



26
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

ESTABLECIMIENTO DE LAS BASES
METODOLOGICAS PARA LA CLONACION DEL GEN
QUE CODIFICA PARA LA LIPASA DE
Penicillium candidum.

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICA EN ALIMENTOS

P R E S E N T A

BEATRIZ RUIZ VILLAFAN



MEXICO, D. F.

1995

FALLA DE ORIGEN

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado

Presidente **Dra. Amanda Galvez Mariscal.**
Vocal **Dr. Sergio Sánchez Esquivel.**
Secretario **Dr. Jesús Fernando Montiel Aguirre.**
1er. suplente **Dra. Amelia Ma. Guadalupe Farrés González Saravia.**
2do. suplente **Dr. José Guillermo de Jesús Aguilar Osorio.**

Este trabajo fue desarrollado en el Laboratorio de Microbiología Industrial, del Departamento de Biotecnología, del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, bajo la dirección del Dr. Sergio Sánchez Esquivel.



Sustentante

Beatriz Ruiz Villafán



Asesor

Dr. Sergio Sánchez Esquivel

INDICE

	página
I. INTRODUCCION	1
II. GENERALIDADES SOBRE LAS LIPASAS	3
III. ANTECEDENTES	11
IV. OBJETIVOS	20
V. MATERIALES Y METODOS	21
VI. RESULTADOS	45
VII. CONCLUSIONES	64
VIII. APENDICE	66
IX. BIBLIOGRAFIA	70

I. INTRODUCCION:

El uso de la biotecnología en la manufactura de alimentos y bebidas ha sido practicada durante más de 8000 años siendo los mejores ejemplos, la producción de vinagre, bebidas alcohólicas, la masa de panificación y los quesos. Los procesos biotecnológicos son usados actualmente para producir otros productos fermentados, aditivos alimentarios, así como coadyuvantes de diversos procesos (33). Un hecho importante es el impacto que la biología moderna ha tenido en la biotecnología. Los avances recientes en biología molecular, la ciencia de fermentaciones, los sistemas de cultivo de tejidos y la bioingeniería ofrecen un gran potencial para su aplicación en diferentes áreas de la producción y procesamiento de alimentos (21, 33).

La ingeniería genética ha revolucionado el estudio de los organismos eucarióticos y ha proporcionado una fuente de proteínas en cantidades que hasta ahora se consideraba casi imposible de obtener. Las aplicaciones de la ingeniería genética se encuentran dentro de dos categorías principales: 1) la modificación de la estructura y/o la amplificación de un producto biológico como las enzimas, por clonación de los genes relevantes para ello, 2) alteración de los organismos seleccionados para mejorar la utilidad en un ambiente determinado. La producción microbiana de tales enzimas lograda por la transferencia de genes a bacterias puede proporcionar fuentes estables de material de pureza y actividad constante, así también los costos de producción pueden ser reducidos mediante el uso de genes clonados (21, 26, 60).

De la amplia variedad de enzimas, las lipasas han recibido una creciente atención en los últimos años, ya que además de ser usadas en la maduración de quesos y como agentes activos de detergentes, se ha

encontrado que son capaces de catalizar una amplia variedad de reacciones de importancia potencial para diversas aplicaciones industriales como son la síntesis de péptidos, producción de biosurfactantes, transesterificación y la resolución de mezclas racémicas (18, 40, 44).

Se han clonado genes de lipasa de diversos orígenes tanto microbianas, como humanas y animales (30). La clonación de los genes de lipasa se ha hecho con diversos fines, por ejemplo para usarla como modelo de estudio de fenómenos regulatorios como sucede en *Streptomyces* (43); para realizar estudios estructura-función como en *Geotrichum candidum*, que sirvió para la elucidación del mecanismo de acción de las lipasas (49,50); para la sobreproducción la cual en algunos casos es necesaria para hacer estudios bioquímicos como en el caso de *Rhizopus delemar* (25), etc. En el presente caso se desea clonar el gen de la lipasa de *Penicillium candidum* para producir la enzima en mayores cantidades, para posteriormente hacer estudios sobre su función y regulación.

II. GENERALIDADES SOBRE LAS LIPASAS:

Aunque las lipasas han sido usadas industrialmente durante décadas (en el desarrollo de sabores y aromas en alimentos), el rango de aplicaciones y el volumen de producción de lipasas ha estado limitado. Del mismo modo, la importancia económica de las lipasas ha sido muy restringida, cuando se compara con la de las principales enzimas industriales como las proteasas y carbohidrasas. En 1985 se estimó que de las enzimas producidas industrialmente un 80% o más fue de hidrolasas, de las cuales el 60% eran proteasas, 30% carbohidrasas, 3% lipasas y 7% de otras enzimas especializadas. Sin embargo, con el advenimiento de los estudios sobre los sistemas no acuosos, el interés sobre las lipasas se ha incrementado debido a sus usos de importancia potencial en la industria en estos sistemas (32, 21, 24).

2.1 DEFINICION Y CARACTERISTICAS:

Las lipasas se definen como glicerol éster hidrolasas (EC 3.1.1.3.) que hidrolizan tri, di y monoacilgliceroles, que están presentes en la interfase agua-aceite. Los sustratos insolubles en agua son un prerrequisito para las lipasas, si la hidrólisis es el objetivo de la reacción (32,40). La anterior definición excluye las enzimas que actúan en ésteres solubles en agua (esterasas) o aquellas que hidrolizan preferentemente otros lípidos (acilhidrolasas).

La mayoría de las lipasas que se conocen son glicoproteínas con pesos moleculares que varían entre 20 a 60 KDa (24,30), contienen de un 2 a un 15% de carbohidratos de los cuales el principal es la manosa; se cree que este enlace glicosídico facilita el paso de la enzima a través de la pared celular microbiana hacia el medio de cultivo (18). Las lipasas son inhibidas

frecuentemente por agentes surfactantes como el Tween y las sales biliares, además algunas son sensibles a la presencia de cationes divalentes como el calcio, que aumenta la termoestabilidad de la lipasa de *Pseudomonas*(30).

Un amplio número de laboratorios han trabajado en la cristalización de lipasas bacterianas para determinar la estructura tridimensional de las mismas. En la actualidad se han elucidado cinco estructuras de lipasas microbianas por rayos-X, cuatro de ellas son de origen fungal (de *Rhizomucor miehei* (14), *Geotrichum candidum* (51), *Candida rugosa* y *Fusarium solani*); así como una bacteriana -de *Pseudomonas glumae* (24, 30)-.

Las estructuras de lipasas obtenidas por rayos-X revelan una estructura α/β con un centro β -hoja plegada que contiene los residuos catalíticos, aunque varían las uniones entre los elementos estructurales conservados. Este patrón α/β se ha reconocido como un patrón de doblez general para las diferentes hidrolasas como la acetilcolinesterasa, la carboxipeptidasa serínica, etc. (14, 30).

El centro catalítico de las lipasas contiene una tríada catalítica parecida al de las proteasas serínicas que consiste en residuos de Ser-His-Asp, donde el residuo del sitio activo se localiza en un motivo β - ϵ Ser- α , en el cual la serina nucleofílica adopta una estructura secundaria que parece ser común a todas las lipasas y esterases dependientes de Ser (24, 30, 51).

Una característica inusual e interesante de la estructura de las lipasas, es que su sitio activo está completamente inmerso en una estructura parecida a una "tapa" compuesta de una o dos α -hélices. Esto apoya la hipótesis de que las triacilglicerol lipasas adquieren un cambio conformacional en respuesta a la adsorción en la superficie agua-aceite

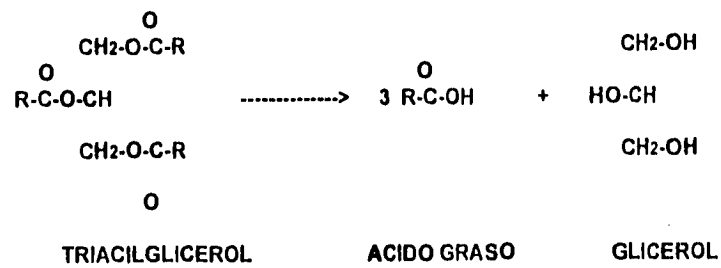
(activación interfacial). La cubierta se mueve permitiendo que el sitio activo se vuelva accesible al sustrato. Otro resultado de este cambio conformacional es un considerable aumento en la superficie hidrofóbica de la enzima la cual está implicada en el reconocimiento superficie-lípido (24, 30).

2.2 REACCIONES QUE CATALIZA:

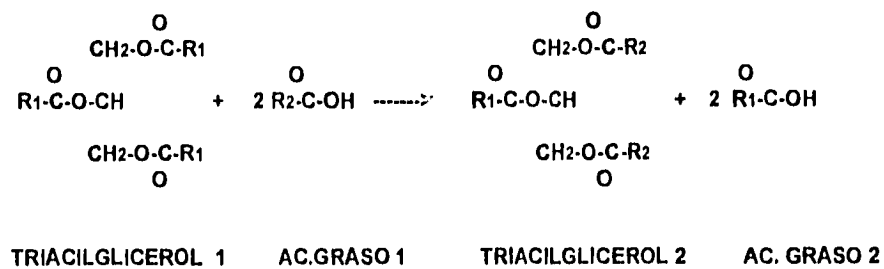
Las lipasas catalizan diversos tipos de reacciones, la más utilizada es la reacción de hidrólisis, esta reacción implica la ruptura del enlace éster de los triacil gliceroles y cuyo producto final depende de la especificidad de la lipasa que se esté usando (32, 44). Así las lipasas no específicas causan la completa hidrólisis de los triacilglicéridos a ácidos grasos libres y glicerol. El segundo grupo de lipasas, basado en la especificidad de la hidrólisis, es el de posición 1,3 que preferencialmente resulta en ácidos grasos libres, di y mono acilgliceroles, sin embargo, una prolongada incubación con estas enzimas genera también glicerol y ácidos grasos libres (44, 53).

Además de las reacciones de hidrólisis, las lipasas pueden catalizar reacciones de interesterificación y síntesis. La interesterificación es un proceso que permite la sustitución de alguno de los componentes de un triacilglicerol de manera específica modificando las propiedades físicas del mismo. Las reacciones de síntesis o de hidrólisis reversa que catalizan las lipasas son útiles en la formación de ésteres a partir de diversos alcoholes y ácidos grasos (alcoholisis y acidólisis respectivamente), sin embargo, este tipo de reacciones tiene como factor limitante la adecuada eliminación del agua del medio de reacción (4, 5, 16, 63), algunas de estas reacciones se esquematizan en la fig 1.

a) HIDROLISIS:



b) INTERESTERIFICACION:



c) SINTESIS:

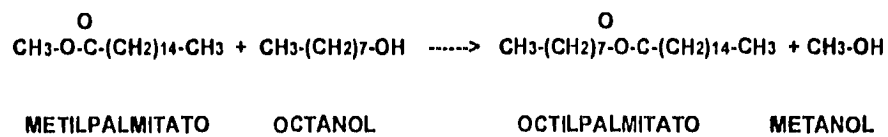


Figura 1. Reacciones que catalizan las lipasas.

