

EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS SECRETADAS POR *Candida palmioleophila* DURANTE LA DEGRADACIÓN DE ACEITE DE PALMA

CAMILA ANDREA CÁCERES VILLAMIZAR

UNIVERSIDAD DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, NATURALES Y AGROPECUARIAS
MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL
BUCARAMANGA
2019

EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS SECRETADAS POR *Candida palmioleophila* DURANTE LA DEGRADACIÓN DE ACEITE DE PALMA

CAMILA ANDREA CACERES VILLAMIZAR

Trabajo de aplicación realizado como requisito para optar el título de

MICROBIÓLOGO INDUSTRIAL




Director:

German Alexis Zafra Sierra, PhD.

Codirector:

Wilfredo Valdivieso Quintero, MSc

UNIVERSIDAD DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, NATURALES Y AGROPECUARIAS
MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL
BUCARAMANGA
2019

   <p>Universidad de Santander <small>Personería Jurídica No. 210 de 12-03-98 del Departamento de Vigilancia MinEducación</small> UDES <small>VIGILADA MINEDUCACIÓN</small></p>	MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL	
	ACTAS DE SUSTENTACIÓN DE TRABAJOS DE GRADO VAF-FT-007-UDES	Fecha: 11/07/2018 Versión: 02

SC-CER440961

ACTA DE EVALUACIÓN DE TRABAJOS DE GRADO

En Bucaramanga a los 13 días del mes de marzo del 2019, en cumplimiento a los requisitos exigidos para la culminación de trabajo de grado se llevó a cabo la evaluación de:

TÍTULO DE TRABAJO DE GRADO: EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE PROTEINAS SECRETADAS POR *Candida palmioleophila* DURANTE LA DEGRADACIÓN DE ACEITE DE PALMA

MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL

15331001

CÁCERES

VILLAMIZAR

CAMILA ANDREA

DIRECTOR TRABAJO DE GRADO: German Alexis Zafra Sierra

CODIRECTOR: Wilfredo Valdivieso Quintero


DOCENTES EVALUADORES: 1. Amalia Fernanda León Gallo


2. Mónica Fajardo López


CONCEPTO EVALUADORES: APROBADO

CALIFICACIÓN: 4.6

En constancia firman:

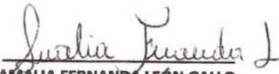

GERMAN ALEXIS ZAFRA SIERRA
 C.C 13872680
DIRECTOR TRABAJO DE GRADO


WILFREDO VALDIVIESO QUINTERO
 C.C 91352352
CODIRECTOR


ANDREA JULIANA MANTILLA
 C.C 52718690
DIRECTORA

PROGRAMA DE MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL




AMALIA FERNANDA LEÓN GALLO
 C.C. 1052387842
EVALUADOR


MÓNICA FAJARDO LÓPEZ
 C.C 52030796
EVALUADOR

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, por su apoyo incondicional y comprensión, siendo siempre mi motivación para ser la mejor. Todos mis triunfos serán dedicados a ellos ya que todo lo que soy en esta vida es gracias a lo que me enseñaron.

A mi director de tesis PhD German Zafra y mi codirector MSc Wilfredo Valdivieso Quintero, quienes con su ayuda y conocimiento me guiaron para poder realizar este proyecto.

A mi alma máter, la Universidad de Santander y todos sus docentes, por la excelente educación y los conocimientos que recibí para formarme como profesional integral.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	12
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	16
3. JUSTIFICACIÓN.....	18
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	20
5. HIPÓTESIS.....	21
6. MARCO TEÓRICO.....	22
6.1. Grasas y aceites.....	22
6.2 Aceite de palma	23
6.3. Contaminación ambiental por grasas y aceites	25
6.4. Degradación biológica de grasas y aceites.....	26
6.5. <i>Candida palmioleophila</i>	27
6.6. Lipasas	29
6.6.1. Lipasas producidas por el género <i>Candida spp.</i>	32
7. ANTECEDENTES.....	36
8. OBJETIVOS.....	40
8.1 General.....	40
8.2 Específicos	40

9. METODOLOGÍA	41
9.1 Tipo de estudio.....	41
9.2 Material Biológico.	41
9.3 Reactivación del <i>Candida palmioleophila</i>	41
9.4 Cultivo de <i>Candida palmioleophila</i> en presencia de aceite de palma.	42
9.5 Separación de proteínas extracelulares.	42
9.5.1 Obtención de proteínas intracelulares.	43
9.6 Electroforesis de proteínas SDS-PAGE.....	43
9.7 Isoelectroenfoque y electroforesis en 2D.....	44
9.8 Determinación de la variabilidad de los perfiles proteicos	45
10. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	46
10.1 Cultivo de <i>C. palmioleophila</i> en presencia de aceite de palma	46
10.2 Determinación de variabilidad de perfiles proteicos SDS-PAGE	46
10.3 Caracterización de proteínas lipolíticas por 2D-EF	51
11. CONCLUSIONES.....	56
12. RECOMENDACIONES	58
13. BIBLIOGRAFÍA.....	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de un triglicérido del aceite de palma (1-palmitoil-2,3-dioleoil-sn-glicerol) (M. & C., 2009).....	24
Figura 2. Reacciones mediadas por lipasas (Sharma & Kanwar, 2014).	30
Figura 3. Representación gráfica de la electroforesis bidimensional (Fernando de la Cuesta Marina, 2010)	35
Figura 4. Eliminación de grasas y aceites (COD) por aislados microbianos individuales en medio líquido MBS con 0,05% de aceite de palma (Agualimpia et al. 2016; Rodríguez - Mateus et al. 2016).	38
Figura 5. Perfil electroforético de proteínas extracelulares secretadas por cepa SACL11 de <i>Candida palmioleophila</i> . Carril 1: marcador de peso molecular, Carril 2: proteínas secretadas a las 48 horas de exposición al aceite de palma.	49
Figura 6. Perfil electroforético de proteínas intracelulares de la cepa SACL11 de <i>Candida palmioleophila</i> . Carril 1: marcador de peso molecular. Carril 2: perfil proteico a las 12 horas. Carril 3: perfil proteico a las 24 horas. Carril 4: perfil proteico a las 48 horas.	50
Figura 7. Perfil electroforético bidimensional de proteínas estándar de <i>E. coli</i> (1,35 mg/ml).	51
Figura 8. Perfil electroforético bidimensional de las proteínas extracelulares de <i>Candida palmioleophila</i> SACL-11 a las 48 horas de exposición al aceite de palma.....	53

Figura 9. Perfil electroforético bidimensional de las proteínas intracelulares de *Candida palmioleophila* SACL-11 a las 48 horas de exposición al aceite de palma..... 54

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Perfil de ácidos grasos del aceite de palma crudo por zonas palmeras (M. & C., 2009)..... 24

Tabla 2. Peso molecular de lipasas secretadas por el género *Candida spp.* 33

RESUMEN

Título: EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS SECRETADAS POR *Candida palmioleophila* DURANTE LA DEGRADACIÓN DE ACEITE DE PALMA

Autor: Camila Andrea Cáceres Villamizar

Palabras clave: *Candida palmioleophila*, lipasas, electroforesis bidimensional, grasas y aceites.

Descripción:

El presente estudio tuvo como objetivo determinar la expresión diferencial de enzimas secretadas por una cepa lipolítica de *C. palmioleophila* durante la degradación del aceite de palma. La caracterización de las proteínas fue realizada en diferentes intervalos de tiempo, por medio de un estudio descriptivo experimental con técnicas moleculares como la electroforesis de proteínas SDS-PAGE y electroforesis en 2D.

Se encontró que la mayor expresión de perfiles proteicos tanto intracelulares como extracelulares de la cepa SACL-11 de *Candida palmioleophila* se presentó a las 48 horas de exposición al aceite de palma. El perfil proteico intracelular estuvo conformado por nueve bandas proteicas diferentes con un rango de peso molecular desde los 18.7 hasta los 216.5 KDa, dentro de las cuales las proteínas extracelulares con pesos moleculares de 52.9 KDa y 45.9 KDa podrían corresponder a lipasas y/o esterases encargadas del proceso de biotransformación del aceite de palma. Además, una banda de 49.2 KDa presentó similitud con las lipasas LIP4 y LIP8 descritas previamente para *Candida albicans*.

En cuanto a los perfiles bidimensionales, se observó una mayor cantidad de spots para las proteínas extracelulares en comparación con las intracelulares. El estudio demostró que en efecto existen diferencias entre los perfiles proteicos de las enzimas extracelulares secretadas por *Candida palmioleophila* *SACL-11* a través del tiempo, especialmente en la cantidad de bandas/spots expresados, en su peso molecular y punto isoeléctrico durante la degradación del aceite de palma.

ABSTRACT

Title: DIFFERENTIAL EXPRESSION OF SECRETED PROTEINS BY *Candida palmioleophila* DURING PALM OIL DEGRADATION

Author: Camila Andrea Cáceres Villamizar

Keywords: *Candida palmioleophila*, lipases, two-dimensional electrophoresis, fats and oils.

Description:

The objective of the present study was to determine the differential expression of enzymes secreted by a lipolytic strain of *C. palmioleophila* during the degradation of palm oil. The characterization of the proteins was carried out in different time intervals, by means of an experimental descriptive study with molecular techniques such as SDS-PAGE and 2D electrophoresis.

The highest expression of both intracellular and extracellular protein profiles of the SACL-11 strain of *Candida palmioleophila* occurred 48 hours after exposure to palm oil. The intracellular protein profile consisted of nine different bands with a molecular weight range from 18.7 KDa to 216.5 KDa, within which extracellular proteins with molecular weights of 52.9 KDa and 45.9 KDa could correspond to lipases and / or esterases involved in palm oil biotransformation. In addition, a 49.2 KDa band resembled LIP4 and LIP8 lipases described previously in *Candida albicans*.

Regarding the two-dimensional profiles, a higher number of spots was observed for intracellular proteins compared to extracellular ones. The study showed that there are differences between the protein profiles of the extracellular enzymes secreted by *Candida palmioleophila* SACL-11 over time, especially in the number of bands / spots expressed, in their molecular weight and isoelectric point during the degradation of palm oil.

INTRODUCCIÓN

Los lípidos son uno de los principales componentes de desechos generados en la industria alimentaria, provocando daños al medio ambiente, debido a la formación de películas de aceites en la superficie acuática, interrumpiendo la difusión de oxígeno y provocando obstrucciones a causa de la emulsión de estos con materia orgánica. Además, un litro de desecho lipídico puede comprometer aproximadamente un millón de litros de agua natural. Así mismo, la metanización de grasas y aceites en aguas contaminadas contribuye al aumento del efecto invernadero. (Okino-Delgado et al., 2017).

Con respecto a la producción de grasas y aceites a nivel mundial, América se ha consolidado como el segundo puesto después de Asia, con una producción del 23% a nivel mundial (Cárdenas, 2016). En esta región el aceite de palma tiene un rol fundamental en el desarrollo de la agroindustria debido a la generación de empleo y al desarrollo de nuevas empresas relacionadas con este producto (Cárdenas, 2016). Sin embargo, las plantaciones de palma aceitera están causando problemas al medio ambiente debido a que su alta demanda para la fabricación de biocombustibles, lo cual incrementa la deforestación en países tropicales donde los cultivos palma sustituye a los bosques naturales (Mujica, 2010).

Colombia es el país con mayor producción de palma de aceite (*Elaeis guineensis Jacq*) en América Latina, lo cual convierte a este cultivo en uno de gran importancia económica para el país; sin embargo, la industria aceitera durante su proceso de refinación genera un efluente altamente contaminante denominado POME (*Palm Oil Mill Effluents*). Este residuo se caracteriza por ser de color amarillo, con un olor fuerte, de naturaleza ácida y por contener una demanda química de oxígeno (DQO) y una demanda bioquímica de oxígeno (DBO) de entre 44.300-102.696 mg/L y 25.000-65.714 mg/L respectivamente (Wang et al., 2015). Además, sin importar su naturaleza altamente contaminante, en la mayoría de las industrias no se realiza un tratamiento adecuado de este residuo, lo cual produce impactos negativos sobre el medio ambiente, tales como la contaminación de suelos, ecosistemas acuáticos y la pérdida de biodiversidad (Wang et al., 2015).

