Hameed A. (2010). Enzymes used in detergents: Lipases. *Afr. J. Biotechnol.*, 9(31), 4836-4844.
- Hong J., Wang Y., Kumagai H., y Tamaki H. (2007). Construction of thermotolerant yeast expressing thermostable cellulase genes. *J. Biotechnol.*, 130(2), 114-123.
- Hou C. T., y Yuji S. (2009). Lipases, industrial uses. In: Schaechter, M., Lederberg, J., editors. *Encyclopedia of Microbiology*, 3rd edition. Elsevier Ltd. 385-392.
- Hwang H. T., Qi F., Yuan C., Zhao X., Ramkrishna D., Liu D., y Varma A. (2014). Lipase-catalyzed process for biodiesel production: Protein engineering and lipase production. *Biotechnol. Bioeng.*, 111(4), 639-653.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Jaeger K-E., Dijkstra B. W., y Reetz M. T. (1999). BACTERIAL BIOCATALYSTS: Molecular Biology, Three-Dimensional Structures, and Biotechnological Applications of Lipases. *Annu. Rev. Microbiol*, 53, 315–51.
- Kew O. M y Douglas H. C. (1976). Genetic co-regulation of galactose and melibiose utilization in *Saccharomyces*. *J. Bacteriol.*, 125, 33-41.
- Kim E., Goraksha-Hicks P., Li L., Neufeld T. P., y Guan K. L. (2008). Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response. *Nat. Cell. Biol.*, 10, 935-945.
- Lock L. L., Corbellini V. A., y Valente P. (2007). Lipases produced by yeasts: Powerful biocatalysts for industrial purposes. *Tecno-Logica*, 11, 18-25.
- Loewith R., Jacinto E., y Wullschleger S. (2002). Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Mol. Cell.*, 10, 457-468.
- Lohr D. y López J. (1995). GAL4/GAL80-dependent nucleosome disruption/deposition on the upstream regions of the yeast GAL1-10 and GAL80 genes. *J. Biol. Chem.*, 270, 27671-27678.
- López-Alvarez A., Díaz-Pérez A. L., Sosa-Aguirre C., Macías-Rodríguez L., y Campos-García J. (2012). Ethanol yield and volatile compound content in fermentation of agave must by *Kluyveromyces marxianus* UMPe-comparing with *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeast used in tequila production. *J. Biosci. Bioeng.*, 113(5), 614-618.
- Madrigal-Pérez L. A., Canizal-Garcia M., González-Hernández J. C., Reynoso-Camacho R., Nava M. G., y Ramos-Gomez M. (2016). Energy-dependent effects of resveratrol in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*.
- Mahadik N. D., Puntambekar U. S., Bastawde K. B., Khire J. M., y Gokhale D. V. (2002). Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. *Process Biochemistry*, 38(5), 715-721.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Mateos D. J. C., Rodríguez J. A., Roussos S., Cordova J., Abousalham A., Carriered F., y Baratti J. (2006). Lipase from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid state fermentation than liquid fermentation procedures. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(5), 1042-1050.
- Miller G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.*, 31, 426.
- Mitchel D. A., Berovic M., y Krieger N. (2002). Overview of solid state bioprocessing. *Biotechnology Annual Review*, 8, 183-225.
- Mitchell D. A., Krieger N., Stuart D. M., y Pandey A. (2000). New developments in solid-state fermentation II Rational approaches to the design, operation and scale-up of bioreactors. *Process Biochemistry*, 35(10), 1211-1225.
- Mitchell D. A., Pandey A., Sangsurasak P., y Krieger N. (1999). Scale-up strategies for packed-bed bioreactors for solid-statefermentation. *Process Biochemistry*, 35, 167-178.
- Mohamed M. A., Mohamed T. M., Mohamed S. A., y Fahmy A. S. (2000). Distribution of lipases in the Gramineae Partial purification and characterization of esterase from *Avena fatua*. *Bioresource Technology*, 73, 227-234.
- Moussavou M. R. W., Brunschwig C., Baréa B., Villeneuve P., y Blin J. (2013). Are plant lipases a promising alternative to catalyze transesterification for biodiesel production? *Prog. Energy Combust. Sci.*, 39, 441-456.
- Nevoigt E. (2008). Progress in metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 72(3), 379-412.
- Olivares-Marin I. K, Madrigal-Pérez L. A., Canizal-Garcia M., González-Hernández J. C. y Regalado-González C. (2017). Response of the Energetic Metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* to Different Nutritional Conditions of Carbon and Nitrogen. *The faseb Journal*, 31(1), 624.1.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Olivares-Marin I. K., Madrigal-Perez L. A., Canizal-Garcia M., García-Almendárez B. E., González-Hernández J. C., y Regalado-Gonzalez C. (2018). Interactions between carbon and nitrogen sources depend on RIM15 and determine fermentative or respiratory growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 102(10), 4535-4548.
- Palma M. B., Pinto A. L., Gombert A. K., Seitz K. H., Kivatinitz S. C., Castilho L. R., y Freire D. M. (2000). Lipase production by *Penicillium restrictum* using solid waste of industrial babassu oil production as substrate. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 84(86), 1137-1145.
- Pandey A. y Radhakrishnan S. (1992). Packed-bed column bioreactor for production of enzyme. *Enz Mic. Technol.*, 14(6), 486-488.