2.3 FUENTES DE LIPASA:

Las lipasas son producidas por plantas, animales y microorganismos. El germen de trigo contiene lipasas y un amplio rango de microorganismos (incluyendo levaduras y bacterias) son fuentes de esta enzima (ver tabla 1). También hay lipasas animales como las esterasas pregástricas, lipasas linguales y lipasas pancreáticas (32). Las lipasas de plantas no tienen aplicaciones comerciales en la producción de ingredientes modificados, pero las lipasas microbianas y animales han sido usadas con éxito en la producción de nuevos ingredientes.

2.4 USOS DE LAS LIPASAS:

Tradicionalmente las lipasas se han aplicado en alimentos para el desarrollo de sabores y aromas, como sucede en el caso del proceso de maduración de queso tipo italiano, como el Provolone, Parmesano, Mozzarella, etc.; así como en la producción de lipolizados para la elaboración de saborizantes (1, 17). Otra de las aplicaciones que han tenido gran interés es su uso en formulaciones de detergentes, actualmente existen al menos seis productos que contienen lipasa para ser usados como aditivos de detergentes de uso casero (30). La interesterificación ha encontrado una limitada aplicación a escala comercial. El ejemplo más conocido es el de la transformación de un triacilglicerol de bajo costo como el aceite de palma, en triglicéridos de mayor valor agregado como la mantequilla de cacao, que se usa en formulaciones de alimentos y cosméticos (5, 63, 40). Otro tipo de triglicéridos llamados estructurados, pueden ser un producto potencial de la reacción de interesterificación, ya que se pueden formar triglicéridos que tengan las características nutricionales necesarias para pacientes con problemas de absorción y de hidrólisis de lípidos (5).

TABLA 1. Microorganismos productores de lipasas.

BACTERIAS	HONGOS	LEVADURAS
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Candida cylindracea</i>
<i>Achromobacter lipolyticum</i>	<i>Aspergillus lipolyticum</i>	<i>Candida parailipolytica</i>
<i>Alicalligenes faecalis</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Pichia</i> sp.
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Sporobolomyces</i> sp.
<i>Bacillus mycoides</i>	<i>Geotrichum candidum</i>	<i>Torulopsis</i> sp.
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Humicola lanuginosa</i>	<i>Trichosporon</i> sp.
<i>Corynebacterium acnes</i>	<i>Mucor javanicus</i>	
<i>Chromobacterium viscosum</i>	<i>Mucor lipolyticus</i>	
<i>Leptospira pomona</i>	<i>Mucor miehei</i>	
<i>Mycobacterium freudenreichi</i>	<i>Penicillium candidum</i>	
<i>Mycobacterium lipolyticus</i>	<i>Penicillium cycloplum</i>	
<i>Mycobacterium nacreaceus</i>	<i>Penicillium roqueforti</i>	
<i>Mycobacterium phlei</i>	<i>Rhizopus arrhizus</i>	
<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	<i>Rhizopus delemar</i>	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Rhizopus japonicus</i>	
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Sclerotinia laxa</i>	
<i>Pseudomonas fragi</i>		
<i>Pseudomonas gladioli</i>		
<i>Serratia</i> sp.		
<i>Staphylococcus aureus</i>		

Tabla tomada de (18).

Las reacciones de síntesis abarcan varios aspectos dentro de las aplicaciones industriales. La principal aplicación de este tipo de reacciones se encuentra en la producción de compuestos ópticamente activos (53). Por ejemplo, las lipasas se utilizan en la resolución de mezclas racémicas por hidrólisis asimétrica de los ésteres correspondientes. De este modo, esta reacción se ha utilizado en la producción de insecticidas, en la síntesis de varias drogas quirales como los β -bloqueadores adrenérgicos (5, 18, 54), además en la producción de saborizantes como el acetato de geranilo, o en la síntesis de diversos péptidos (41). Esto es importante debido a que muchos de estos compuestos son usados con propósitos médicos o alimenticios de seres humanos. En la tabla 2 se presentan algunas patentes sobre usos de las lipasas.

TABLA 2. USOS DE LAS LIPASAS REPORTADOS EN PATENTES.
* Clarificación de lodos. Alemania, 1981. (58)
* Sustitución de grasa de cacao. Japón, 1981. (23)
* Remoción de manchas textiles. Alemania, 1983. (42)
* Limpieza de lentes de contacto. Australia, 1983. (3)
* Elaboración de saborizante sabor a queso y potenciador de sabor a partir de suero de leche. E.U.A., 1985. (12)
* Eliminación de caspa y comezón en tónico para el cabello. Japón, 1984. (62)
* Eliminación de manchas de grasa (detergente). Japón, 1983. (24)
* Desengrasado y deodorizado de productos a base de proteína de pescado. URSS, 1984. (46)
* Preparación de arroz sin previo lavado. Japón, 1985. (29)
* Tratamiento de desórdenes intestinales. Rumania, 1985. (8)
* Limpieza de instrumental médico previa esterilización. U.R.S.S., 1985. (39)
* Crema limpiadora para el cutis. E.U.A., 1985. (9)
* Manufactura de saborizante con sabor a tabaco a partir de hojas de tabaco de mala calidad. Japón, 1986. (48)

III. ANTECEDENTES:

Las enzimas lipolíticas que fueron introducidas inicialmente en el mercado eran lipasas pregástricas de ternera o de carnero. El sabor generado por las mismas es el característico de los quesos tipo italiano, debido a la producción de ácidos grasos de cadena corta tales como el butírico, cáprico, caprílico y caproico (32). Sin embargo la producción de enzimas a partir de animales presenta con frecuencia problemas de disponibilidad y manejo, además de que se requiere de importantes extensiones de terreno y mano de obra para su producción. En este sentido, la utilización de microorganismos como fuente de enzimas, ofrece muchos atractivos, toda vez que su cultivo puede llevarse a cabo en espacios reducidos y en condiciones controladas, además de ser susceptibles de manipulación genética y ambiental.

Penicillium candidum es un hongo deuteromiceto que produce un solo tipo de lipasa de peso molecular de 64 KDa, esta enzima presenta una mayor afinidad por los triglicéridos compuestos por ácidos grasos de cadena larga como el oleico (15). La lipasa de *P.candidum* genera un lipolizado con mejores características organolépticas que las proporcionadas por enzimas provenientes de otros microorganismos. Lo anterior fue demostrado experimentalmente mediante un análisis sensorial, utilizando una prueba de rango de preferencia sobre un lipolizado de crema. Además se observó que de 15 cepas probadas, *P.candidum* presentó una alta actividad lipolítica así como una actividad proteolítica relativamente baja (tabla 3). Esta baja actividad de proteasas tiene ventajas en cuanto que se evita la hidrólisis de la lipasa, mejorándose el rendimiento de la misma (57).

Sin embargo, a pesar de las ventajas que presenta *P.candidum*, se debe señalar que, comparando el rendimiento de la actividad lipolítica de

TABLA 3. Actividad lipolítica y proteolítica de hongos.

MICROORGANISMO	ACTIVIDAD LIPOLITICA (UL/ml)	ACTIVIDAD PROTEOLITICA (UI/ml)
<i>Aspergillus niger</i>	2.8	5.5
<i>Geotrichum candidum</i> (1)	1.4	0.0
<i>Geotrichum candidum</i> (2)	1.1	16.0
<i>Mucor miehei</i>	25.1	16.6
<i>Penicillium camemberti</i>	24.6	13.2
<i>Penicillium candidum</i>	36.6	12.6
<i>Penicillium chrysogenum</i> UAM 12842	7.4	48.0
<i>Penicillium chrysogenum</i> NRRL 1851	14.0	27.5
<i>Penicillium caseicola</i>	14.0	12.7
<i>Penicillium glaucum</i>	8.1	5.5
<i>Penicillium roqueforti</i> Milano CNRZ 883	5.1	6.6
<i>Penicillium roqueforti</i>	8.0	35.9
<i>Penicillium roqueforti</i> Milano	1.7	32.0
<i>Rhizopus arrhizus</i>	0.6	2.8
<i>Rhizopus delomar</i> CDBB H313	1.7	4.4

UL/ml: micromoles de ácido butírico liberados en un minuto de reacción por mililitro de extracto enzimático.

UI/ml: miligramos de tirosina liberada en un minuto de reacción por mililitro de extracto enzimático.

Fuente: (57).

este hongo con el de las marcas comerciales, el de la lipasa de *P.candidum* es muy bajo, por lo que se considera que debe incrementarse un mínimo de 7 veces su actividad lipolítica para poder competir con las enzimas comerciales. Así también se ha observado en anteriores estudios que *P.candidum* presenta diversos problemas en su cultivo en medio líquido como una baja capacidad de recuperación después de ser congelado, la dificultad de cosechar esporas, etc., de aquí que se desee clonar el gen de lipasa de *P.candidum* en busca de otro sistema que permita mejores condiciones de manipulación y producción.

En la actualidad existe un gran interés en la clonación de los genes de lipasa, debido a que con ello es posible obtener mayores cantidades de enzima para realizar estudios posteriores, ya sea estructurales, funcionales, etc. De este modo, podemos encontrar que numerosas lipasas han sido clonadas, tanto de origen bacteriano como fungales. Dentro de las lipasas bacterianas se encuentran los genes de lipasa provenientes de *Bacillus subtilis* (13), *Streptomyces lividans* (43), varios de *Staphylococcus* (30) y algunos otros de bacterias psicrófilas como los géneros *Pseudomonas* (22, 24, 31, 55) y *Moraxella* (20).

Algunos de los genes de lipasa de origen fungal que se han clonado son los provenientes de *Geotrichum candidum*. La secuencia de los genes de sus dos lipasas (I y II) revelan un peso molecular de 55 y 59.55 KDa con un 7 y 6.5 % de carbohidratos respectivamente, así mismo tienen una secuencia señal de 13 a 19 aminoácidos (aa). Al hacer comparación de la secuencia de aa de la lipasa de *G.candidum* con los reportados para otros hongos, se observó que sólo poseía una similitud total del 45% con las lipasas de la levadura *Candida cylindracea*, pero no se encontró similitud con las secuencias de lipasa de otros hongos (49, 50, 59).

De esta levadura (*C.cylindracea*), se han clonado y secuenciado cinco genes de lipasa cuyos pesos moleculares van de 56.95 a 57.29 KDa, además todas ellas poseen un sitio potencial de glicosilación, así como un péptido señal de 15 aa (36, 37).