No obstante, existen tratamientos para mitigar la contaminación generada por la refinación del aceite de palma, entre los cuales destaca la biorremediación, en donde se implementan variedades de sistemas que utilizan organismos vivos con capacidad de degradar, remover o transformar compuestos tóxicos o contaminantes en productos metabólicos mucho más simples e inocuos con el medio ambiente y la salud humana (Li, Wrenn, & Venosa, 2005). Por ejemplo, la degradación biológica de los lípidos puede ser mediada por enzimas de la familia lipasa, las cuales pueden encontrarse en plantas, animales y microorganismos. Estas enzimas tienen como función principal metabolizar lípidos, teniendo como característica peculiar que son enzimas solubles en agua que actúan sobre sustratos insolubles y agregados, por lo que operan unidas a interfaces lípido-agua (González-Bacero et al., 2010).

Así mismo, las lipasas también son de gran importancia a nivel industrial, debido a sus múltiples aplicaciones como aditivos alimentarios en la modificación del sabor, síntesis de ésteres con una importante actividad antioxidante, hidrólisis de grasas para la fabricación de detergentes, tratamiento de aguas residuales específicamente en la degradación y remoción de sustratos grasos (aceitosos), eliminación de lípidos y aceites en la industria cosmética y farmacéutica, así como en el tratamiento de los cueros en la industria marroquinera y la producción de biocombustibles, entre otros (Diez & Sandoval, 2012). Estas enzimas pueden ser producidas en grandes cantidades, ya que en su mayoría son obtenidas a partir de microorganismos, entre los que sobresalen los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Staphylococcus*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Candida*, *Aspergillus* y *Geotrichum sp* por su capacidad para producir lipasas extracelulares. Así mismo, debido a la amplia utilidad de las lipasas, las investigaciones se han enfocado en la búsqueda de nuevos microorganismos con diferentes propiedades lipolíticas deseadas (Diez & Sandoval, 2012).

Particularmente, los microorganismos del género *Cándida* presentan el mayor potencial para producción de lipasas que ha sido reportado en la literatura, siendo las enzimas producidas por *C. rugosa* unas de las más utilizadas por la industria, debido a su alta actividad en procesos tanto de hidrólisis como de síntesis (Diez & Sandoval, 2012). Sin embargo, a pesar de la gran importancia de las levaduras de este género, se posee poca información sobre las enzimas lipolíticas secretadas por la levadura *Candida palmioleophila*, la cual ha sido previamente reportada como capaz de asimilar el aceite crudo de palma (Nakase, Takashi; Itoh, Mutsumi; Suzuki, Motofumi; Komagata, Kazuo; Kodama, 1988), gracias a que dentro de su maquinaria metabólica contiene enzimas con capacidad de hidrolizar los ácidos grasos, similares a las lipasas LIP2 y LIP6, previamente descritas para la levadura *Candida albicans* (Rodríguez-mateus, Pacheco, & Zafra, 2018).

Por tanto, el objetivo del presente estudio fue determinar la expresión diferencial de enzimas extracelulares secretadas por una cepa lipolítica de *Candida palmioleophila* durante la degradación de aceite de palma por medio del uso de técnicas moleculares como la electroforesis de proteínas SDS-PAGE y la electroforesis bidimensional, además de la implementación de herramientas bioinformáticas para el análisis de los perfiles proteicos obtenidos.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El manejo de los residuos peligrosos en Colombia es un reto constante, siendo uno de ellos el manejo de residuos de grasas y aceites producidos a nivel doméstico e industrial. Con base en ello, una de las mayores preocupaciones son los suministros de agua, los cuales al ser contaminados con grasas y aceites ocasionan daños físicos a los organismos allí presentes, además de perjudicar la transferencia de oxígeno (Congreso de Colombia, 1996). Otra de las consecuencias de la contaminación con grasas y aceites es la producción de efectos tóxicos sobre organismos, como algas y peces. Además de las innumerables pérdidas de ecosistemas naturales y problemas en la salud y calidad de vida de la población cercana a estos (Ruiz Aguilar, Fernández Sánchez, & Rodríguez Vázquez, 2001).

En Colombia, la palma de aceite (*Elaeis guineensis Jacq*) se siembra principalmente en áreas previamente dominadas por sabana y bosques naturales, lo cual incrementa su deforestación debido a que estas zonas son sustituidas por cultivos de palma (Castilla., 2004). Además, la eliminación inadecuada de los desechos procedentes de los aceites, grasas, efluentes y lodos contaminados por el proceso de refinación de petróleo, principalmente los efluentes del molino derivados del procesamiento del aceite de palma, provocan un deterioro del medio ambiente y de la salud humana. La composición del POME incluye altas cantidades de aceite

y grasa (O & G), sólidos suspendidos totales (SST), demanda química de oxígeno (DQO) y demanda bioquímica de oxígeno (DBO), lo cual provoca la mayoría de los efectos contaminantes en los cursos de agua debido a sus propiedades (Rodríguez-mateus, Agualimpia, & Zafra, 2016). De modo que el residuo POME debido a sus componentes, se clasifica como un residuo peligroso por la reglamentación establecida en el Convenio de Basilea (Congreso de Colombia, 1996)

Sin embargo, una de las alternativas que se conoce para solucionar el problema de la contaminación ambiental por grasas y aceites, son las lipasas microbianas, las cuales se caracterizan por su gran capacidad para remover dichos contaminantes (González-Bacero, Rodríguez Hernández, & del Monte Martínez, 2010). Existen innumerables estudios sobre las lipasas producidas por múltiples microorganismos; sin embargo, existen muy pocas revisiones sobre las enzimas lipolíticas que secreta la levadura *Candida palmioleophila*, la cual según estudios previos realizados por el grupo de investigación CIBAS (Rincón, Agualimpia & Zafra 2018; Rodríguez-Mateus, Agualimpia & Zafra 2016; Rodríguez-Mateus, Vera & Zafra 2018) tiene un amplio potencial para la degradación de compuestos lipídicos. Además, uno de los problemas crónicos que presenta Colombia es la falta de recursos económicos, lo cual conlleva a limitar el desarrollo científico en temas relacionados con biorremediación, conociéndose muy pocos estudios sobre *Candida palmioleophila* en Colombia, lo cual impide la generación de alternativas que permitan disminuir el actual problema de contaminación en el país.

JUSTIFICACIÓN

El tratamiento de la contaminación generada por la refinación del aceite de palma es realizado por medio del concepto de biorremediación, el cual describe una variedad de sistemas que utilizan organismos vivos para remover, degradar o transformar compuestos orgánicos tóxicos en productos metabólicos menos inocuos. Con ello se consigue acelerar procesos biodegradativos que de forma natural ocurren en ecosistemas contaminados (Cruz et al., 2016). Este proceso es llevado a cabo por microorganismos capaces de utilizar compuestos tóxicos del espacio contaminado, a través de reacciones metabólicas mediadas por un conjunto de enzimas, entre las que se destacan lipasas, fosfolipasas y esterases (Li et al., 2005). *Candida palmioleophila* es una levadura reportada como capaz de asimilar aceite crudo de palma (Nakase, Takashi; Itoh, Mutsumi; Suzuki, Motofumi; Komagata, Kazuo; Kodama, 1988) demostrando que el microorganismo es una solución al problema de contaminación debido a su uso efectivo para la remoción de materia orgánica, grasas y aceites en tratamientos de efluentes de esta industria.

La necesidad del presente estudio surge a partir de la falta de conocimiento sobre el perfil de expresión de las enzimas lipolíticas producidas por *Candida palmioleophila*, las cuales han sido evaluadas preliminarmente y catalogadas como degradadoras eficientes de grasas y aceites. Aunque a pesar de tener gran potencial a nivel industrial y de biorremediación, se

han realizado muy pocas investigaciones para caracterizarlas, existen algunas publicaciones que respaldan el tema como las realizadas por el grupo de investigación CIBAS (Rincón, Agualimpia & Zafra 2018; Rodríguez-Mateus, Agualimpia & Zafra 2016; Rodríguez-Mateus, Vera & Zafra 2018). A pesar de ellos existe un vacío en el conocimiento por lo que la información obtenida a partir de este estudio sirve para correlacionar la variabilidad de las enzimas con las diferencias en la eficiencia de degradación observadas previamente para esta levadura. Estos datos ayudan a ampliar el conocimiento existente sobre este microorganismo y sientan las bases de estudios posteriores que busquen modificar o mejorar su actividad catalítica, así como para anotar los genes, clonarlos, expresarlos y purificarlos.

Los potenciales resultados del presente estudio tienen un impacto positivo sobre la comunidad científica nacional e internacional mediante la generación de nuevo conocimiento sobre los perfiles proteicos intracelulares y extracelulares de *Candida palmioleophila*, además de la divulgación de resultados en forma de artículos y ponencias. El proyecto también tiene importancia en ámbitos como la formación de recurso humano, siendo este necesario para el desarrollo de ciencia y tecnología para el país, logrando beneficiar a la comunidad científica con el conocimiento adquirido. Sin mencionar su aporte en el área de la industria, para la potencial generación de productos necesarios para la población colombiana, tales como; detergentes, textiles, fármacos, entre otros. Así mismo, este estudio contribuye a la preservación de los ecosistemas colombianos, debido a la capacidad que poseen las lipasas para degradar grasas y aceites, las cuales son un agente principal de contaminación en el país, logrando así mitigar el impacto ambiental generado por el refinamiento de aceites vegetales como el aceite de palma. Por tanto, las enzimas lipolíticas

secretadas por *Candida palmioleophila* tienen un papel fundamental en procesos de biorremediación tanto de aguas como de suelos contaminados

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Qué diferencias se presentan en los perfiles de las enzimas extracelulares secretadas por una cepa lipolítica de *Candida palmioleophila* durante la degradación del aceite de palma?

HIPÓTESIS

Los perfiles proteicos de las enzimas extracelulares secretadas por *Candida palmioleophila* SACL-11 difieren a través del tiempo en su peso molecular y punto isoeléctrico durante la degradación del aceite de palma.

MARCO TEÓRICO

6.1. Grasas y aceites

Las grasas y aceites son compuestos de origen animal o vegetal de naturaleza lipídica; siendo el término “lípidos” atribuido a compuestos orgánicos de origen biológico, formados por átomos de carbono, hidrógeno y oxígeno, con la particularidad de ser insolubles en agua y solubles en solventes orgánicos (Maddelainne, 2014). Los triglicéridos al estar en estado sólido a temperatura ambiente son denominados grasas, mientras que los que son líquidos se conocen como aceites. Así mismo, los triglicéridos constituyen la familia más abundante de los lípidos, siendo depósitos concentrados de energía, los cuales pueden ser clasificados como monoacilglicéridos, diacilglicéridos y triacilglicéridos (Panreac Química S.A, 2014)

Los ácidos grasos químicamente son cadenas hidrocarbonadas de diferentes longitudes, que poseen un grupo carboxilo (-COOH) en su extremo y pueden ser clasificados como saturados o insaturados. Por otra parte, los ácidos grasos son constituyentes principales de los triacilglicéridos y lípidos complejos, sin embargo, también pueden encontrarse de forma libre. Este tipo de lípidos es una de las fuentes más importantes de energía para las células, ya que puede ser oxidado hasta obtener como producto final ATP (Maddelainne, 2014).

Además, cabe destacar que la degradación de los ácidos grasos es un proceso sencillo donde intervienen múltiples enzimas, entre las cuales destacan las lipasas quienes catalizan la hidrólisis de los enlaces éster presentes en los acilgliceroles in vivo y pueden catalizar la hidrólisis o síntesis de un grupo amplio de ésteres carboxílicos (González-Bacerio et al., 2010).