- Pandey A. (1991). Aspects of fermenter design for solid-state fermentations. *Proc. Biochem.*, 26(6), 355-361.
- Pandey A., Soccol C. R., y Mitchell D. (2000). New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. *Process. Biochem.*, 35(10), 1153-1169.
- Pecota D. C, Rajgarhia V., y Da Silva N. A. (2007). Sequential gene integration for the engineering of *Kluyveromyces marxianus*. *J. Biotechnol.*, 127(3), 408-416.
- Pecota D. C. y Da Silva N. A. (2005). Evaluation of the tetracycline promoter system for regulated gene expression in *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnol. Bioeng.*, 92(1), 117-123.
- Rahaman R. N. Z. R. A., Salleh A. B., y Basri M. (2006). Lipases: Introduction In New Lipases and Proteases. *Nova Science Publishers Inc.*, 1, 1-12.
- Raimondi S., Uccelletti D., Amaretti A., Leonardi A., Palleschi C., y Rossi M (2009). Secretion of *Kluyveromyces lactis* Cu/Zn SOD: strategies for enhanced production, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 86, 871-878.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Raimondi S., Zanni E., Amaretti A., Palleschi C., Uccelletti D., y Rossi M. (2013). Thermal adaptability of *Kluyveromyces marxianus* in recombinant protein production. *Microb. Cell Fact.*, 12(34).
- Rajendra A., Palanisamy A., y Thangavelu V. (2009). Lipase catalyzed ester synthesis for food processing industries. *Braz. arch. biol. technol.*, 52(1), 207-219.
- Ray A. (2012). Application of Lipase in Industry, *Asian J. Pharm. Tech.*, 2, 33-37.
- Reinders, A., Bürckert, N., Boller, T., Wiemken, A., y De Virgilio C. (1998). *Saccharomyces cerevisiae* cAMP-dependent protein kinase controls entry into stationary phase through the Rim15p protein kinase. *Genes Dev.* 12, 2943-2955.
- Reinke A., Anderson S., y McCaffery J. M. (2004). TOR complex 1 includes a novel component, Tco89p (YPL180w), and cooperates with Ssd1p to maintain cellular integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 279, 14752-14762.
- Rocha S. N. Abrahão-Neto J., Cerdán M. E., Gombert A. K., y González-Siso M. I. (2011). Heterologous expression of a thermophilic esterase in *Kluyveromyces* yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 89(2), 375-385.
- Rocha S. N. Abrahão-Neto J., Cerdán M. E., González-Siso M., y Gomber A. K. (2010). Heterologous expression of glucose oxidase in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Microb. Cell Fact.*, 9(4).
- Rodriguez J. A., Mateos J. C., Nungaray J., González V., Bhagnagar T., Roussos S., Cordova J., y Baratti J. (2006). Improving lipase production by nutrient source modification using *Rhizopus homothallicus* cultured in solid state fermentation. *Process Biochemistry*, 41, 2264-2269.
- Roermund C.W.T., Waterham H.R., Ijlst L., y Wanders R.J.A. (2003). Fatty acid metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell. Mol. Life. Sci.*, 60(9), 1838-1851.
- Sancak Y., Peterson T. R., Shaul Y. D., Lindquist R. A., Thoreen C. C., Bar-Peled L, y Sabatini D. M. (2008). The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science*, 320, 1496-1501.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Sangsurasak P. y Mitchell D. A. (1995). Incorporation of death kinetics into a 2-D dynamic heat transfer model for solid state fermentation. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 64(3), 253-260.
- Sargantanis J., Karim M. N., Murphy V. G., Ryoo D., y Tengerdy R. P. (1993). Effect of operating conditions on solid substrate fermentation. *Biotech. Bioeng.*, 42(2), 149-158.
- Sellick C. A., Campbell R. N., y Reece R. J. (2008). Galactose metabolism in yeast-structure and regulation of the Leloir pathway enzymes and the genes encoding them. *Int. Rev. Cell. Mol. Biol.*, 269, 111-150.
- Singh A. K. y Mukhopadhyay M. (2012). Overview of Fungal Lipase: A Review. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 166(2), 486-520.
- Thevelein, J. M. (1994). Signal transduction in yeast. *Yeast*, 10, 109-130.
- Tortora J. G., F., R.B. y Case L. C. (1986). Microbiology. Menlo Park, CA, USA, Benjamin/Cummings Publishing Company Inc.
- Ul-Haq I., Idrees S., y Rajoka M. I. (2002). Production of lipases by *Rhizopus oligosporus* by solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, 37, 637-641.
- Villeneuve P. (2003). Plant lipases and their applications in oils and fats modification. *Eur. J. Lipid. Sci. Technol.*, 6(105), 308-317.
- Wedaman K. P., Reinke A., Anderson S., Yates J., McCaffery J. M., y Powers T. (2003). Tor kinases are in distinct membrane-associated protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell.*, 14, 1204-1220.
- Werner W. M., B. E., Johnston G.C., y Singer R. A (1993). Stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological Reviews*, 57, 383-401.
- Zaman S., Lippman S. I., Zhao X., y Broach J. R., (2008). How *Saccharomyces* responds to nutrients, *Annu. Rev. Genet.*, 42, 27-81.