Penicillium camembertii posee solamente una mono-, diacilglicerol lipasa (MDGL), la cual ha sido clonada y secuenciada, su peso molecular es de 37 KDa y se ha encontrado que su secuencia tiene dos intrones. Esta mono-diacil glicerol lipasa difiere en especificidad por el sustrato con las triacilglicerol lipasas, ya que la primera no muestra actividad hacia los triacilgliceroles. La principal diferencia que se encontró entre las triacilglicerol lipasas y la mono y diacilglicerol lipasa en cuanto a la estructura primaria está en la región C-terminal, pues la MGDL posee una secuencia adicional de 9 aa en esta región (61).

Rhizopus delemar posee una lipasa que tiene una masa de 30.3 KDa. Esta enzima se sintetiza como una preproenzima que contiene 26 aa de péptido señal y 97 aa de propéptido. Esta enzima no presenta similitud significativa con otras lipasas, a excepción de la proveniente del hongo *Rhizomucor miehei*. Ambos hongos pertenecen a la clase de los zigomicetos y la enzima de *miehei* exhibe la misma selectividad posicional a los sustratos que *R. delemar*; la similitud entre los cDNAs que codifican a estas enzimas es considerable, sus porciones codificantes son idénticas en un 56% (25).

De los estudios sobre similitud entre las secuencias de genes de lipasa, puede notarse que prácticamente no existe ninguna entre los diferentes genes de esta enzima, a excepción del pentapéptido Gly-Xaa-Ser-Xaa-Gly que se encuentra implicado en el sitio catalítico de la enzima, ya que esta serina forma parte de la ya mencionada triada catalítica la cual es

común a las esterasas y lipasas dependientes de serina, donde Xaa es cualquier aminoácido aunque se ha observado que generalmente es histidina.

Estos genes de lipasa de origen eucariótico han sido clonados en su mayoría en *E.coli*, debido a que se conoce mucho de la genética y biología molecular de esta bacteria y por tanto se tiene un mayor acceso a vehículos de clonación y expresión de genes heterólogos que los que se tienen en otros sistemas; además de que la clonación en *E.coli* permite la caracterización del gen de interés, con lo cual se facilita realizar una clonación en otro hospedero que sea GRAS (Generally Recognized As Safe), como se hizo con el gen de la lipasa de *Geotrichum candidum* que se clonó primeramente en *E.coli* y posteriormente en *Saccharomyces cerevisiae* (59).

Ahora bien, el éxito en la expresión de genes eucarióticos en *E.coli* requiere que la maquinaria celular esté organizada de tal manera que el nivel de expresión de los genes clonados sea tan buena o mejor que en el organismo original. Probablemente la principal diferencia entre los genes eucariotos y los procariotos sea la presencia de secuencias que interrumpen las regiones codificantes (intrones). Normalmente los intrones son eliminados del transcrito primario produciendo entonces un mRNA "maduro" listo para ser traducido.

En los genes procariotos no hay intrones, por lo tanto tampoco están presentes los sistemas para su procesamiento, así que en general el DNA genómico eucarioto no puede ser usado como fuente de genes de expresión en células bacterianas. Otro problema es que las señales de transcripción en eucariotos son diferentes de los procariotos y usualmente no son reconocidos por la RNA polimerasa bacteriana. Además, la estructura del mRNA eucarioto está poliadenilado en el extremo 3', así

mismo posee una estructura cap en el extremo 5', estas son características que pueden afectar la estabilidad del mRNA y su unión al ribosoma. Aún más, el mRNA eucariótico no posee una secuencia equivalente a la de Shino-Dalgarno que está presente en el mRNA procarioto.

Un problema adicional es el uso de codones. Hay cierta preferencia por el uso de codones que parece estar relacionado con la abundancia de los diferentes tRNAs. Como la preferencia por el uso de codones es distinto en los genes eucariotos, es posible que los niveles de ciertos tRNAs puedan afectar la eficiencia de traducción de estos genes en un sistema procariótico. Finalmente, se sabe que muchas proteínas de eucariotos están sujetas a varias modificaciones postraduccionales, las cuales pueden o no afectar la actividad o estabilidad; la mayoría de estas modificaciones no ocurren en los procariotos (27).

Para evitarse el problema de los intrones, se recurre a la posibilidad de generar *in vitro* copias de doble hélice de DNA a partir de mRNA, llamado DNA complementario (cDNA), gracias al uso de una enzima de origen viral denominada transcriptasa reversa. Esta enzima produce DNA de cadena sencilla, que es complementaria a la secuencia de mRNA, una vez que ha actuado, la DNA polimerasa sintetiza la segunda cadena y la nucleasa SI corta cualquier asa o lazo de DNA que haya podido producir en este proceso. De este modo, la molécula de cDNA de doble cadena no contendrá intrones y podrá actuar como secuencia codificadora en vectores de expresión.

Por otra parte, para obtener la expresión de una secuencia de DNA eucariótico en *E.coli*, es necesario colocar la secuencia codificante en posición 3' de un promotor bacteriano. Los promotores utilizados con mayor frecuencia son aquéllos que proceden de los operones *lac* o *trp* o una

combinación de ambos conocida como "tac". Muchos vectores formados a partir del promotor *lac* están basados en el principio de incorporar la región control *lac* completa más unos pocos nucleótidos del comienzo del gen "Z" que codifica para la β -galactosidasa. El DNA exógeno que se desea expresar es insertado posteriormente "corriente abajo" de la secuencia codificadora N-terminal del gen de β -galactosidasa. Uno de los efectos buscados es mantener el mecanismo de control que opera normalmente en el operón *lac*, de esta manera, la expresión del promotor es regulada por el represor *lac*. La transcripción o desrepresión del gen se pone en marcha al añadir un inductor como el IPTG (27, 52).

De esta manera, en muchas de las clonaciones del gen de lipasa, tanto de origen bacteriano como eucarioto que se han hecho en *E.coli*, se han usado como vectores de expresión plásmidos derivados del fago M13, como son todas las variedades de pUC (ver tabla 4). Estos vectores son los que mejores resultados han tenido en cuanto a la expresión de actividad lipolítica, comparados por ejemplo con el uso de plásmidos como el pKT, los derivados de pMC y el pTTQ19 que no presentan actividad sino que la enzima queda en cuerpos de inclusión o en el espacio periplásmico de *E.coli* (24).

TABLA 4. Lipasas de hongos y levaduras que han sido clonadas.

Microorganismo	# de lipasas clonadas	Vehículo usado	Masa molecular	Secuencia señal	Referencia
<i>Candida cylindracea</i>	5	pGEM37	56 95-57 74	14-15 aa	(36, 37)
<i>Rhizopus delemar</i>	1	pUC8	30 3	26 aa	(25)
<i>Penicillium camombertii</i>	1	pUC19	38	26 aa	(61)
<i>Geotrichum candidum</i>	2	derivado de pBR322	55-59	13-19 aa	(49, 50)

Por lo anterior, en este trabajo se decidió utilizar el plásmido pUC19. Este plásmido, como ya se dijo, es un derivado de M13 que tiene un tamaño de 2.686 kB, con marcador de resistencia a ampicilina y posee un sitio de policonación que interrumpe el gen de lac' Z (figura 2).

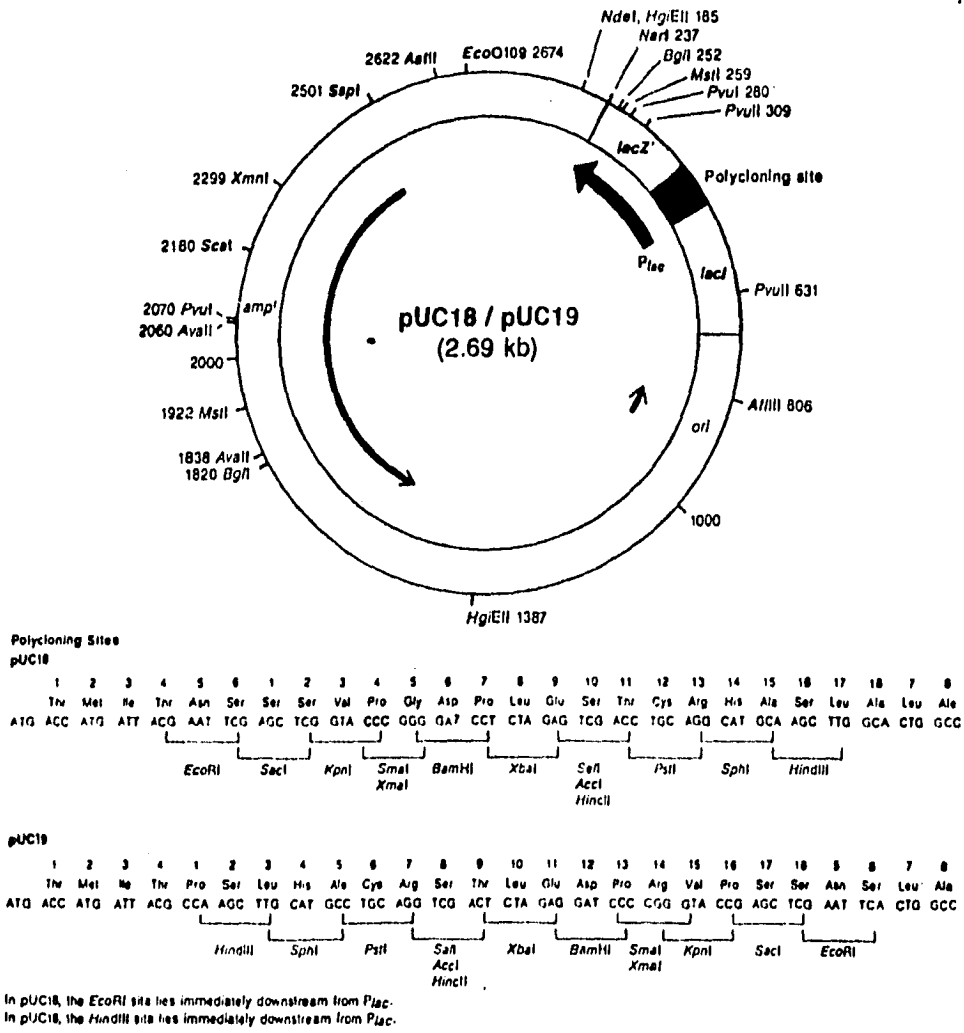


Figura 2. MAPA DE RESTRICCION DEL PLASMIDO pUC19. Tomado de Sambrook, et al., (47).

IV. OBJETIVOS:

Objetivo general:

Establecer las metodologías necesarias para realizar la clonación del gen de la lipasa de *Penicillium candidum* en *Escherichia coli*.

Objetivos particulares:

- * Establecer la estrategia general de clonación del gen de lipasa.**
- * Montar las técnicas necesarias para llevar a cabo la estrategia de clonación antes planteada.**

V. MATERIALES Y METODOS.

5.1 MICROORGANISMOS Y CONSERVACION:

La cepa utilizada es el hongo *Penicillium candidum* procedente de los laboratorios G. Roger 77260, La Ferté sous Jouarré, France. Esta cepa se conservó a 20°C bajo cero en solución de esporas en glicerol al 40%, y en forma de micelio en tubo inclinado con tapón de rosca en medio de cultivo PDA (Papa-Dextrosa-Agar) a 4°C.