6.2 Aceite de palma

El aceite de palma es extraído del mesocarpio del fruto de la semilla de la palma africana *Elaeis guineensis jacq* a través de procedimientos mecánicos. Está constituido por ésteres de glicerol (triglicéridos) y es una fuente importante de carotenos y de vitamina E. Gracias a que en su composición cuenta con ácidos grasos saturados e insaturados y a su aporte nutricional, este aceite es ampliamente utilizado tanto es su fracción líquida (oleína) como su fracción sólida (estearina) para la elaboración de mezclas de aceites, margarinas, grasas de repostería y confitería, entre otras (M. & C., 2009). Además, en la actualidad debido a su amplia producción a nivel mundial se ha empezado a utilizar en otros campos como lo es el de producción de biocombustibles, detergentes, cosméticos, plásticos, farmacéuticos, entre otros, lo cual convierte al aceite de palma en una materia prima de gran interés para el desarrollo industrial (M. & C., 2009).

La composición de los triglicéridos del aceite de palma es; 1-palmitoil-2,3-dioleoil-sn-glicerol (figura 1), estando constituido por ácidos grasos insaturados como el oleico (36-44%) y el linoleico (9-12%), además, cuenta con ácidos grasos saturados como el palmítico (39.3-47.5%) y el esteárico (3.5-6%) (tabla 1) (M. & C., 2009).

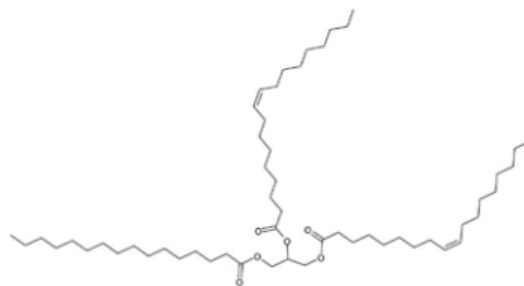


Figura 1. Estructura de un triglicérido del aceite de palma (1-palmitoil-2,3-dioleoil-sn-glicerol) (M. & C., 2009).

Tabla 1. Perfil de ácidos grasos del aceite de palma crudo por zonas palmeras (M. & C., 2009).

Ácidos grasos	Concentración de ácidos grasos en zonas palmeras colombianas (ppm)				Promedio	Coeficiente de variación (%)
	Central	Norte	Oriental	Occidental		
Láurico	0.32-0.46	0.16-0.40	0.19-0.40	0.2-0.3	0.27	28
Mirístico	0.88-1.116	0.88-1.26	0.85-1.15	0.94-1.1	0.99	8
Palmítico	40.65-44.15	41.20-45.77	39.60-44.12	39.99-44.59	42.71	3

Palmitoleico	0.1-0.321	0.10-0.26	0.10-0.25	0.1-0.19	0.17	28
Esteárico	4.5-4.92	4.01-4.73	4.37-5.57	4.71-5.00	4.66	10
Oleico	9.56-10.29	8.81-10.34	9.11-11.40	10.4-11.52	9.92	7
Linoleico	0.24-0.43	0.24-0.41	0.24-0.45	0.25-0.45	0.30	17
Linolénico	0.28-0.4	0.26-0.44	0.28-0.44	0.3-0.4	0.37	12

6.3. Contaminación ambiental por grasas y aceites

En la actualidad, existen aproximadamente cinco millones de hectáreas de palma sembradas en el mundo, representando 16 millones de toneladas de producción anual, siendo Colombia el mayor productor de aceite de palma en América y el cuarto más grande del mundo (Soleimaninanadegani & Manshad, 2014). Sin embargo, a pesar de la gran importancia económica de la industria del aceite de palma, esta también contribuye a la contaminación ambiental debido a su producción de grandes cantidades de subproductos provenientes del proceso de extracción del aceite (Agualimpia, Otero, & Zafra, 2013).

La industria aceitera genera efluentes de la planta de aceite de palma (POME), estimándose que por cada 1,5 m³ de agua requerida para procesar una tonelada de racimo de fruta fresca, la mitad de esta cantidad se convierte en POME (Rodriguez-mateus et al., 2016). Este residuo se caracteriza por ser un líquido amarillo concentrado, con un olor fuerte, además, su demanda química de oxígeno (DQO) y la demanda bioquímica de oxígeno (DBO) están en un rango de 44.300-102.696 mg/L y 25.00-65.714 mg/L respectivamente. Debido a la naturaleza acida del residuo (pH 3.4-5.2), a su alto contenido de sólidos suspendidos (18.000-46.011 mg/L), aceite y grasa (4.000-9.341 mg/L), la descarga no tratada de POME puede

implicar efectos desfavorables en el ambiente como la contaminación de suelos, ecosistemas acuáticos, y la pérdida de biodiversidad (Wang et al., 2015).

6.4. Degradación biológica de grasas y aceites

La degradación biológica de los lípidos es denominada lipólisis, donde lípidos complejos como los acilglicéridos son transformados en compuestos más simples como ácidos grasos y glicerol. Posteriormente los ácidos grasos simples por medio de un proceso catabólico llamado beta oxidación son modificados mediante de la remoción sucesiva de átomos de carbono hasta obtener como producto final dos moléculas de acetil-CoA que pueden ingresar al ciclo de Krebs y coenzimas reducidas (NADH y FADH₂) que pueden ingresar a la cadena respiratoria (Parés I. Farrás, 1997). Una vez las moléculas de acetil-CoA entran al ciclo de Krebs son oxidadas por medio de una cascada de reacciones enzimáticas, donde finalmente se da una liberación CO₂ y junto con la fosforilación oxidativa se produce energía almacenada en forma de adenosin trifosfato (ATP) (Parés I. Farrás, 1997). Así mismo, las lipasas durante su proceso de hidrólisis enzimática de grasas y aceites liberan compuestos lipídicos sencillos, los cuales pueden ser ingresados al proceso catabólico de la beta oxidación y continuar con las diferentes rutas metabólicas (González-Bacerio et al., 2010).

Por otra parte, existen diversos tratamientos biológicos anaerobios y aerobios para la biorremediación de suelos o aguas contaminadas con grasas y aceites, sin embargo, estos dependen significativamente de las actividades microbianas que estén actuando sobre el contaminante. Además, se ha demostrado que el residuo de la industria de aceite de palma POME constituye un hábitat potencial para bacterias y hongos lipolíticos termófilos

asociados con la producción de enzimas como las lipasas, encargadas de acelerar la hidrólisis de lípidos, convirtiéndolos en ácidos grasos y alcohol (Soleimaninanadegani & Manshad, 2014).

Algunos de los principales géneros de hongos y bacterias identificados con capacidad de degradar POME son *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumiga*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Mucor*, *Candida*, *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus* (Diez & Sandoval, 2012). Esta biodegradación está asociada en el caso de los hongos con su capacidad saprófita para crecer y degradar las fuentes de carbono presentes en los efluentes industriales, reduciendo el compuesto contaminante por medio de su potente actividad enzimática (Soleimaninanadegani & Manshad, 2014). Enzimas como las lipasas tienen como propósito principal hidrolizar las grasas y compuestos complejos presentes en el contaminante, convirtiéndolos en compuestos más sencillos y biodisponibles, fáciles de transformar y biodegradar (Agualimpia et al., 2013); estos compuestos pueden ser utilizados en algunos organismos como depósitos de reserva de energía metabólica, o en otros casos interactúan con otras biomoléculas para realizar una función como parte de complejos tales como las lipoproteínas, o como agregados lipídicos presentes en las membranas celulares.

6.5. *Candida palmioleophila*

Investigaciones realizadas en 1983 reportaron el aislamiento de una cepa de levadura denominada Y-128, la cual tenía la capacidad de asimilar aceite rudo de palma y mostraba características similares a *Torulopsis candida*; sin embargo, en 1987 Milenrama y Meyer corrigieron el diagnóstico del género *Candida*, transfiriendo a todas las especies conocidas

del género *Torulopsis* al género *Candida*. A pesar de que la cepa Y-128 presentaba similitudes con microorganismos como *Candida saitoana* y *Candida famata*, gracias a exhaustivos análisis de DNA, se logró determinar que esta correspondía a una nueva especie llamada *Candida palmioleophila*, cuyo nombre fue atribuido debido a su eficiencia para asimilar aceite crudo de palma. Entre algunas de las características descritas para esta levadura se encuentra que tiene una temperatura óptima de crecimiento entre los 41-42°C (Nakase, Takashi; Itoh, Mutsumi; Suzuki, Motofumi; Komagata, Kazuo; Kodama, 1988).

Estudios en el año 2013 demostraron la capacidad de varios microorganismos de utilizar al aceite crudo de palma como única fuente de carbono, siendo *Candida palmioleophila* uno de los microorganismos encontrados. Estos aislados lograron disminuir de forma efectiva la concentración de compuestos orgánicos (grasas y aceites) en el residuo POME, en un período corto de tiempo (48 h), lo cual según el autor proporciona ventajas para el proceso de biorremediación de aguas y suelos contaminados con este desecho (Agualimpia et al., 2013). Otras investigaciones confirman que la levadura *Candida palmioleophila* tiene la capacidad de producir enzimas lipolíticas de 63kDa y 28kDa, las cuales se presume están involucradas durante el metabolismo de aceites vegetales, ya que solo aparecen en los perfiles proteicos cuando el microorganismo se encuentra expuesto a grasas y aceites (L. J. Rincón, Agualimpia, & Zafra, 2018). Además, se determinó que por lo menos tres genes que codifican para lipasas están presentes en *C. palmioleophila* y dos de ellos, LIP2 y LIP6 similares a los genes de *C. albicans* (Rodríguez-mateus et al., 2018).

Por otra parte, *Candida palmioleophila* no solo tiene la capacidad de degradar grasas y aceites, también ha sido descrita como un microorganismo con potencial para la decoloración

de tintes azo, los cuales son considerados como compuestos xenobióticos (Jafari, Kasra-Kermanshahi, & Reaz Soudi, 2013). Un estudio realizado en 2013 evaluó la capacidad de la cepa JKS4 de *Candida palmioleophila* para decolorar tintes azoicos bajo condiciones aeróbicas, donde mostró un 85,7% de decoloración durante las primeras 24 horas, lo cual conllevó a que fuera catalogada como un microorganismo útil para una aplicación práctica en la biotransformación de diversos efluentes de colorantes (Jafari et al., 2013).

El género *Candida* también es conocido por su capacidad para ocasionar infecciones a humanos, donde por lo menos 30 de sus especies son catalogadas como patógenos nosocomiales (Brandt & Lockhart, 2012). *Candida palmioleophila* fue descrita como un patógeno nosocomial aislado de sangre humana, con un perfil de susceptibilidad único, debido a su alta susceptibilidad a las equinocandinas y a su resistencia al fluconazol (Jensen & Arendrup, 2011). Además, se demostró que los aislados clínicos de *C. palmioleophila* presentan patrones de crecimiento uniforme a temperaturas de 40°C con tonalidades purpuras o rojas en sus colonias en el medio de cultivo CHROMagar (Jensen & Arendrup, 2011).

6.6. Lipasas

Las lipasas (EC 3.1.1.3, triacilglicerol lipasas) son enzimas con la capacidad de catalizar una amplia variedad de reacciones como la hidrólisis parcial o total de triacilglicéridos y reacciones de esterificación, transesterificación e interesterificación de los lípidos, transformándolos en ácidos grasos libres, diglicéridos, monoglicéridos y glicerol (figura 2). Estas enzimas pueden encontrarse en plantas, animales y microorganismos, donde tienen como función principal metabolizar lípidos, teniendo como característica peculiar que son enzimas solubles en agua que actúan sobre sustratos insolubles y agregados, por lo que

operan unidas a interfaces lípido-agua (González-Bacero et al., 2010). Además, son de gran interés químico ya que poseen una amplia especificidad por diferentes sustratos y una elevada regioselectividad y enantioselectividad, lo que ha convertido a las lipasas en las enzimas con mayor uso en procesos de biotransformación (De León & Bejega García, 2015).