La cepa utilizada como receptor es *Escherichia coli* JM101 donada por la Dra. Amelia Farrés de la Facultad de Química. Esta cepa se conservó en glicerol al 20% a 20°C bajo cero.

5.2 PREPARACION DEL INOCULO DE *Penicillium candidum*.

El hongo se sembró por estria en cajas petri con medio PDA y se incubó a 29°C durante 6 días, tiempo en que el hongo esporuló. Posteriormente, este medio de cultivo se sustituyó por el medio "A" (tabla 5) en donde el hongo produjo mayor cantidad de esporas, facilitando de este modo la obtención del inóculo. Las esporas se cosecharon y con éstas se preparó una suspensión en solución de sales (tabla 6), hasta una densidad óptica de 0.6 leída a 540 nm. Para el crecimiento y producción de la enzima, se colocó un mililitro de esta solución de esporas en matraces Erlenmeyer de 250 ml con 50 ml de medio "D" (10) suplementado con 1% de casaminoácidos (tablas 6 y 7) . Los matraces se incubaron a 29°C con una agitación de 160 rpm, durante 4-5 días, o el tiempo necesario según el tipo de experimento realizado.

TABLA 5. Composición del medio "A".

Componente	g/l
maíz quebrado tamizado	40.0
agar-agar	20.0
solución salina	40.0 ml

TABLA 6. Composición de la solución de sales.

Componente	g/l
K_2HPO_4	13.48
KH_2PO_4	16.68
$MgSO_4$	0.5
solución de elementos traza	1 ml

TABLA 7. Composición del medio "D".

Componente	g/l
glucosa	10.0
casaminoácidos	10.0
KNO_3	2.0
KH_2PO_4	1.0
$MgSO_4$	0.5
Elementos traza	1.0 ml

TABLA 8. Composición de la solución de elementos traza.

Componente	mg/l
sulfato de zinc	439.9
nitrate de fierro (II)	723.5
sulfato de manganeso	203.0

5.3 MEDIOS DE CRECIMIENTO PARA *Escherichia coli*.

Para realizar la transformación, así como para el crecimiento masivo en caja, *E.coli* se hizo crecer en el medio Luria-Bertani (tabla 9). Para la selección de colonias lipolíticas se utilizó el medio mínimo con las sales M9 (tabla 10), suplementado con 0.2% de aceite de olivo.

TABLA 9. Composición del medio Luria-Bertani.

Componente	g/l
Bacto-triptona	10
Extracto de levadura	5
NaCl	10
Agar-agar	15

TABLA 10. Composición del medio mínimo M9.

Componente	g/l
Glucosa	2.0
CaCl ₂	1mM
MgSO ₄	0.1
Na ₂ HPO ₄	6.0
KH ₂ PO ₄	3.0
NaCl	0.5
NH ₄ Cl	1.0
Tiamina	0.1

5.4 DETERMINACION DE CRECIMIENTO DE *Penicillium candidum*.

En papeles filtro Whatman 540, previamente secados y pesados, se filtró el caldo de fermentación para separar el micelio. Posteriormente se secaron estos papeles durante 24 horas a 60°C y se pesaron. El crecimiento

queda expresado como miligramos de biomasa por mililitro de caldo de fermentación.

5.5 DETERMINACION DE PRODUCCION DE LIPASA.

Fundamento: La reacción lipolítica libera un ácido al medio de reacción el cual puede ser determinado mediante el cambio de pH del medio. De este modo, la lipasa obtenida del medio de fermentación se pone en contacto con el sustrato emulsificado, la enzima lo hidroliza liberando el ácido y el cambio en el pH se observa durante un minuto, tiempo en el cual se tiene una respuesta lineal (28).

Reactivos:

Amortiguador de succinatos 0.02 M. Se pesan 0.2364 g de ácido succínico, se disuelve en 80 ml de agua, se ajusta a pH = 6.0 con solución concentrada de NaOH y se afora a 100 ml.

Tributirina Grado II (95% de pureza), marca Sigma.

Procedimiento:

Sobre una plancha de agitación magnética, se coloca un baño de agua a 37°C, dentro del mismo se pone un tubo de ensaye con un mililitro de tributirina y 12.5 ml de amortiguador de succinatos. Se introduce una barra de agitación magnética de 0.5 cm. Después de un minuto de agitación vigorosa se añade a la emulsión formada 0.5 ml del caldo de fermentación cuya actividad se desea conocer. Se hace la medición del pH del sistema a los 20, 40 y 60 segundos de reacción.

Cálculo:

Se hace una curva estándar de ácido butírico contra pH en la cual se interpolan los datos de cambio de pH obtenidos. Esta curva estándar se realiza añadiendo cantidades crecientes de ácido butírico, mientras se observa el cambio de pH en un sistema con buffer de succinatos 0.02 M pH 6.0. La actividad se reporta como unidades de lipasa (UL).

UL = número de micromoles de ácido butírico liberados a partir de tributirina durante un minuto por acción de la enzima presente en un mililitro de filtrado bajo las condiciones de reacción.

Se usa como blanco un control de *P.candidum* cultivado sin aceite, el cual bajo estas condiciones no produce lipasa.

5.6 DETERMINACION DE ACTIVIDAD LIPOLITICA EN PLACAS CON TRIBUTIRINA

Al medio de cultivo donde se hace crecer al microorganismo, se le adiciona agar-agar 15 g/l y este se disuelve calentando suavemente. Una vez fundido el agar, se le adiciona 1% de aceite de oliva y se homogeniza perfectamente hasta formar una emulsión; entonces se esteriliza en la autoclave (34). Ya estéril se deja enfriar un poco y se vacía a las cajas petri. Las placas se siembran por picadura o estría según el microorganismo a probar y se incuban. Pasado el tiempo de incubación, se pueden observar a simple vista las zonas claras alrededor de la colonia que es lipolítica (halos de hidrólisis).

5.7 METODO DE AISLAMIENTO DE DNA:

El DNA genómico puede aislarse de las células por rompimiento de las mismas y posterior uso de las propiedades del DNA, proteínas y demás constituyentes celulares. El método de aislamiento de DNA por extracción con dodecil sulfato de sodio y fenol (SDS-fenol) es un método muy rápido y ampliamente utilizado en hongos filamentosos y plantas. La técnica usa el SDS con fenol para desnaturalizar y disolver las hifas maceradas, dejando intacto el DNA, el cual después es precipitado de la solución con etanol absoluto (7).

Protocolo:

1. El hongo se hace crecer en un matraz de 500 ml con 100 ml de medio "D" durante 96 horas.
2. Se preparan polvos de acetona, para ello se esteriliza papel filtro Whatman dentro de una caja Petri, así como un matraz Kitasato de 4 lts y un embudo Buchner.
3. Se filtra la mitad del volumen de un matraz sin dejar secar y se agregan dos volúmenes del Buchner de agua, cuidando que no se seque el micelio. Una vez que se ha adicionado el agua, se deja secar el micelio. Ya que se ha secado, se agrega un volumen del Buchner de acetona, se apaga el vacío cuando ya está seco el micelio, entonces se levanta con pinzas y se ponen los polvos en una caja petri o en un vaso que esté en hielo. El micelio así preparado se pesa en un papel filtro estéril y se congela a 20 o a 70°C bajo cero.
4. En un mortero estéril se muele 1g de micelio (polvo de acetona congelado), para ayudar a la molienda, se pone un pedacito de hielo seco en el mortero y se muele todo junto.

5. Se pasan los polvos obtenidos a tubos de centrifuga estériles.
 6. El polvo se mezcla poco a poco con 20 ml de la siguiente solución:

Componente	Concentración
Tris	10 mM, pH = 8.0
Acido etilendiamino tetracético (EDTA)	1 mM
SDS	4 %
sacarosa	25 %

se deja a temperatura ambiente por una hora con agitación ocasional.

7. Se hacen cuatro extracciones con fenol:cloroformo (1:1), centrifugando 15 min a 12000 rpm a 4°C en cada extracción y recuperando el sobrenadante en tubos limpios.

8. Posteriormente, se extrae una vez con un volumen de cloroformo, se centrifuga 10 min a 12000 rpm a 4°C y se precipita el DNA con dos volúmenes de etanol absoluto.

9. Los tubos con el DNA se centrifugan 15 min a 12000 rpm (4°C), se decantan y se dejan escurriendo sobre un papel absorbente.

10. El botón se resuspende en 5 ml de buffer Tris-EDTA (TE) y se trata con 50 µg/ml de RNAsa durante 1 hora a 37°C.

11. Se hacen dos extracciones con fenol:cloroformo(1:1), recuperar el sobrenadante después de cada centrifugación 10 min a 12000 rpm (4°C). Al terminar se hace una extracción con cloroformo y se recupera el sobrenadante.

12. El DNA se precipita con dos volúmenes de etanol absoluto y 160 mM de NaCl y se guarda a 20°C bajo cero por 12 h. Se recuperan los ácidos nucleicos por centrifugación a 12000 rpm durante 15 min.

13. El botón de DNA se lava con etanol 70%, se centrifuga 10 min a 12000 rpm. Se decanta el sobrenadante, una vez seco el DNA, se resuspende en 1

ml de TE y se almacena a 20°C bajo cero. Con este método se obtuvo un rendimiento del 0.1% por gramo de micelio seco.

5.8 PROCEDIMIENTO PARA EL AISLAMIENTO DE RNA TOTAL POR EL METODO DE GUANIDINA- FENOL-ACIDO

La más alta calidad de RNA resulta indiscutiblemente de su extracción mediante el uso de amortiguadores con tiocianato de guanidina o hidrocloreuro de guanidina. Estos procedimientos de aislamiento tienen la ventaja de romper a las células en crecimiento rápida y completamente, al mismo tiempo que se inactiva la acción de las RNasas, incluso cuando están en gran abundancia. En este protocolo que se presenta, el RNA se extrae de la muestra con una mezcla de guanidina-fenol-ácido-cloroformo (19). La incorporación de un buffer de extracción preparado al mezclar fenol saturado con una solución acidificada de acetato de sodio y cloroformo, permite la partición de RNA en la fase acuosa con el DNA y proteínas presentes en la interfase y fase orgánica. Entonces el RNA es recuperado por precipitación con isopropanol y después es colectado por centrifugación.

Protocolo:

1. Se mezcla el micelio preparado como polvos de acetona, con solución 1 a temperatura ambiente (1 ml de solución por 100 mg de micelio).

Solución 1:

- 8 M** guanidina- HCl
- 0.1 M** acetato de sodio (pH = 5.2)
- 5 mM** ditioneitol
- 0.5 %** laurilsarcosinato de sodio

Se centrifuga 10 minutos a 10000 rpm.

2. El sobrenadante se transfiere a tubos y se añade en orden las siguientes soluciones:

0.1 ml de 3 M acetato de sodio (pH = 5.2)

1.0 ml de fenol saturado

0.2 ml de cloroformo

Se tapa el tubo y se mezcla por inversión después de la adición de cada reactivo. Una vez añadidos todos los reactivos, se mezcla el tubo suavemente durante 10 segundos

3. La muestra se enfría en hielo durante 15 minutos y se centrifuga a 4°C por 10 minutos a 10000 rpm para separar las fases.

4. La fase acuosa (que contiene el RNA) se transfiere a un tubo limpio y se lava tres veces más con un volumen de cloroformo cada vez. Se centrifuga a 4°C por 10 minutos a 10000 rpm y se separa la fase acuosa.

5. En el tubo limpio, al cual se le ha transferido la fase acuosa, se le añade un volumen igual de isopropanol y se almacena a 20°C bajo cero, durante una hora para precipitar el RNA.

6. El precipitado se recupera por centrifugación a 10000 rpm por 20 minutos a 4°C. El sobrenadante se decanta cuidadosamente.

7. El botón de RNA se disuelve completamente en 300 µl de agua libre de RNasas y se transfiere a tubos de microcentrifuga.

8. Se reprecipita el RNA por adición de un volumen igual de isopropanol y se almacena a 20°C bajo cero por una hora.

9. Colectar el precipitado centrifugando en microfuga, por 10 minutos a 4°C. Se descarta cuidadosamente el sobrenadante.

10. El botón de ácidos se lava dos veces con 500 µl de etanol al 70%, se recentrifuga y se seca el botón de RNA.

11. El RNA se redissuelve en 50 μ l o menos de agua tratada con dietil-pirocarbonato (DEPC). Se deja incubando a 65°C durante 10 minutos para facilitar la solubilización. Después de cuantificar midiendo absorbancia a 260 nm, se almacena en alícuotas a 70°C bajo cero. Mediante este método se tuvo un rendimiento del 0.007% de RNA total por gramo de micelio, preparado como polvos de acetona.

5.9 METODO PARA DETERMINAR LA INTEGRIDAD DEL RNA.

La integridad del RNA puede determinarse mediante electroforesis en un minigel (dimensiones: 7 cm X 8 cm) de agarosa al 1%, sin necesidad de prepararlo con agentes desnaturalizantes. De este modo, en un período de tiempo relativamente corto se puede confirmar que el RNA está intacto; la formación de bandas de 28s y 18s de los ribosomas es una buena señal de que el RNA está intacto (19).

Protocolo:

1. Se prepara una solución de agarosa al 1% en amortiguador de electroforesis Tris-acetatos-EDTA (TAE). Cuando la solución esté aproximadamente a 60°C se forma el gel.
2. Mientras el gel se solidifica, mezclar de 1-5 μ g de RNA (en un volumen total de 3 μ l), se le adiciona 1 μ l de buffer de muestra (50% glicerol, 1mM EDTA, 0.4% de azul de bromofenol).
3. Se aplica la muestra (4 μ l) en el gel y se lleva a cabo la electroforesis a 75-100 voltios hasta que el pigmento haya migrado a 2/3 del largo del gel.
4. El gel se coloca en una solución de bromuro de etidio (0.5 μ g/ml), por 5 minutos para teñirlo y después se puede observar en el transiluminador.

5.10 METODO DE ELECTROFORESIS DE RNA EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES.

El formaldehído es usado comúnmente como agente desnaturizante del RNA. Para asegurarse de que el RNA migra sólo con respecto al peso molecular, las muestras de RNA son desnaturizadas con formaldehído y formamida antes de hacer la electroforesis, el formaldehído se añade también al gel para mantener el estado desnaturizante durante la electroforesis (19).

Protocolo:

1. Se disuelve la cantidad apropiada de agarosa en agua a 60°C y se añade amortiguador de corrida, ácido 3-morfolino propanesulfónico 10X (MOPS 10X) y formaldehído hasta concentraciones finales de 1X y 2.2 M respectivamente. Se coloca en el molde del gel en la campana de aire y se deja cuajar por 30 minutos a temperatura ambiente.

Amortiguador 10X MOPS

200 M	MOPS
50 mM	Acetato de sodio
10 mM	EDTA (pH = 7)

2. Las muestras se preparan mezclando en un tubo para microfuga estéril, lo siguiente:

5 µl	muestra de RNA (1mg/ml)
2.5 µl	10 X MOPS
3.5 µl	12.3 M de formaldehído
10.0 µl	formamida desionizada

Se incuban las muestras a 65°C por 10 minutos e inmediatamente se enfrían en hielo.

3. Se añade 1 µl de colorante de búsqueda a cada tubo, se centrifuga 5 segundos y se colocan las muestras en un gel que ha sido precorrido durante 5 minutos a 5 Volts/cm.

Colorante para muestras

1 mM	EDTA
0.4 %(w/v)	azul de bromofenol
0.4 %(w/v)	xilen cianol

Se añade a las muestras al 50%(v/v).

4. Se corre el gel sumergido en amortiguador MOPS a una concentración final de 1X a 3-4 Volts/cm. Hay que tener cuidado de que el amortiguador este recirculando continuamente.

5. Después de la corrida del gel, éste se tiñe en bromuro de etidio a una concentración de 5 µg/ml por 15 minutos y se observa en el transiluminador.

5.11 PURIFICACION DE POLI (A+) RNA.

Existen una gran variedad de técnicas que han sido desarrolladas para la purificación del poli(A+) mRNA. En general, esto implica el apareamiento del poli(A+) con la matriz de celulosa oligo (dT) en un buffer de alta fuerza iónica. Esto es necesario para eliminar la repulsión electrostática que se presenta entre el RNA y los residuos de timina de la celulosa. Bajo condiciones de alta concentración de sal, el sodio actúa neutralizando la carga neta negativa intrínseca de los enlaces fosfodiéster de los polinucleótidos. En la ausencia de alta concentración de sal, la repulsión electrostática es de suficiente magnitud para evitar el apareamiento de bases y permitir la purificación del mRNA poli(A+) con esta técnica. Una vez

que se ha hecho pasar por la columna, el poli(A+) puede ser concentrado por precipitación con sal y etanol absoluto (19).

Protocolo (45):

Se debe verificar que todas las soluciones estén libres de RNasas, para ello el agua debe tratarse con dietilpírocarbonato (DEPC) añadiendo 0.1 ml de DEPC por cada 100 ml de agua destilada. Posteriormente se debe eliminar el DEPC mediante esterilización en autoclave, de esta manera se evita que el DEPC inactive al RNA por carboximetilación. Hay que tener cuidado de no adicionar DEPC a soluciones que contengan Tris.

1. Se equilibra la celulosa-oligo d(T) en el siguiente amortiguador de carga (1 ml material/4 mg RNA total).

Buffer de carga

0.5 M NaCl

20 mM Tris pH = 7.5

1 mM EDTA

2. El material se deposita en una columna, hecha con una jeringa de 1 cm³ para insulina, previamente esterilizada en autoclave a 15 Lb durante 20 min.

3. La columna se lava alternadamente con 5 volúmenes de:

a) Agua tratada con DEPC

b) 0.1 M KOH

c) Agua tratada con DEPC

Se comprueba el pH al final del último lavado, este debe ser semejante al pH después del primer lavado con agua.

4. La columna se lava con 5 volúmenes de amortiguador de carga.

5. El RNA se disuelve en agua tratada (hasta 4 mg) y se deja calentar a 65°C durante 5 minutos.

6. Se ajusta el RNA en solución a la concentración final del amortiguador de carga añadiendo soluciones concentradas, entonces se aplica a la columna.

7. El eluido se colecta y se calienta de nuevo a 65°C aplicándolo otra vez a la columna. Se lava la columna con 10 volúmenes de amortiguador de carga (recoger 10 fracciones de 1 ml).

8. Se lee la DO₂₄₀ de cada fracción o se puede hacer la siguiente prueba:

A 5 µl de solución de bromuro de etidio (0.5 mg/ml) se le añaden 5 µl de cada fracción. Se pone una gota sobre papel translúcido y se coloca sobre el transiluminador.

9. La columna se lava con varios volúmenes del siguiente amortiguador de lavado hasta que no se observe RNA en la prueba de la gota.

Amortiguador de lavado.

0.1 M NaCl
20 mM Tris pH = 7.5
1 mM EDTA

10. El poli(A+) RNA se eluye tomando alícuotas de 400 µl de amortiguador de elución.

Amortiguador de elución

10 mM Tris pH = 7.5
1 mM EDTA

11. Se determinan las fracciones que contienen RNA (usualmente la 2 y 3), midiendo DO a 240 nm. Se juntan las fracciones apropiadas con RNA y se añade acetato de sodio pH = 5.2 hasta una concentración final de 0.3 M y 2.5 volúmenes de etanol absoluto.

12. El RNA se precipita 1 h a 20°C bajo cero. Se centrifuga, se lava con etanol al 70% y se resuspende en agua tratada con DEPC.

13. La columna se regenera lavando con:

- a) 0.1 M KOH
- b) Agua tratada con DEPC
- c) Amortiguador de carga

como se hizo antes de usarla (punto 1 y 3).

NOTA: Si se quiere analizar el buen estado del RNA colocar:

- 3 μ g de RNA total
- 3 μ g de RNA eluido de la columna
- 3 μ g de poli(A+)

en un minigel para RNA.

El rendimiento debe ser 3-6% poli(A+)/mg de RNA total.

5.12 SINTESIS DE cDNA

La síntesis de la primera cadena empieza en el extremo 3' del poli(A+) del mRNA cuando se usa como cebador el oligo (dT) o un cebador aleatorio, para la AMV transcriptasa reversa. La síntesis de la segunda cadena se lleva a cabo después de la acción de la RNasa H, la cual inserta huecos en el RNA del híbrido DNA-RNA, generando cebadores 3'-OH para la DNA polimerasa I. La actividad de exonucleasa de 5'->3' de la DNA polimerasa elimina los nucleótidos de RNA y los sustituye por nuevos debido a su actividad de polimerización (11).

Protocolo:

Para un volumen final de 20 μ l (0.2-2 μ g de mRNA).

1. En un tubo Eppendorf previamente enfriado en hielo se pipetea y mezcla después de agregarse cada componente, lo siguiente:

4 μ l Amortiguador para la síntesis de la primera cadena.
 1 μ l inhibidor de RNAsas, aislado de placenta humana (47).
 2 μ l mezcla de desoxirribonucleótidos.
 2 μ l cebador de oligo(dT)
 varía agua destilada
 varía muestra
 2 μ l transcriptasa reversa del retrovirus AMV

 20 μ l

Amortiguador para la síntesis de la primera cadena

1 M Tris·HCl (pH 7.6)
 1.5 M KCl
 200 mM MgCl₂
 0.1 M ditiotreitól

2. Los componentes de la reacción se mezclan una vez más, se centrifuga en microcentrifuga y se incuba por 60 min a 42°C, para la síntesis de la primera cadena de DNA.