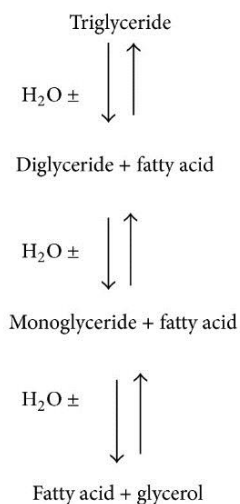


Figura 2. Reacciones mediadas por lipasas (Sharma & Kanwar, 2014).

Ahora bien, las lipasas requieren una activación interfacial para llevar al máximo su actividad catalítica; este fenómeno consiste en el incremento de la actividad enzimática en presencia de interfaces lípido-agua. Cuando la enzima entra en contacto con una interfase, el ambiente dieléctrico en la superficie proteica se modifica, potenciando las interacciones electrostáticas, haciendo que la cubierta del centro activo se desplace, produciéndose una reestructuración en la conformación de la molécula proteica. Como resultado, se produce un incremento de la afinidad de la enzima por los sustratos lipídicos y contribuye a la estabilización del estado de transición durante el ciclo catalítico (González-Bacero et al., 2010). Sin embargo, las lipasas

pueden ser inhibidas por organofosfatos como el dietil-p-nitrofenilfosfato y el diisopropil-fluorofosfato, por las carbodiimidas en presencia de nucleófilos como el glicin-etil éster. También puede inhibirse por los ácidos borónicos y el fenil-metil-dulfonil-sulfuro, así como por metales pesados, el EDTA, algunos terpenos, los iones halógenos, los alcaloides, el cloroformo, entre otros (González-Bacerio et al., 2010). Además, el interés en la producción biotecnológica de las lipasas se debe a sus múltiples aplicaciones como aditivos alimentarios en la modificación del sabor, síntesis de ésteres con una importante actividad antioxidante, hidrólisis de grasas para la fabricación de detergentes, tratamiento de aguas residuales específicamente en la degradación y remoción de sustratos grasos (aceitosos), eliminación de lípidos y aceites en la industria cosmética y farmacéutica, así como en el tratamiento de los cueros en la industria marroquinera y la producción de biocombustibles, entre otros (Diez & Sandoval, 2012).

Las lipasas pueden ser producidas en grandes cantidades, ya que en su mayoría son obtenidas a partir de microorganismos, tales como bacterias, hongos filamentosos, levaduras y actinomicetos, entre los que sobresalen los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Staphylococcus*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Candida*, *Aspergillus* y *Geotrichum sp* por su capacidad para producir lipasas extracelulares, facilitando la recuperación de estas enzimas a partir del medio de cultivo. Así mismo, dado que las lipasas son enzimas con una amplia utilidad, la investigación se ha enfocado en la búsqueda de nuevos microorganismos con diferentes propiedades lipolíticas deseadas (Diez & Sandoval, 2012). Por otra parte, las lipasas además de catalizar la hidrólisis de enlaces esterés en los triacilglicéridos, también juegan un papel fundamental en la patogénesis microbiana; por ejemplo, la actividad lipasa es requerida para la colonización y persistencia de patógenos bacterianos. Así mismo, se ha evidenciado que

las lipasas interfieren con la respuesta inmune de las células hospederas de diferentes patógenos microbianos. *Mycobacterium tuberculosis* también utiliza enzimas lipolíticas para hidrolizar los lípidos de la célula hospedera durante la infección para luego utilizar los ácidos grasos liberados como su fuente de energía (Park, Do, & Jung, 2013).

6.6.1. Lipasas producidas por el género *Candida*.

Los microorganismos del género *Cándida* presentan el mayor potencial para producción de lipasas que ha sido reportado en la literatura, siendo las lipasas producidas por *C. rugosa* unas de las más utilizadas por la industria, debido a su alta actividad en procesos tanto de hidrólisis como de síntesis (Diez & Sandoval, 2012). La tabla 1 muestra una recopilación de las lipasas producidas por diferentes especies del género *Candida*.

Tabla 2. Peso molecular de lipasas secretadas por el género *Candida*.

Microorganismo	Peso molecular (KDa)	Referencias
<i>Candida albicans</i> ATCC36082	Lip1: 50.8, Lip2: 50.4, Lip3: 51.4, Lip4: 49.6 Lip5: 50, Lip6: 50.5 Lip7: 47.9, Lip8: 49.7 Lip9: 349.2, Lip10: 50.4	(Hube et al., 2000) (Fu et al., 1997)
<i>Candida antarctica</i>	33	(Høegh, Patkar, Halkier, & Hansen, 1995) (Rotticci-Mulder, Gustavsson, Holmquist, Hult, & Martinelle, 2001)
<i>Candida cylindracea</i> L 1754	L1: 58 L2: 58 Lipasa 62KDa	(Vakhlu & Kour, 2006) (L. J. Rincón et al., 2018)
<i>Candida cylindracea</i> (preparación comercial)	LA: 62, LB: 62 LC: 62	(Benjamin & Pandey, 1998)
<i>Candida rugosa</i> ATCC 14380	Lip1: 57.2, Lip2: 57.7 Lip3: 57.2, Lip4: 57 Lip5: 56.9 Lipasas de: 60, 62 y 64	(Lee, Tang, Sun, & Shaw, 1999) (L. J. Rincón et al., 2018)
<i>Candida rugosa</i> DMS 2031	LipA: 64, LipB: 62 LipC: 60	(Benjamin & Pandey, 2001)
<i>Candida palmioleophila</i> SACL-11	Lip2: 50.4, Lip6: 50.5 Posibles lipasas de 63 y 28	(Rodríguez-mateus et al., 2018) (L. J. Rincón et al., 2018)
<i>C. parapsilosis</i>	Lipasa 60	(L. J. Rincón et al., 2018)

Sin embargo, a pesar de la gran utilidad de las lipasas del género *Candida* a nivel industrial, estas también han sido implicadas en diversos factores de virulencia de patógenos fúngicos.

Por ejemplo, las lipasas de *C. parapsilosis* son responsables de la destrucción de tejidos epiteliales y epidérmicos (Park et al., 2013).

6.7. Análisis de perfiles proteicos y proteómica

La proteómica es una tecnología emergente que permite el análisis y la comparación simultánea de múltiples proteínas. Una de las metodologías aplicadas en la proteómica es la electroforesis bidimensional (figura 3), la cual está basada en la electroforesis convencional de proteínas SDS-PAGE, en la que se separan las proteínas según su peso molecular (Fernando de la Cuesta Marina, 2010) y en una técnica de isoelectroenfoque (IEF) que separa las proteínas por su punto isoeléctrico.

El IEF consiste en que al aplicar una diferencia de potencial en una región que presenta cierto gradiente de pH, lo cual provoca que las moléculas anfotéricas (proteínas) se muevan a lo largo del gradiente hasta alcanzar el punto en el que el gradiente de pH iguala su punto isoeléctrico; en ese momento, la carga neta de la proteína será neutra, lo que detendrá su movimiento (Fernando de la Cuesta Marina, 2010). Posteriormente, las proteínas son separadas según su peso molecular por medio de la electroforesis SDS-PAGE en geles de poliacrilamida, constituyendo la segunda dimensión, lo que permite una mejor y mayor separación de las proteínas, las cuales forman patrones que pueden ser caracterizados (Facio et al., 2013). Además, para poder visualizar las proteínas en un gel bidimensional se debe realizar una tinción de las proteínas presentes en el gel. Algunas de las técnicas más utilizadas son la tinción con azul de Coomassie y con nitrato de plata, sin embargo, en la actualidad se

cuenta con tinciones como el Coomassie G-250 o tinciones fluorescentes como el SYPRO Ruby (Fernando de la Cuesta Marina, 2010).

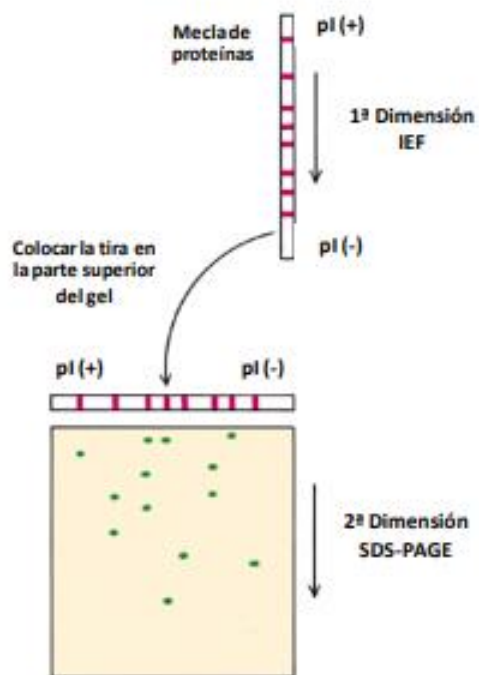


Figura 3. Representación gráfica de la electroforesis bidimensional (Fernando de la Cuesta Marina, 2010)

ANTECEDENTES

En 1997 se demostró por primera vez que *Candida albicans* además de tener genes que codificaban para fosfolipasas también contenía genes de la familia de las lipasas (LIP1). Sin embargo, estos solo se expresaban cuando el microorganismo se encontraba en un ambiente donde su única fuente de carbono fueran triacilglicéridos, es decir, lípidos (Fu et al., 1997). Dos años más tarde, se realizó un análisis de la familia de genes que codifican para lipasas en *Candida rugosa*, por medio de una PCR de transcripción inversa donde se logró identificar y cuantificar la expresión de los genes de lipasas, encontrándose que su orden en abundancia de ARNm es; LIP1, LIP3, LIP2, LIP5 y LIP4 (Lee et al., 1999). Hube y colaboradores en el año 2000 caracterizaron algunas lipasas de *Candida albicans*, las cuales tienen un peso molecular en KDa entre 47.2 y 51.4. Once años más tarde se clonaron y caracterizaron los genes LIP5 y LIP10 también pertenecientes a *Candida albicans*, los cuales tenían un peso molecular de 50 kDa y 50.4kDa respectivamente.

Por otra parte, Agualimpia (2013) durante su investigación sobre microorganismos nativos con potencial para la degradación de grasas y aceites provenientes de efluentes de la refinación de aceite de palma logró aislar a la levadura *Candida palmioleophila*, la cual fue utilizada junto con microorganismos como *Bacillus spp*, *Pseudomonas spp*. y *Yarrowia spp*. para analizar la eficiencia de degradación de grasas y aceites con consorcios microbianos. Además, los porcentajes de disminución de la demanda química de oxígeno (DQO) para los

aislamientos de las cepas SACL01, SACL09 y SACL11 correspondientes a levaduras del género *Candida* presentaron altos porcentajes de degradación a las 72 horas de evaluación, siendo del 56%, 72% y 79% respectivamente.

Así mismo, Rodríguez y colaboradores en 2016 caracterizaron microorganismos nativos con la capacidad de degradar grasas y aceites a partir de muestras de residuos líquidos provenientes del proceso de refinación de aceite de palma (Rodríguez-Mateus, Agualimpia & Zafra 2016). En dicho estudio se caracterizaron tanto bacterias como levaduras, entre las cuales se destaca *Candida palmioleophila* la cual ha sido previamente reportada como capaz de degradar grasas y aceites (Nakase, Takashi; Itoh, Mutsumi; Suzuki, Motofumi; Komagata, Kazuo; Kodama, 1988), lo cual se confirma según el estudio de Rodríguez (2016) donde la cepa SACL-11 de *C. palmioleophila* presentó el mayor porcentaje de remoción de grasas y aceites en el residuo POME a las 48 y 72h (figura 4).