3. La mezcla de reacción se coloca en hielo y los componentes para la síntesis de la segunda cadena se añaden en el mismo tubo:

40 μ l Amortiguador II para la síntesis de la segunda cadena
 1 μ l RNAsa H
 varía agua destilada
 5 μ l DNA polimerasa I de *E.coli*

 100 μ l

Amortiguador para la síntesis de la segunda cadena

25 mM MgCl₂

0.3 M Tris·HCl (pH 7.4)

0.05 M (NH₄)₂SO₄

3. Se mezclan los componentes y centrifugar en una microcentrifuga por 10 s. Nuevamente se incuba el tubo con la mezcla durante 60 min a 12°C, 60 min a 22°C y 10 min a 65°C, para la síntesis de la segunda cadena de DNA.

4. Después de la incubación se adiciona a la mezcla:

**** 4 µl de solución T4 DNA polimerasa, se mezcla, centrifuga por 10 s e incuba por 10 min a 37°C.**

5. La la reacción se detiene adicionando:

10 µl EDTA 0.2 M, pH 7.2

2 µl Sarkosil 10%

6. Hacer una extracción con fenol-cloroformo (1:1), y precipitar dos veces con 2.5 volúmenes de etanol absoluto.

5.13 FOSFORILACION DE OLIGNUCLEÓTIDOS SINTÉTICOS

La reacción reversa de la polinucleótido cinasa cataliza la transferencia del fosfato terminal del ATP al extremo 5'-hidroxilo de DNA o RNA. Esta reacción es muy eficiente y permite la fosforilación de los oligonucleótidos sintéticos (2).

Protocolo:

Para 30 µl de reacción:

50 mM Tris·HCl, pH 7.5

10 mM MgCl₂

5 mM Ditiotretitol

1 a 10 µg de oligonucleótidos o adaptadores

1 mM ATP

20 U polinucleótido cinasa del fago T4

Se incuba a 37°C por 60 minutos. La reacción se detiene por adición de 1 µl de EDTA 0.5 M.

5.14 DESFOSFORILACION DE DNA DE PLASMIDO LINEARIZADO.

El tratamiento del plásmido de DNA con fosfatasa permite la eliminación de los 5'-fosfatos de los plásmidos, de tal modo que éstos no pueden recircularizarse de nuevo, asegurando que sólo el DNA ajeno se una al vector. Después del tratamiento con fosfatasa alcalina se deben eliminar todas las trazas de enzima que puedan interferir posteriormente con las demás técnicas de DNA recombinante (2, 47).

Protocolo (47):

1. Se digiere el DNA de plásmido cerrado circular (10-20 µg) con un exceso de 2-3 veces el volumen de la enzima de restricción adecuada durante 1 h. Se toma una alícuota de 2 µl, y se analiza la digestión por electroforesis en gel de agarosa 0.8%, usando DNA de plásmido sin digerir como marcador, si la digestión es incompleta, añadir más enzima de restricción y continuar la incubación.
2. Cuando se complete la digestión, se hacen extracciones de la muestra con fenol:cloroformo (1:1) y se precipita el DNA con dos volúmenes de etanol absoluto dejándolo 15 min a 0°C. El DNA se recupera por centrifugación a 10000 rpm por 10 min a 4°C en una microcentrífuga, y se redisuelve en 90 µl de Tris·HCl 10 mM (pH 8.3). Se toma una alícuota de DNA de 20 µl y se almacena a 20°C bajo cero.

3. Al DNA remanente, se le adicionan 10 μ l de amortiguador de desfosforilación 10X y la cantidad adecuada de CIP (fosfatasa alcalina intestinal de tenera y se incuba bajo las condiciones adecuadas.

Amortiguador de desfosforilación 10X

ZnCl ₂	10 mM
MgCl ₂	10 mM
Tris·HCl	100 mM pH 8.3

	Extremos cohesivos 5'	Extremos romos
cantidad de CIP requerida.	1 unidad/ 100 pmoles	1 unidad / 2 pmoles
condiciones de incubación.	30 min a 37°C	15 min a 37°C, se añade después otra alícuota de CIP y se continúa la incubación por 45 min a 55°C.

4. Después del período de incubación, se le añade SDS y EDTA (pH 8.0) a una concentración final de 0.5% y 5 mM respectivamente. Mezclar bien y adicionar proteinasa K a una concentración final de 100 μ g/ml. Se incuba por 30 min a 56°C.

5. La reacción se enfría a temperatura ambiente y se extrae una vez con fenol:cloroformo (1:1). Se añade 0.1 volumen de acetato de sodio 3M (pH 7.0), se mezcla bien y se adicionan 2 volúmenes de etanol absoluto. De nuevo se mezcla y almacena a 0°C, por 15 min. El DNA se recupera por

centrifugación a 10000 rpm por 10 min a 4°C en una microfuga. El botón de DNA se lava con un volumen de etanol al 70% a 4°C y se recentrifuga. Finalmente se redissuelve el DNA en buffer TE (pH 7.6) a una concentración de 100 µg/ml y se almacena en alícuotas a 20°C bajo cero.

5.15 UNION DE EXTREMOS ROMOS DE DNA

El requerimiento esencial para la ligación es que los fragmentos de DNA presenten un grupo 5'-fosfato en proximidad a un grupo 3'-hidroxilo. La unión de extremos romos no es tan eficiente como la que se hace con extremos cohesivos, pero puede llevarse a cabo fácilmente cuando se le añade una alta concentración de ligasa (47).

Protocolo:

1. El plásmido y el DNA extraño se digieren con la enzima de restricción adecuada. El DNA se purifica mediante extracción con cloroformo-fenol(1:1) y posterior precipitación con un volumen de etanol absoluto. Los DNAs se redissuelven en amortiguador TE (pH 7.6) a una concentración de DNA de 100 µg/ml.

2. Colocar las mezclas de unión como sigue:

a) Se transfieren 0.1 µg del vector a un tubo Eppendorf estéril y se adiciona una cantidad equimolecular de DNA extraño.

b) Se añade agua hasta 7.5 µl y se calienta la solución a 45°C durante 5 min para fundir cualquier extremo que se haya realineado. La mezcla se enfría a 0°C.

c) Se adiciona:

amortiguador de ligasa 10X	1.0 µl
ligasa de DNA	0.1 unidades
ATP 5 mM	1.0 µl

y se incuba la reacción por 1-4 horas a 16°C. Se ponen dos controles de reacción, uno que contengan el vector solo y otro el vector con el DNA extraño.

3. Para transformar células competentes de *E.coli*, se usan 1-5 µl de cada reacción de ligación.

NOTA: Para extremos romos se recomienda utilizar agentes de condensación como el polietilenglicol, ya que estos aumentan la eficiencia de unión.

5.16 TRANSFORMACION DE *E. coli*.

La transformación es probablemente el principal proceso por el cual las bacterias obtienen la información genética. La mayoría de las especies incluyendo *E.coli* toman sólo cantidades limitadas de DNA bajo circunstancias normales y deben ser sometidas a un pretratamiento físico y/o químico antes de poder ser transformadas eficientemente. Las células que han sido sometidas a este tratamiento son llamadas competentes. Los métodos de preparación de células competentes de *E.coli* se derivan de un trabajo de Mendel y Higa quienes desarrollaron un tratamiento simple basado en el lavado de células en CaCl₂ frío, aunque no se sabe a que se debe la efectividad de este tratamiento (19).

Protocolo:

1. La cepa de *E.coli* se hace crecer en 10 ml de medio Luria-Bertani (L-B), a 37°C 200 rpm, durante toda la noche.

2. Del precultivo antes mencionado, se toma una alícuota (100 μ l por cada 10 ml de medio) y se hace crecer en medio L-B con agitación a 37°C por 90 min hasta una DO de 0.6 leída a 600 nm.
3. El cultivo se centrifuga a 6000 rpm, 10 min, y se tira el sobrenadante.
4. El botón de células se agita vigorosamente y se le añade 15 ml de CaCl₂ 0.1 M frío, dejándolo incubando en hielo durante 10-15 min.
5. Posteriormente se centrifuga a 7500 rpm, 10 min y se descarta el sobrenadante.
6. Al botón se le adicionan de 0.5-2 ml de CaCl₂ 0.1 M, en este momento se tienen células competentes.
7. En un tubo Eppendorf o de vidrio se colocan de 100-200 μ l de células competentes, a las cuales se les adiciona de 1-5 μ l de plásmido y se les incuban en hielo por 15 min. Se hace un choque térmico a 42°C por 2 min, después del cual se agita el tubo cuidadosamente.
8. Se pasa a hielo inmediatamente y se incuban por 15 min.
9. Al tubo se le adicionan de 100-200 μ l de medio Luria-Bertani, y se deja incubando a 37°C durante 1-2 h.
10. Se platan de 50-100 μ l de células transformantes en medio selectivo e incuban a 37°C.

5.17 MINIPREPARACION DE PLASMIDO

El aislamiento de plásmido se lleva a cabo en tres etapas. La pared celular de la bacteria que lo contiene, es debilitada primero por la acción de lisozima y entonces las células son lisadas con el uso del EDTA y un detergente con pH alto. Finalmente el desecho celular insoluble es precipitado por centrifugación, dejando el plásmido en solución; este último se recupera por precipitación con etanol absoluto (19).

Protocolo:

1. Se inoculan con una colonia 5 ml de un precultivo bacteriano que contenga el antibiótico apropiado para el plásmido.
2. Se deja cultivar toda la noche a 37°C con agitación a 200 rpm, de este precultivo tomar 1 ml para medir D.O. a 600 nm.
3. En un tubo Eppendorf se coloca 1 ml del cultivo anterior, centrifugar a 6000 rpm por 10 min a 4°C.
4. Se descarta el sobrenadante, se lava dos veces con un volumen de amortiguador sodio-Tris-EDTA (STE). Después de los lavados se adicionan 100 µl de solución I y se agita suavemente 5 min a temperatura ambiente.

SOLUCION I

glucosa	50 mM
Tris·HCl	25 mM
EDTA	10 mM
lisozima	4 mg/ml

5. Al tubo se le adicionan 200 µl de solución II, se mezcla por inversión del tubo y se incuba durante 5 min a 0°C.

SOLUCION II

NaOH	0.2 N
SDS	1.0 %

6. Se añaden 150 µl de solución III preenfriada al tubo, se mezcla todo y se incuba 10 min a 0°C.

SOLUCION III

acetato de potasio	5M	60.0 ml
ácido acético glacial		11.5 ml
agua		28.5 ml

7. La mezcla se centrifuga 15 min a 10000 rpm, se transfiere el sobrenadante y se añade 1 ml de isopropanol y se deja incubar durante 15 min a temperatura ambiente.