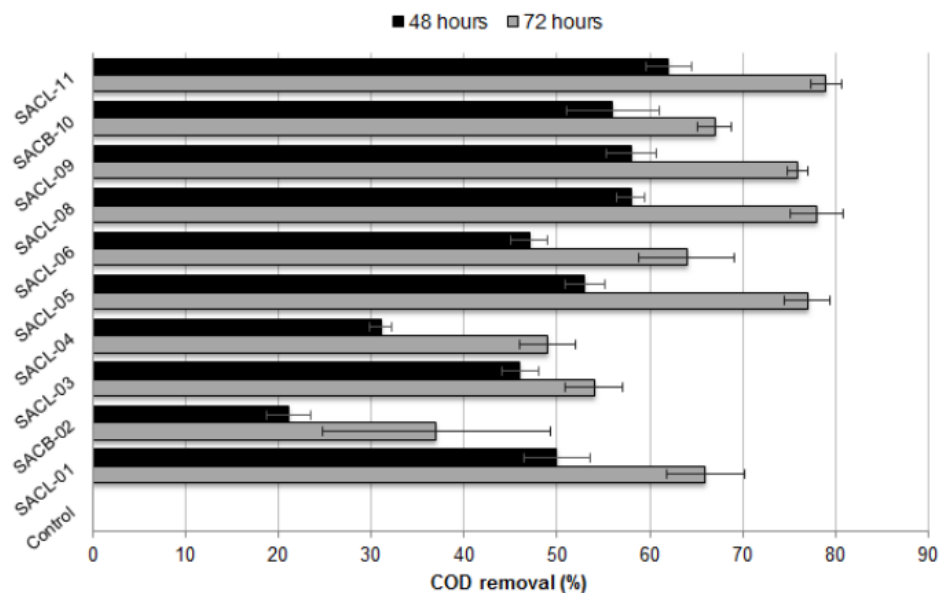


Figura 4. Eliminación de grasas y aceites (COD) por aislados microbianos individuales en medio líquido MBS con 0,05% de aceite de palma (Tomado de: Rodríguez-Mateus, Agualimpia & Zafra 2016).

Adicionalmente, investigaciones en 2018 sobre los perfiles de proteínas diferenciales de la levadura lipolítica *Candida palmioleophila* en diferentes condiciones de crecimiento reportan que esta utiliza tanto aceite de palma como de girasol como fuente de carbono para su crecimiento. Así mismo, se demostró que las diferencias en las concentraciones de aceite pueden influir en el crecimiento de la levadura en mayor medida que la concentración de nitrógeno disponible, aunque la presencia de altas concentraciones (2%) de sulfato de amonio en el medio favorecen su crecimiento. Además, el uso eficiente del aceite de palma por la cepa SACL11 de *C. palmioleophila* concuerda con estudios previos, en los que esta cepa fue la que presentó la mayor eficiencia en la eliminación del aceite de palma crudo entre diferentes cepas de *C. palmioleophila* y bacterias degradantes (Agualimpia, Otero & Zafra 2016; Rodríguez -Mateus et al. 2016), produciendo enzimas de 63 kDa y 28 kDa solo cuando es expuesta a los aceites, lo cual sugiere que estas tienen un papel fundamental en la hidrólisis de los compuestos lipídicos (L. J. Rincón et al., 2018).

Por otra parte, también en 2018, en un estudio basado en la detección molecular y caracterización de nuevos genes de lipasa de la levadura lipolítica *Candida palmioleophila* se logró identificar que por lo menos tres genes que codifican para lipasas están presentes en *C. palmioleophila* y dos de ellos LIP2 y LIP6 similares a los genes de *C. albicans*. Además, los dendrogramas basados en el análisis de grupos UPGMA separaron los perfiles de bandas

en dos grupos principales: uno agrupando la mayoría de las cepas de *C. palmioleophila* que mostraron la mayor eficiencia de degradación del aceite de palma (cepas SACL11, SACL05 y SACL08) y los otros agrupan la mayoría de las cepas de *C. palmioleophila* con una eficiencia de degradación promedio del aceite de palma (cepas SACL01, SACL03, SACL06 y SACL09) (Rodríguez-mateus et al., 2018).

OBJETIVOS

8.1 General

Determinar la expresión diferencial de enzimas secretadas por una cepa lipolítica de *Candida palmioleophila* durante la degradación de aceite de palma

8.2 Específicos

Obtener los perfiles electroforéticos de las proteínas secretadas por *Candida palmioleophila* en diferentes periodos de tiempo durante la degradación de aceite de palma.

Establecer diferencias a través del tiempo entre los perfiles de las proteínas secretadas durante la degradación de aceite de palma.

METODOLOGÍA

9.1 Tipo de estudio.

Descriptivo experimental.

9.2 Material Biológico.

El microorganismo evaluado en este estudio corresponde a una cepa de levadura degradadora de grasas y aceites de la especie *Candida palmioleophila*, identificada como SACL-11, previamente aislada a partir de residuos sólidos y líquidos del proceso de extracción de aceite de palma y caracterizadas mediante técnicas de biología molecular (Agualimpia, Otero & Zafra 2016; Rodríguez-Mateus, Agualimpia & Zafra 2016).

9.3 Reactivación de *Candida palmioleophila*.

La cepa se descongeló y reactivó por cultivo a 30°C durante 48 horas en medio MBS líquido enriquecido con diversas fuentes de carbono y nitrógeno, conteniendo (g/L): ((NH₄)₂SO₄, 2; K₂HPO₄, 0.9; KH₂PO₄, 0.6; MgSO₄, 0.2; CaCO₃, 0.5; extracto de levadura 0.1; FeSO₄, 0.0002; C₆H₁₂O₆, 2; lactosa, 2; glicerol, 0.5; peptona, 1) (Agualimpia et al., 2013).

9.4 Cultivo de *Candida palmioleophila* en presencia de aceite de palma.

El cultivo de *C. palmioleophila* en presencia de aceite de palma se llevó a cabo a escala laboratorio, en Erlenmeyers con un volumen final de 100 mL. Para ello se preparó un inóculo de 48 horas de *Candida palmioleophila* SACL-11 en 10 mL de medio MBS enriquecido. Las células fueron centrifugadas y lavadas en PBS 1X (g/L 4.03 g de NaCl, 0.11 g de KCl, 0.575 g de Na₂HPO₄ y 0.10g de KH₂PO₄), para eliminar las fuentes de carbono del medio. Posteriormente el cultivo se realizó en 250 ml de medio de cultivo líquido MBS2 con aceite de palma comercial (Búcaro, lote 3090816/1), conteniendo (g/L): ((NH₄)₂SO₄, 2; K₂HPO₄, 0.9; KH₂PO₄, 0.6; MgSO₄, 0.2; CaCO₃, 0.5; extracto de levadura 0.1; FeSO₄, 0.0002; C₆H₁₂O₆, 2; aceite de palma 1% y 4%) (Aguilimpia, Otero & Zafra 2016). El medio de cultivo MBS2 tuvo como fuente de carbono al aceite de palma y como fuente de nitrógeno al sulfato de amonio. El experimento se realizó por triplicado a una temperatura de 37°C, por 48 horas, sin aireación y con una agitación de 100 rpm.

9.5 Separación de proteínas extracelulares.

Para la obtención de las proteínas secretadas por la levadura en presencia de aceite de palma, se tomaron muestras de 10 ml del cultivo de *C. palmioleophila* en medio MBS2 cada 12 horas (0, 12, 24 y 48). Los 10 ml fueron centrifugados a 5.000 rpm por 20 min y se separó el sobrenadante del pellet celular. Posteriormente se filtraron 4 ml del sobrenadante por medio

de tubos Amicon ® Ultra-4 10K Centrifugal Filter Devices (Millipore), centrifugando a 5.000 rpm por 20 minutos. Este último paso se repitió con el fin de aumentar la concentración de proteínas extracelulares. Finalmente, para recuperar el soluto concentrado, se insertó una pipeta en la parte inferior del dispositivo de filtro y retiró la muestra utilizando un movimiento de barrido de lado a lado para asegurar la recuperación total.

9.5.1 Obtención de proteínas intracelulares.

Se tomaron muestras del pellet celular del cultivo de *C. palmioleophila* en medio MBS2 cada 12 horas (0, 12, 24 y 48). Las muestras del pellet fueron llevadas a baño maría (100°C) por 15 minutos, lo cual provocó la lisis celular de la levadura, permitiendo obtener las proteínas intracelulares secretadas durante el proceso de degradación del aceite de palma. El lisado resultante fue conservado por congelación a -20°C hasta su uso.

9.6 Electroforesis de proteínas SDS-PAGE.

La separación de las proteínas se realizó mediante la electroforesis SDS-PAGE (Zhang et al., 2011), en geles de poliacrilamida (10 cm x 7,3 cm) en concentraciones de 12% (p/v) para la separación y 4% (p/v) para el gel de stacking a partir de las proteínas (intracelulares y extracelulares) obtenidas en la etapa anterior. La separación se llevó a cabo en una cámara de electroforesis vertical Mini Protean4 (Bio-rad) a 150 voltios por 1 hora, sembrando en cada pozo 15 µl de cada extracto de proteínas y utilizando como patrón el marcador de peso molecular Broad Range Protein Molecular Marker (Promega). Posteriormente los geles fueron coloreados mediante tinción con nitrato de plata; para esto, los geles se introdujeron

en una solución de fijación (ml/L): (Ácido acético 120; etanol 250 y formaldehído 0.25) por una hora con agitación constante y después, fueron lavados con la solución de lavado (ml/L): (etanol 500) por 5, 10 y 15 minutos. Posteriormente estos fueron enjuagados rápidamente (3 segundos) con la solución de tiosulfato de sodio (g/L): ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0.2). Después, los geles se lavaron con agua miliQ tres veces y se sumergieron en la solución de nitrato de plata por 20 minutos (g/L): (AgNO_3 2; formaldehído 0.75). Una vez transcurrido este tiempo, estos fueron lavados nuevamente tres veces con agua miliQ, seguido a esto, se sumergieron en la solución de revelado (g/L): (Na_2CO_3 30), (ml/L): (solución tiosulfato 20; formaldehído 0.5) por aproximadamente entre 5 y 10 minutos. Finalmente, los geles se introdujeron por 5 minutos en la solución de fijación y, se almacenaron en la solución de conservación (ml/L): (etanol 250 y glicerol 30). Una vez terminado el proceso de tinción, los geles fueron fotografiados con una cámara digital para posteriormente ser estudiados por programas bioinformáticos.

9.7 Isoelectroenfoque y electroforesis en 2D.

Se seleccionaron muestras de los dos tiempos en donde se presentaron diferencias evidentes en el patrón de proteínas de la levadura, correspondientes a las proteínas extracelulares secretadas a las 48h y proteínas intracelulares provenientes del pellet a las 48h. Las proteínas se separaron de acuerdo con su punto isoeléctrico mediante isoelectroenfoque (IEF), utilizando un equipo Biorad Protean i12. Para ello, se utilizaron tiras de pH 3-10, (rango lineal) de 7 cm, las cuales fueron rehidratadas por 18 horas a 20°C con la muestra (25 μL) y la solución de rehidratación (100 μL) (Bio-Rad Laboratories, 2014). Pasado el tiempo de rehidratación, se ensamblaron las bandejas de enfoque del Biorad Protean i12 y se posicionaron los electrodos dentro de estas, posteriormente los electrodos fueron

humedecidos con agua estéril. Seguidamente, las tiras IPG se introdujeron dentro de las bandejas de enfoque, adicionando 3 ml de aceite mineral, luego, se ejecutó el protocolo de corrido del IEF (7 cm pH3-10 G).

Una vez terminado el corrido IEF las tiras fueron sometidas a un proceso de equilibración, donde fueron sumergidas 10 minutos en 2,5 ml de Buffer I, luego, se removió el Buffer I y se adicionaron 2,5 ml de Buffer II, en el cual se sumergió nuevamente la tira IPG por 10 minutos. Posteriormente, se removió el Buffer II y se introdujo la tira IPG en el buffer de corrido de la electroforesis SDS-PAGE por 3 segundos. La tira IPG se introdujo en el gel de poliacrilamida SDS-PAGE (10 cm x 7,3 cm) y se adicionó agarosa para fijar el montaje. Finalmente, se corrió la segunda dimensión de la misma manera que la electroforesis de proteínas SDS-PAGE explicada en la sección 9.6.

9.8 Determinación de la variabilidad de perfiles proteicos

La determinación de la variabilidad de los perfiles proteicos se realizó mediante programas bioinformáticos. Para ello, se identificaron y calcularon los pesos moleculares de las bandas de cada perfil por medio del programa PhotocaptMW (Vilber Loumat) comparándolas con el patrón de peso molecular Broad Range Protein Molecular Marker (Promega).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

10.1 Cultivo de *C. palmioleophila* en presencia de aceite de palma

Se observó crecimiento de la cepa de *C. palmioleophila* SACL-11 en presencia del aceite de palma como única fuente de carbono; es decir, la levadura asimiló el aceite presente en el medio de cultivo y lo utilizó como fuente de energía para su crecimiento, en concordancia con lo descrito previamente en diferentes estudios (Aqualimpia et al., 2013; Rodríguez-Mateus, Aqualimpia & Zafra 2016). La utilización eficiente del aceite de palma por esta cepa es descrito en estudios previos donde esta levadura presentó el mayor porcentaje de remoción de aceite crudo de palma (Nakase, Takashi; Itoh, Mutsumi; Suzuki, Motofumi; Komagata, Kazuo; Kodama, 1988; Rodríguez-mateus et al., 2016). Sin embargo, es importante resaltar que para lograr una mejor asimilación del aceite de palma por parte de la levadura es necesario reactivar el microorganismo en un medio de cultivo enriquecido con fuentes de carbono y nitrógeno (L. Rincón, 2016).

10.2 Determinación de variabilidad de perfiles proteicos SDS-PAGE

Se analizaron los perfiles proteicos intracelulares y extracelulares en cada uno de los tiempos de cultivo determinados (12, 24 y 48 horas) teniendo como única fuente de carbono y nitrógeno al aceite de palma y al sulfato de amonio respectivamente; para lo cual, se utilizó

el programa PhotoCaptMW, el cual permitió calcular el peso molecular de cada una de las bandas presentes en los perfiles electroforéticos. Además, las variaciones en la expresión de proteínas extracelulares de *Candida palmioleophila* en respuesta a su tiempo de exposición a un ambiente con aceite de palma como única fuente de carbono fue detectado con ayuda de la electroforesis de proteínas SDS-PAGE. Esta técnica no permitió detectar bandas de proteínas extracelulares durante las primeras 24 horas de cultivo (figura 5), lo que sugiere que a pesar de que en estudios previos se demostró que la cepa SACL11 cuenta con un periodo de adaptación corto (6 horas) (Rincón, Agualimpia & Zafra 2018), sus proteínas extracelulares solo logran ser detectadas por la técnica a las 48 horas de exposición al aceite de palma. Este resultado se podría explicar debido a que, aunque la levadura tiene un periodo rápido de adaptación, su mayor porcentaje de degradación del aceite de palma se da a las 48 horas (Rodríguez-Mateus, Agualimpia & Zafra 2016); por lo tanto, una mayor cantidad de enzimas lipolíticas serían secretadas en ese momento.

La figura 5 muestra el perfil electroforético extracelular obtenido a las 48 horas de cultivo de la levadura en un medio con aceite de palma. En ella se aprecian nueve bandas diferentes con un rango de proteínas desde los 18.7 KDa hasta los 216.5 KDa. Teniendo en cuenta que la mayoría de las lipasas del género *Candida* presentan pesos moleculares entre 27 y 60 KDa (González-Bacerio et al., 2010), este resultado sugiere que las bandas con pesos moleculares de 52.9, 49.2 y 45.9 KDa presentes en el perfil electroforético extracelular a la hora 48 podrían estar relacionadas con lipasas y/o esterases involucradas en el proceso de biotransformación del aceite de palma en ácidos grasos y glicerol, que podrían ser fácilmente integrados a la ruta metabólica del microorganismo.

Debido a que hasta el momento no se cuenta con reportes de las lipasas extracelulares secretadas por *Candida palmioleophila*, se relacionaron los pesos moleculares encontrados con los de lipasas de diferentes especies del género *Candida* (tabla 2). La banda de 49.2 KDa presente en la figura 5 tiene un peso molecular similar a las lipasas LIP4 (49.6 KDa) y LIP8 (49.7 KDa) descritas previamente para *Candida albicans* ATCC36082 (Fu et al., 1997; Hube et al., 2000). Además, estudios realizados en 2018 demuestran que la cepa SACL-11 de *Candida palmioleophila* cuenta con el gen de lipasa LIP2 descrito inicialmente para *Candida albicans* (Rodríguez-mateus, Pacheco, & Zafra, 2018), sin embargo, la técnica usada en el presente estudio no permitió detectar la banda de 50.4 KDa correspondiente a esta lipasa. Por otra parte, las otras dos bandas de 52.9 KDa y 45.9KDa no presentan similitud en su peso molecular con ninguna de las lipasas descritas previamente para el género *Candida*.

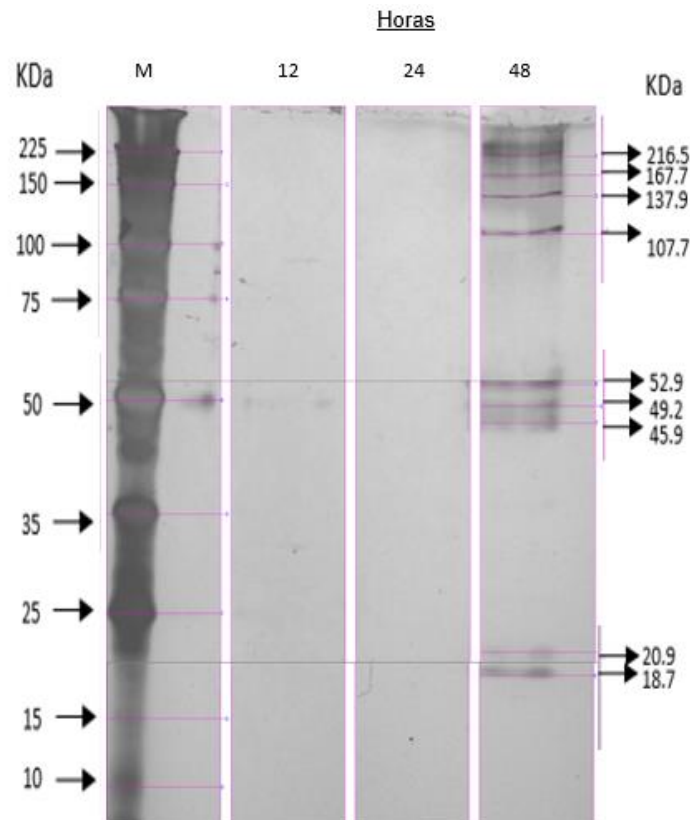


Figura 5. Perfil electroforético de proteínas extracelulares secretadas por cepa SACL11 de *Candida palmioleophila*. Carril 1: marcador de peso molecular, Carril 2: proteínas secretadas a las 48 horas de exposición al aceite de palma.

Tal como se aprecia en la figura 6, los perfiles proteicos intracelulares de *C. palmioleophila* son complejos y cuentan con aproximadamente 14 bandas diferentes, con rangos de pesos moleculares desde los 188.8 KDa hasta 10.9 KDa. Así mismo, se presentaron cambios notorios en los patrones de las bandas, especialmente durante el transcurso de la hora 24 a la 48. Además, los resultados obtenidos muestran una banda de aproximadamente 24KDa que fue detectada durante las tres mediciones (12h, 24h y 48h), presentando mayor intensidad con el paso del tiempo, lo que sugiere que esta banda puede corresponder a proteínas encargadas del transporte de los ácidos grasos dentro de la célula, debido a que su peso molecular es muy pequeño para ser catalogada como una posible lipasa (González-Bacerio et al., 2010).

Ahora bien, al comparar los pesos moleculares de los perfiles proteicos intracelulares con lipasas conocidas del género *Candida sp*, se identificaron similitudes en bandas de *Candida palmioleophila* con lipasas reportadas de 33 KDa de *C. cylindracea* (Rincón, Agualimpia & Zafra 2018) y las lipasas LIP7 (47 KDa) y LIP3 (51 KDa) de *Candida albicans* (Hube et al., 2000). Además, a la hora 48 (figura 6) se observó una banda de aproximadamente 27.6 KDa, la cual tiene un peso molecular similar a la reportada por Rincón y colaboradores en 2018 (28 KDa) como una lipasa involucrada en el proceso de hidrólisis del aceite de palma.

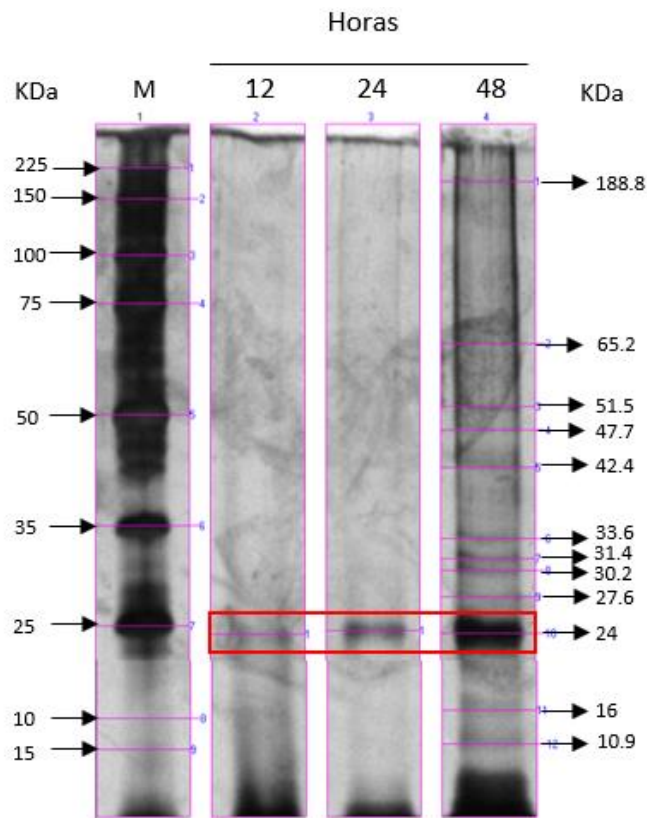


Figura 6. Perfil electroforético de proteínas intracelulares de la cepa SACL11 de *Candida palmioleophila*. Carril 1: marcador de peso molecular. Carril 2: perfil proteico a las 12 horas. Carril 3: perfil proteico a las 24 horas. Carril 4: perfil proteico a las 48 horas.

Así mismo, otros estudios demostraron que bandas de proteínas de 42 KDa solo se logran expresar cuando la levadura se encuentra en ambientes con presencia de aceite de palma (L. Rincón, 2016), lo cual explica la banda de 42.4 KDa detectada a las 48 horas de exposición al aceite. Al comparar los perfiles proteicos de las figuras 5 y 6, la evidencia sugiere que las enzimas secretadas a nivel intracelular difieren de las extracelulares en su peso molecular y en la complejidad del perfil. Así mismo, según los resultados obtenidos, se logró identificar

a dos posibles lipasas de 52.9 KDa y 45.9KDa encargadas del proceso de biotransformación del aceite de palma, las cuales solo son expresadas a nivel extracelular.