8. Nuevamente se centrifuga por 10 min a 10000 rpm, se lava el botón de plásmido con 1 ml de etanol al 70% y secarlo a temperatura ambiente.

VI. RESULTADOS Y DISCUSION:

6.1 CINÉTICA DE CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN DE LIPASA DE *Penicillium candidum*.

Para llevar a cabo la cuantificación de la actividad lipolítica se utilizó una curva estándar de ácido butírico (figura 3), hecha como se mencionó en la sección 5.5, la cual muestra un coeficiente de regresión de -0.988, esto se debe a que la curva se encuentra en forma lineal hasta aproximadamente los 300 μ moles de ácido butírico, después de los cuales se empieza a disminuir la sensibilidad a la concentración de ácido butírico, por ello se tomó la curva estándar de 0 a 250 μ moles de ácido butírico para hacer la interpolación de los valores experimentales de pH.

Con el fin de conocer el punto de máxima producción de lipasa (lo cual nos permitirá teóricamente tener enriquecida la presencia del mRNA del gen de lipasa y de este modo, saber el momento de cosecha del micelio para la posterior extracción del RNA total), se realizó una fermentación en medio líquido utilizando medio "D" con 0.2% de aceite como inductor de la enzima.

En la figura 4 se presenta la cinética de crecimiento y producción de enzima. El crecimiento presenta una fase lag de 48 h, después de las cuales tiene su fase exponencial que termina a las 96 h y después empieza la fase estacionaria. En la misma figura se puede notar que el punto máximo de producción de lipasa se encuentra a las 96 h. Por tanto, la cosecha del micelio se realizó a este tiempo para el aislamiento del RNA total.

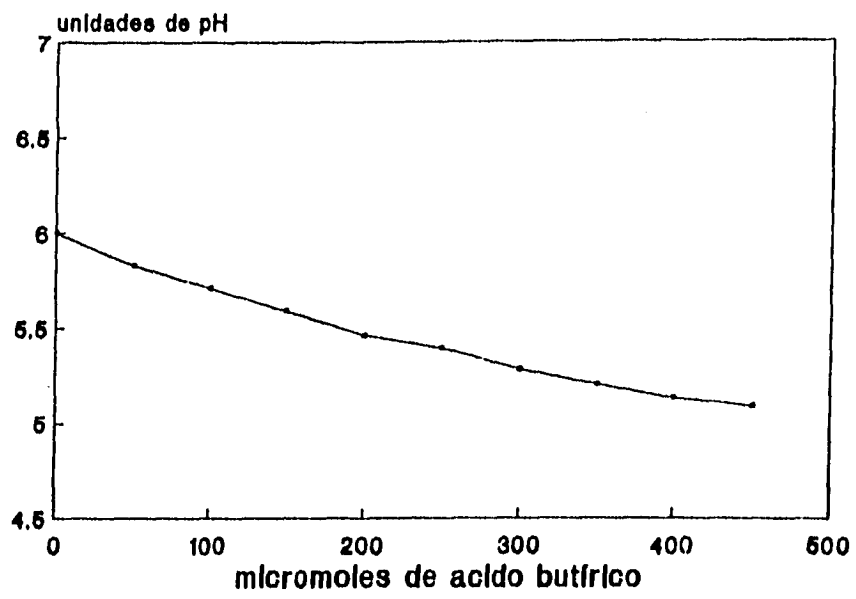


Figura 3. CURVA ESTANDAR DE ACIDO BUTIRICO. Esta gráfica se elaboró como se menciona en material y métodos.

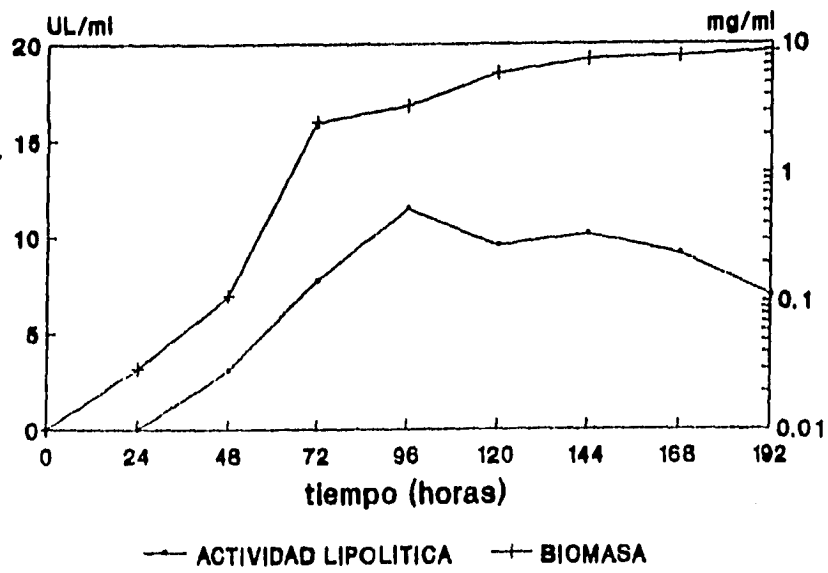


Figura 4. GRAFICA DE PRODUCCION DE LIPASA Y CINETICA DE CRECIMIENTO DE *Penicillium candidum*. Se incubó el hongo en medio "D" con 0.2% de aceite de oliva a 29°C, con agitación de 160 rpm.

6.2 ENSAYO DE ROMPIMIENTO DEL MICELIO DE *P.candidum* PARA LA EXTRACCION DE ACIDOS NUCLEICOS.

Se realizó un ensayo de rompimiento de micelio mediante la preparación de polvos de acetona y se aisló DNA total de *Penicillium candidum*. En la figura 5 se puede observar que en el carril 2 hay una banda bien definida que se encuentra por encima del marcador de peso molecular λ +Hind III (carril 1), además de que no hay barrido por debajo de la banda; lo cual significa que se obtuvo DNA de alto peso molecular en buenas condiciones, lo que permitió decidir que el método de rompimiento mediante la preparación de polvos de acetona es útil y sencillo para el aislamiento de ácidos nucleicos en buen estado. Hay que señalar que, el método de rompimiento por medio de nitrógeno líquido ha sido reportado como el más comúnmente utilizado para realizar el aislamiento de ácidos nucleicos (35, 38).

6.3 AISLAMIENTO DE RNA TOTAL DE *P.candidum*.

Una vez establecido el método de rompimiento, se procedió a realizar ensayos para la extracción de RNA total. El primer método que se probó es el reportado por Sambrook et al. (47), para el aislamiento de RNA total con el uso de solventes orgánicos. En la figura 6 se presenta una electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, en la que se puede observar un barrido así como una banda de alto peso molecular (carril 2), comparando con el marcador de peso molecular (carril 1), por tanto aunque hay una alta concentración de ácidos nucleicos, estos están degradados y contaminados con una apreciable cantidad de DNA, lo cual no era el objetivo. Lo anterior pudo deberse a que el método es muy largo (se realizó en aproximadamente 3 días), además de que se realizan muchas manipulaciones del mismo, pues

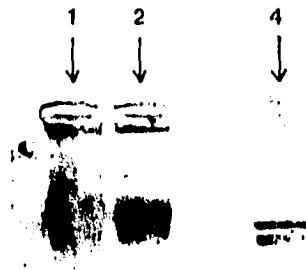


Figura 5. AISLAMIENTO DE DNA TOTAL DE *Penicillium candidum*. Carriles 1 y 2: muestras de la extracción de DNA del hongo; carril 4: marcador de peso molecular λ -HindIII.



Figura 6. AISLAMIENTO DE RNA TOTAL DE *P.candidum*, METODO DE SAMBROOK ET AL, (47). Carril 1: marcador de peso molecular λ + Hind III; carril 2: muestra de la extracción de RNA total del hongo.

hay por lo menos 5 pasos de precipitación, lo que permitió la degradación del RNA. Por lo anterior se decidió utilizar otro método de aislamiento de RNA total que requiriera un menor tiempo de tratamiento; por ello se eligió el método de aislamiento de RNA total de Farrell (19), que también utiliza solventes orgánicos pero que se realiza en un mínimo de 4 h.

De la muestra así procesada, se hizo una electroforesis en gel de agarosa al 1%. En la figura 7 se puede observar que en el carril 2 y 3 hay unas bandas más o menos definidas que pertenecen a los RNA ribosomales 28s y 18s; además de que no se observa el barrido característico de los ácidos nucleicos degradados. De este modo, se obtuvo un RNA total en buen estado con un rendimiento de 0.007% el cual fué utilizado entonces para hacer la purificación del mRNA poliadenilado.

6.4 ELECTROFORESIS EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES.

Las electroforesis que se hicieron para verificar la integridad del RNA total, fueron del tipo que se usa comunmente para DNA, esto presenta algunas desventajas debido a que el RNA presenta estructuras secundarias que hacen que no corra de acuerdo a su carga y peso, sino también de acuerdo a su estructura. De aquí la necesidad de montar la técnica de electroforesis en condiciones desnaturalizantes. Debido a su sencillez, se escogió el método que utiliza como agente desnaturalizante al formaldehído, ya que este compuesto presenta una menor toxicidad comparado con otros métodos que utilizan reactivos como el hidróxido de mercurio. Se hizo entonces un gel de agarosa al 1% y se corrió bajo estas condiciones desnaturalizantes; en la figura 8 se presenta el gel, donde sólo se ven bandas de RNA total en los carriles 3 y 5, los cuales contienen muestras de más de 5 µg de RNA, sin embargo en los carriles 6 y 8 no se

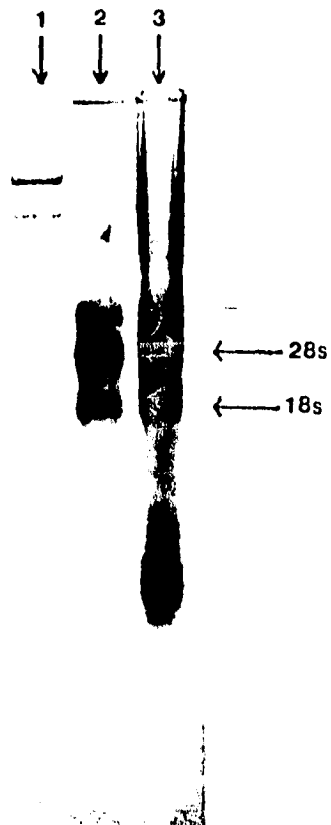


Figura 7. AISLAMIENTO DE RNA TOTAL DE *P.candidum*, METODO DE FARRELL, (19). Carril 1: marcador de peso molecular λ + Hind III, carriles 2 y 3: muestras de la extracción de RNA total del hongo.