10.3 Caracterización de proteínas lipolíticas por 2D-EF

Los perfiles proteicos intracelulares y extracelulares correspondientes al tiempo de mayor expresión proteica (48 horas) fueron analizados por medio de la electroforesis en 2D con el fin de caracterizar las proteínas por su peso molecular y su punto isoeléctrico. Sin embargo, con el fin de verificar la eficiencia de la técnica se realizó un corrido de prueba con una muestra de proteínas estándar de *E. coli* con una concentración de 1,35 mg/ml, tal como se observa en la figura 7.

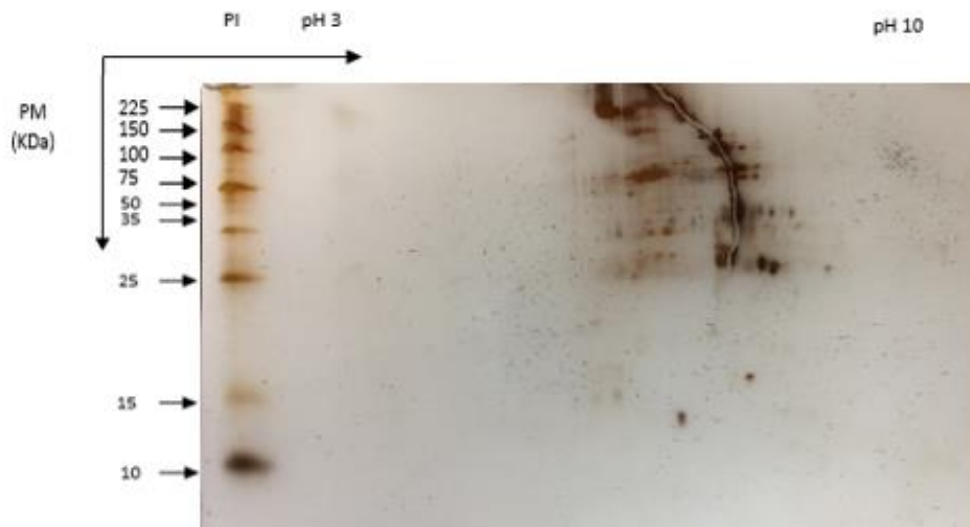


Figura 7. Perfil electroforético bidimensional de proteínas estándar de *E. coli* (1,35 mg/ml).

La figura 8 muestra el perfil electroforético bidimensional para las proteínas extracelulares, donde se observan aproximadamente siete spots, con pesos moleculares desde los 152 KDa a los 11 KDa y un punto isoeléctrico entre 4.0 y 5.5. Este resultado muestra que los spots de 14, 13 y 12 y 11 KDa tienen un peso molecular y un punto isoeléctrico similar a peroxisomas involucrados en el proceso de la β -oxidación de los ácidos grasos (Fiorini et al., 2016; Sibirny, 2016). Además, el spot con peso molecular de 20 KDa se logró observar en los perfiles extracelulares de la electroforesis SDS-PAGE y la electroforesis 2D a las 48 horas del experimento. Por otra parte, diferentes estudios describen que las proteínas correspondientes a lipasas tienen un peso molecular entre los 27 y 60 KDa y un punto isoeléctrico entre 4,8 y 5,08 (González-Bacerio et al., 2010); sin embargo, esta técnica no permitió (figura 8) observar spots con un peso molecular similar al de las lipasas, a pesar de que en el perfil electroforético extracelular SDS-PAGE si se evidenciaron bandas con pesos moleculares que correspondían a lipasas descritas previamente para diferentes especies del género *Candida spp.* Este resultado pudo ser ocasionado debido a que las proteínas fueron almacenadas durante largos periodos de tiempo, lo cual pudo llevar a cambios en su estructura molecular y por ende su degradación.

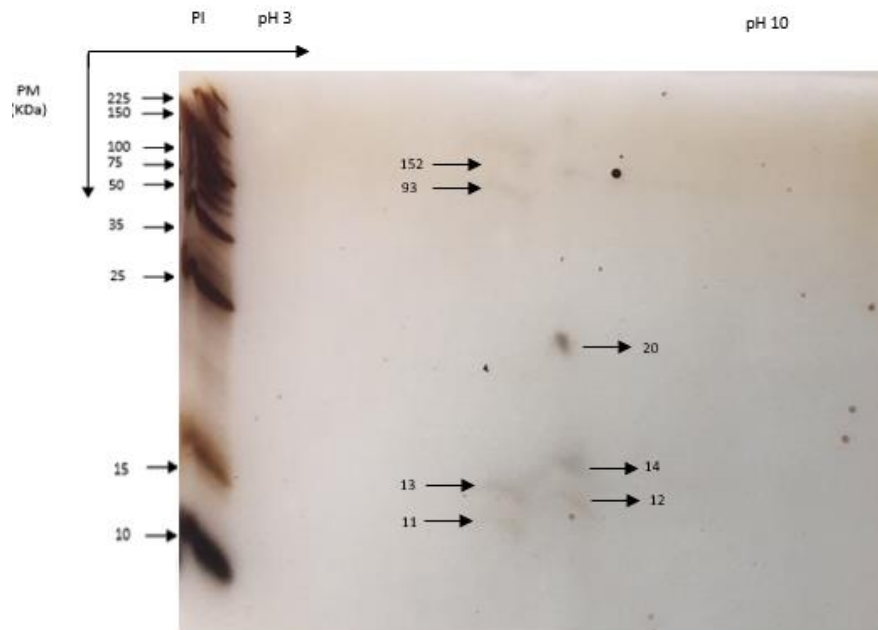


Figura 8. Perfil electroforético bidimensional de las proteínas extracelulares de *Candida palmioleophila* SACL-11 a las 48 horas de exposición al aceite de palma.

Por el contrario, el perfil bidimensional para las proteínas intracelulares de *Candida palmioleophila* se observa en la figura 9, donde se presentaron dos spots, con un peso molecular de aproximadamente 24 KDa y 18 KDa, el ultimo con un punto isoeléctrico de 5.0; sin embargo, el spot de 24 KDa cuenta con diferentes puntos isoeléctricos debido a su forma alargada, es decir que puede corresponder a varias proteínas con un mismo peso molecular, pero con un punto isoeléctrico en un rango entre 5.0 y 6.0. Así mismo, esta banda de 24 KDa también fue detectada por medio de la técnica de electroforesis SDS-PAGE en el perfil intracelular, expresándose durante los tres periodos de tiempo analizados, aumentando su intensidad, es decir, la evidencia sugiere que esta proteína es expresada a nivel intracelular durante el proceso de degradación biológica del aceite de palma, teniendo una mayor expresión a las 48 horas de exposición. Este resultado podría indicar la presencia de

peroxisomas implicados en el proceso de biodegradación del aceite. En las levaduras, los peroxisomas se encuentran involucrados en numerosas reacciones metabólicas, entre las que destaca la vía de la β -oxidación de los ácidos grasos, donde los peroxisomas contiene cuatro enzimas principales para su desarrollo, así como algunas enzimas auxiliares involucradas en el proceso (Sibirny, 2016). Algunos estudios proteómicos realizados indican que los peroxisomas pertenecientes al género *Candida* tienen puntos isoelectricos entre 5.0 y 7.0 y pesos moleculares entre 15 KDa a 27 KDa (Fiorini et al., 2016), lo cual es similar a los resultados obtenidos en la figura 9. Por otra parte, los resultados obtenidos muestran un perfil bidimensional intracelular sencillo, en comparación que el obtenido en la electroforesis SDS-PAGE donde se evidenció un mayor número de bandas.

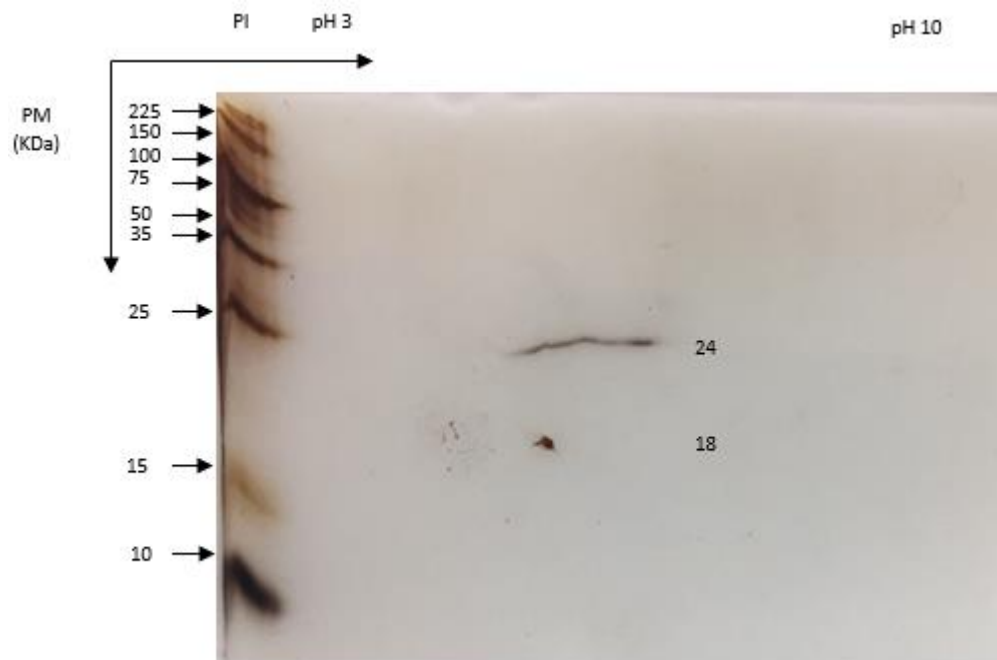


Figura 9. Perfil electroforético bidimensional de las proteínas intracelulares de *Candida palmioleophila* SACL-11 a las 48 horas de exposición al aceite de palma.

Al comparar los perfiles bidimensionales de las proteínas intracelulares con las extracelulares es posible evidenciar que ninguna de las bandas encontradas es similar, al igual que en los perfiles de la electroforesis SDS-PAGE. Además, se observó que en todos los perfiles, la mayor expresión de proteínas tanto a nivel intra como de extracelular se presentó a las 48 horas, lo cual podría deberse a que el microorganismo logra uno de sus puntos máximos de remoción del aceite de palma en este momento (Agualimpia et al., 2013).

CONCLUSIONES

Se encontró que la mayor expresión de proteínas tanto intracelulares como extracelulares de la cepa SACL-11 de *Candida palmioleophila* se presentó a las 48 horas de exposición al aceite de palma.

Los resultados sugieren que las bandas de proteínas extracelulares con pesos moleculares de 52.9 KDa y 45.9 KDa encontradas por medio de la electroforesis de proteínas SDS-PAGE podrían corresponder a lipasas y/o estererasas encargadas del proceso de biotransformación del aceite de palma. Además, la banda de 49.2 KDa es similar a las lipasas LIP4 y LIP8 descritas previamente para *Candida albicans*.

A pesar de que la cepa SACL-11 de *C. palmioleophila* posee el gen de lipasa LIP2 descrito previamente para *C. albicans*, la técnica utilizada en este estudio no logró detectar la proteína correspondiente a esta lipasa.

Se identificaron por primera vez los perfiles electroforéticos bidimensionales de *C. palmioleophila*; sin embargo, la técnica no permitió observar spots con un peso molecular de similar al de las lipasas.

Se corroboró que la cepa SACL-11 de *Candida palmioleophila* tiene la capacidad de utilizar de manera eficiente al aceite de palma como única fuente de carbono para su crecimiento, lo cual convierte a levadura en un microorganismo promisorio, con un alto potencial para la

producción de enzimas lipolíticas con aplicabilidad en procesos industriales y de biorremediación.

Finalmente, se acepta la hipótesis planteada, debido a que el estudio demuestra que en efecto existen diferencias entre los perfiles proteicos de las enzimas extracelulares secretadas por *Candida palmioleophila* *SACL-11* a través del tiempo especialmente en la cantidad de bandas/spots expresados, en su peso molecular, y punto isoelectrico durante la degradación del aceite de palma.

RECOMENDACIONES

Se recomienda mejorar la técnica de concentración de proteínas extracelulares con el fin de facilitar su observación en los perfiles electroforéticos.

Se sugiere no almacenar las proteínas durante largos periodos de tiempo debido a que esto podría causar cambios en su estructura, llevando a su degradación.

BIBLIOGRAFÍA

- Agualimpia, B., Otero, J. V., & Zafra, G. (2013). Evaluation of Native Microorganisms with Potential for the Degradation of Oil and Grease in Palm Oil Refinery Effluents. *Bioteconología Aplicada*, 33(1), 1–12. Retrieved from <http://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumenI.cgi?IDARTICULO=68552>
- Benjamin, S., & Pandey, A. (1998, December 18). Candida rugosa lipases: Molecular biology and versatility in biotechnology. *Yeast*. Wiley-Blackwell. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(19980915\)14:12<1069::AID-YEA303>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(19980915)14:12<1069::AID-YEA303>3.0.CO;2-K)
- Benjamin, S., & Pandey, A. (2001). Isolation and characterization of three distinct forms of lipases from candida rugosa produced in solid state fermentation. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 44(2), 213–221. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132001000200016>
- Bio-Rad Laboratories. PROTEAN i12 IEF System Manual (2014).
- Brandt, M. E., & Lockhart, S. R. (2012). Recent taxonomic developments with candida and other opportunistic yeasts. *Current Fungal Infection Reports*, 6(3), 170–177. <https://doi.org/10.1007/s12281-012-0094-x>
- Cárdenas, A. G. (2016). Oil Palm Agro-industry in America. *Revista Palmas*, 37, 215–228. Retrieved from http://web.fedepalma.org/sites/default/files/files/Fedepalma/Memorias de la XVIII Conferencia Internacional sobre Palma de aceite/M_3_3_ La agroindustria en America.pdf
- Congreso de Colombia, E. (1996). Ley 253 de 1996, (enero 9), 1–54. Retrieved from http://ambientebogota.gov.co/documents/24732/3901795/Ley_253.pdf

- De León, U., & Bejega García, V. (2015). *Aplicación de lipasas microbianas para la producción de biocombustibles similares al biodiésel que integran la glicerina en forma de monoglicérido*. Universidad de Córdoba.
- Diez, A. E. A., & Sandoval, L. M. C. (2012). Producción biotecnológica de lipasas microbianas, una alternativa sostenible para la utilización de residuos agroindustriales. *Vitae*, 19(3), 244–247. Retrieved from <http://www.redalyc.org/html/1698/169825291001/>
- Facio, M. L., Madalena, L., Fraind, S., Alejandre, M., Bresciani, P., & Pizzolato, M. (2013). Electroforesis bidimensional en orina : una alternativa para el laboratorio clínico *. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 47(1), 37–46. Retrieved from http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-29572013000100006
- Fernando de la Cuesta Marina. (2010). *Estudio del perfil proteico de tejido y secretoma de la arteria coronaria humana en la enfermedad aterosclerótica*. Universidad Complutense de Madrid. Retrieved from <https://core.ac.uk/download/pdf/19714986.pdf>
- Fiorini, A., Rosado, F. R., Bettega, E. M. da S., Melo, K. C. S., Kukolj, C., Bonfim-Mendonça, P. de S., ... Svidzinski, T. I. E. (2016). Candida Albicans protein profile changes in response to the butanolic extract of Sapindus Saponaria L. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 58(0). <https://doi.org/10.1590/S1678-9946201658025>
- Fu, Y., Ibrahim, A. S., Fonzi, W., Zhou, X., Ramos, C. F., & Ghannoum, M. A. (1997). Cloning and characterization of a gene (LIP1) which encodes a lipase from the pathogenic yeast Candida albicans. *Microbiology*, 143(2), 331–340. <https://doi.org/10.1099/00221287-143-2-331>

- González-Bacerio, J., Rodríguez Hernández, J., & del Monte Martínez, A. (2010). Lipases: enzymes with potential for the development of immobilized biocatalysts by interfacial adsorption. *Revista Colombiana de Biotecnología*, *12*(1), 113–140. Retrieved from <http://www.redalyc.org/html/776/77617786013/>
- Høegh, I., Patkar, S., Halkier, T., & Hansen, M. T. (1995). Two lipases from *Candida antarctica* : cloning and expression in *Aspergillus oryzae*. *Canadian Journal of Botany*, *73*(S1), 869–875. <https://doi.org/10.1139/b95-333>
- Hube, B., Stehr, F., Bossenz, M., Mazur, A., Kretschmar, M., & Schäfer, W. (2000). Secreted lipases of *Candida albicans*: Cloning, characterisation and expression analysis of a new gene family with at least ten members. *Archives of Microbiology*, *174*(5), 362–374. <https://doi.org/10.1007/s002030000218>
- Jafari, N., Kasra-Kermanshahi, R., & Reaz Soudi, M. (2013). Screening, identification and optimization of a yeast strain, *Candida palmioleophila* JKS4, capable of azo dye decolorization. *Iranian Journal of Microbiology*, *5*(4), 434–440. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25848518>
- Jensen, R. H., & Arendrup, M. C. (2011). *Candida palmioleophila*: Characterization of a previously overlooked pathogen and its unique susceptibility profile in comparison with five related species. *Journal of Clinical Microbiology*, *49*(2), 549–556. <https://doi.org/10.1128/JCM.02071-10>
- Lee, G. C., Tang, S. J., Sun, K. H., & Shaw, J. F. (1999). Analysis of the gene family encoding lipases in *Candida rugosa* by competitive reverse transcription-PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, *65*(9), 3888–3895. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10473391>
- Li, Z., Wrenn, B. A., & Venosa, A. D. (2005). Anaerobic biodegradation of vegetable oil and

- its metabolic intermediates in oil-enriched freshwater sediments. *Biodegradation*, 16(4), 341–352. <https://doi.org/10.1007/s10532-004-2057-6>
- M., S. M. R., & C., D. M. M. (2009). Análisis de las propiedades del aceite de palma en el desarrollo de su industria. *Revista Palmas*, 30(2), 11–24. Retrieved from <http://publicaciones.fedepalma.org/index.php/palmas/article/view/1432>
- Maddelainne, H. S. (2014). Lípidos: Características Principales Y Su Metabolismo. *Revista de Actualización Clínica* 2014, 41, 2142–2145. Retrieved from http://www.revistasbolivianas.org.bo/pdf/raci/v41/v41_a04.pdf
- Mujica, C. (2010). *EVOLUCIÓN DEL SECTOR PALMICULTOR*. Retrieved from <http://www.udi.edu.co/images/investigaciones/publicaciones/libros/porter/08/Libro-EvoluciondelSectorPalmicultor.pdf>
- Nakase, Takashi; Itoh, Mutsumi; Suzuki, Motofumi; Komagata, Kazuo; Kodama, T. (1988). *Candida palmioleophila* sp. nov., a yeast capable of assimilating crude palm oil, formerly identified as *Torulopsis candida*. *Journal of General Applied Microbiology*, 498(6), 493–497. <https://doi.org/10.2323/jgam.34.493>
- Okino-Delgado, C. H., Do Prado, D. Z., Facanali, R., Marques, M. M. O., Nascimento, A. S., Fernandes, C. J. da C., ... Fleuri, L. F. (2017). Bioremediation of cooking oil waste using lipases from wastes. *PLoS ONE*, 12(10), e0186246. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186246>
- Panreac Química S.A. (2014). *Aceites y grasas*. Reverté. Retrieved from [https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=xFjGDCmLuKQC&oi=fnd&pg=PA3&dq=definición+de+grasas+y+aceites&ots=HzGKqM0RS1&sig=9vHgSTpVDsMusJWvAjyhFB_6fdA#v=onepage&q=definición de grasas y aceites&f=false](https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=xFjGDCmLuKQC&oi=fnd&pg=PA3&dq=definición+de+grasas+y+aceites&ots=HzGKqM0RS1&sig=9vHgSTpVDsMusJWvAjyhFB_6fdA#v=onepage&q=definición+de+grasas+y+aceites&f=false)
- Parés I. Farrás, R. (1997). *Bioquímica de los microorganismos*. Reverté. Retrieved from

https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=eHK7eHXBRk4C&oi=fnd&pg=PR5&q=ciclo+de+krebs+bioquimica&ots=e2IbU47qHC&sig=2xvg40VMXXrQ1cU7KfGTbyzU_I#v=onepage&q=ciclo de krebs bioquimica&f=false

Park, M., Do, E., & Jung, W. H. (2013, June). Lipolytic enzymes involved in the virulence of human pathogenic fungi. *Mycobiology*. Korean Society of Mycology. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2013.41.2.67>

Rincón, L. (2016). *ANÁLISIS DIFERENCIAL DE PERFILES PROTEICOS DE Candida palmioloephila CON ACTIVIDAD DEGRADADORA DE GRASAS Y ACEITES BAJO DIFERENTES CONDICIONES DE CRECIMIENTO*. Universidad de Santander.

Rincón, L. J., Agualimpia, B., & Zafra, G. (2018). Differential protein profiles of the lipolytic yeast *Candida palmioloephila* under different growth conditions. *CHEMICAL ENGINEERING TRANSACTIONS*, 64. <https://doi.org/10.3303/CET1864058>

Rodríguez-mateus, Z., Agualimpia, B., & Zafra, G. (2016). Isolation and Molecular Characterization of Microorganisms with Potential for the Degradation of Oil and Grease from Palm Oil Refinery Wastes. *CHEMICAL ENGINEERING TRANSACTIONS*, 49, 517–522. <https://doi.org/10.3303/CET1649087>

Rodríguez-mateus, Z., Pacheco, K. V., & Zafra, G. (2018). Molecular detection and characterization of novel lipase genes of the lipolytic yeast *Candida palmioloephila*. *CHEMICAL ENGINEERING TRANSACTIONS*, 64. <https://doi.org/10.3303/CET1864059>

Rotticci-Mulder, J. C., Gustavsson, M., Holmquist, M., Hult, K., & Martinelle, M. (2001). Expression in *Pichia pastoris* of *Candida antarctica* lipase B and lipase B fused to a cellulose-binding domain. *Protein Expression and Purification*, 21(3), 386–392. <https://doi.org/10.1006/pep.2000.1387>

- Ruiz Aguilar, G., Fernández Sánchez, J. M., & Rodríguez Vázquez, R. (2001). Residuos peligrosos : grave riesgo ambiental. *Avance y Perspectiva*, 20, 151–158. Retrieved from <http://www.ingenieroambiental.com/4014/grave.pdf>
- Sharma, S., & Kanwar, S. S. (2014). Organic solvent tolerant lipases and applications. *The Scientific World Journal*. Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2014/625258>
- Sibirny, A. A. (2016, June 1). Yeast peroxisomes: Structure, functions and biotechnological opportunities. (J. Nielsen, Ed.), *FEMS Yeast Research*. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fow038>
- Soleimaninanadegani, M., & Manshad, S. (2014). Enhancement of Biodegradation of Palm Oil Mill Effluents by Local Isolated Microorganisms. *International Scholarly Research Notices*, 2014, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2014/727049>
- Vakhlu, J., & Kour, A. (2006, January 15). Yeast lipases: Enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. *Electronic Journal of Biotechnology*. <https://doi.org/10.2225/vol9-issue1-fulltext-9>
- Wang, J., Mahmood, Q., Qiu, J. P., Li, Y. S., Chang, Y. S., Chi, L. N., & Li, X. D. (2015). Zero discharge performance of an industrial pilot-scale plant treating palm oil mill effluent. *BioMed Research International*, 2015, 617861. <https://doi.org/10.1155/2015/617861>
- Zhang, T., Lei, J., Yang, H., Xu, K., Wang, R., & Zhang, Z. (2011). An improved method for whole protein extraction from yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 28(11), 795–798. <https://doi.org/10.1002/yea.1905>