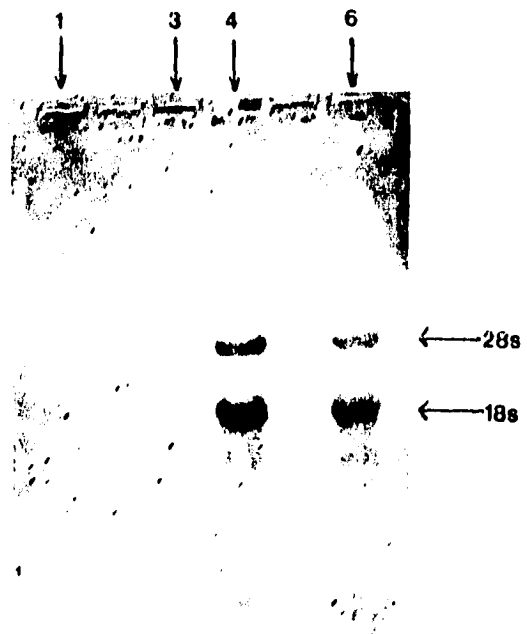


Figura 8. ELECTROFORESIS DE RNA EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES. Carriles 1, 3, 4 y 6: muestras de RNA total de *P.candidum*.

observa más que un leve bandeo, esto se debe a que la muestra cargada era menor de 5 μg de RNA. Esto nos hace pensar en la necesidad de contar con una buena cantidad de RNA para poder notar su presencia en un gel corrido bajo estas condiciones. No obstante, esto no es necesario al emplear la electroforesis de DNA en donde aún usando concentraciones menores a 5 μg de ácidos nucleicos, es posible observar el RNA. Por lo anterior se decidió continuar utilizando la electroforesis de DNA con el fin de determinar la integridad del RNA.

6.5 PURIFICACIÓN DE POLI (A+) Y SÍNTESIS DE cDNA.

Para la purificación del mRNA poli(A+), se utilizó una columna de celulosa oligo(dT). Se tomó una alícuota de RNA total y se hizo pasar por la columna, al cargar la columna con el amortiguador de carga, las alícuotas recibidas de la columna eran entonces muestras de RNA no poliadenilado; al hacer pasar el amortiguador de lavado se obtuvieron alícuotas que pueden contener pequeñas cantidades de RNA que se haya unido a la columna de manera inespecífica. Por último al añadir el amortiguador de elución, se obtuvo el RNA poliadenilado.

De cada alícuota obtenida de la columna se tomó una muestra y se hizo un gel de electroforesis con agarosa al 1% (figura 9), en el carril 1 se encuentra el marcador de peso molecular, en el carril 2 está una muestra de mRNA total, el cual como se puede notar está en baja concentración por lo que no se puede observar con claridad. En los carriles 3 a 6 se encuentran las muestras de las alícuotas del amortiguador de lavado, en los cuales no se observan ácidos nucleicos. En los carriles 7 a 11 se encuentran muestras de la elución del mRNA obtenido, de ellos sólo los carriles 8 y 9 presentan ácidos nucleicos, estas muestras corresponden a las alícuotas de la

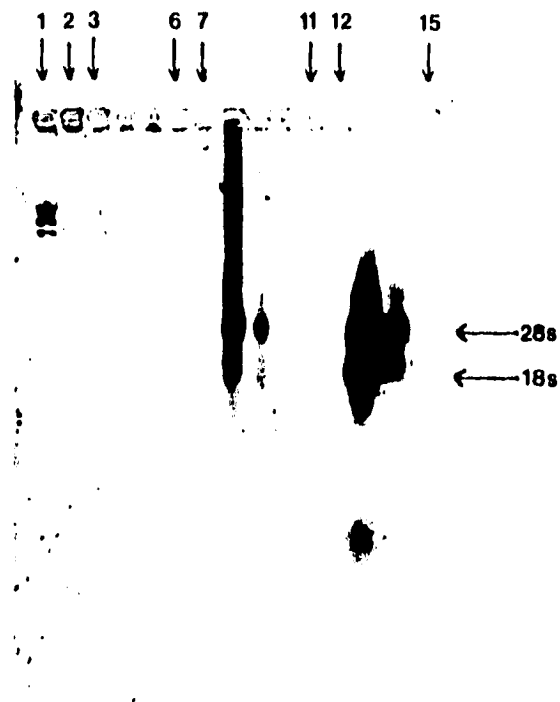


Figura 9. PURIFICACION DE mRNA DE *P.candidum*. Carril 1: marcador de peso molecular λ + Hind III; carril 2: muestra de RNA total, carriles 3-6: muestras de las alícuotas del amortiguador de lavado, carriles 7-11: muestras de las alícuotas del amortiguador de elución, carriles 12-15: muestras de las alícuotas del amortiguador de carga.

columna 2 y 3. Finalmente en los carriles 12 a 15 se encuentran las muestras de las alicuotas del amortiguador de carga, en ellos se puede notar que aparece RNA no poliadenilado en las alicuotas 2 y 3 (carriles 13 y 14). El mRNA que aparece en el gel, parece estar contaminado con una baja cantidad de RNA ribosomal que debe haberse unido inespecíficamente a la columna, sin embargo este rRNA no interfiere con la posterior reacción de síntesis de cDNA.

Así pues, con este mRNA purificado se procedió a realizar la síntesis de cDNA, mediante el uso de un sistema comercial (según un método modificado por Chirgwin et al. 11), el cual contiene un control de la síntesis llamado Neopa que se sintetizó a la par que el mRNA del hongo, para verificar las condiciones del sistema comercial. Estos cDNAs sintéticos fueron fosforilados con el uso de una polinucleótido cinasa, ya que en la reacción de síntesis se obtiene un cDNA de extremos romos sin fosforilar, y esta fosforilación le es necesaria para ser ligado al vector posteriormente.

6.6 LIGACIÓN Y TRANSFORMACIÓN.

El vector elegido fué el plásmido pUC19, debido a que como ya se mencionó anteriormente, este plásmido ha sido usado con éxito en otras clonaciones de genes de lipasa de hongos y bacterias. Así entonces, el plásmido fué aislado y purificado según el método de Sambrook, (47); después se cortó con una endonucleasa de restricción que genera extremos romos, como lo es Hinc II, para después unirlo al cDNA ya fosforilado mediante el uso de una enzima ligasa. Varios autores han reportado que el método de adición de adaptadores implica varios pasos en los cuales se pierde mucho material, ya sean productos de PCR y demás DNAs sintéticos (6, 56), de aquí que para evitar la pérdida de cDNA se haya preferido hacer la

unión con extremos romos, utilizando un método que mejorara la eficiencia de ligación.

Con el plásmido resultante de esta unión se transformaron células de *E.coli* cepa JM101 no productora de lipasas. Las transformantes se seleccionaron en medio Luria-Bertani con X-gal e IPTG como inductor del gen β -galactosidasa del plásmido pUC19. De este modo se seleccionaron 10 colonias blancas provenientes de *P.candidum* y 2 del control Neopa.

6.7 CARACTERIZACIÓN DE LAS TRANSFORMANTES.

De estas transformantes se hizo una extracción de plásmido, después se tomaron muestras de cada extracción y se corrió una electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. En la figura 10 se puede ver que todas las muestras de la preparación de plásmido de las transformantes, parecen tener inserto ya que migraron ligeramente por encima del control pUC19 (carril 1), esto se observa tanto en los provenientes de *P.candidum* como en una de los provenientes del sistema de síntesis (carril 12). Sin embargo para confirmar las sospechas se llevó a cabo una digestión de los plásmidos con una enzima de restricción como lo es EcoRI. En esta restricción se esperaba que el plásmido pUC19 presentara una sola banda en el gel de electroforesis, ya que este plásmido contiene un sitio único para EcoRI. Para los demás plásmidos se esperaba que si poseían inserto, tuvieran más de un sitio de restricción y que por tanto se viera más de una banda en el gel. Si ocurriera que el inserto no tuviera sitios EcoRI, el plásmido linearizado debe migrar por encima del control pUC19 linearizado. En la figura 11 se pueden observar las muestras de la restricción con EcoRI, de tres plásmidos provenientes de *P.candidum* y dos de Neopa (control de síntesis del sistema comercial). Como se puede notar en las muestras digeridas no parece existir



Figura 10. PREPARACION DE PLASMIDOS DE LAS COLONIAS TRANSFORMANTES. Carril 1: control pUC19; carriles 2-11: plásmido de transformantes de *P.candidum*, carriles 12-13: plásmido de transformantes del control Neopa; carril 14: marcador de peso molecular $\lambda+$ Hind III.

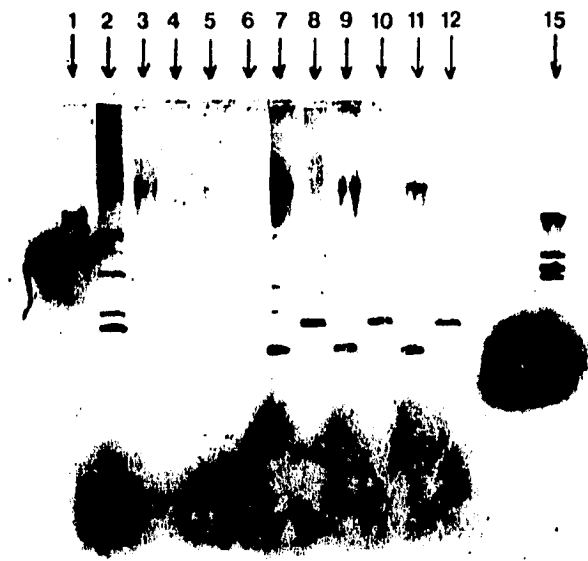


Figura 11. DIGESTION CON EcoRI, DE LOS PLASMIDOS DE LAS TRANSFORMANTES.

CARRIL:

1. Marcador de peso molecular + Eco RI
2. pUC19 + Eco RI
3. plásmido de Neopa 1
4. plásmido de Neopa 1 + Eco RI
5. plásmido de Neopa 2
6. plásmido de Neopa 2 + Eco RI
7. plásmido de *P.candidum* 3
8. plásmido de *P.candidum* 3 + Eco RI
9. plásmido de *P.candidum* 2
10. plásmido de *P.candidum* 2 + Eco RI
11. plásmido de *P.candidum* 1
12. plásmido de *P.candidum* 1 + Eco RI
15. Marcador de peso molecular λ + Hind III

ninguna otra banda, además de la que migra a al altura de pUC19 + EcoRI, así mismo no son muy distintas a esta banda. Sin embargo, como se dijo antes estas colonias presentan color blanco en el medio Luria-Bertani con x-gal e IPTG.

En este punto hay que considerar la eficiencia de la síntesis de cDNA a partir del mRNA aislado y purificado; varios autores mencionan muchos de los problemas durante la síntesis del cDNA que hacen que esta se interrumpa (2, 56). Los problemas más comunes de la síntesis son la calidad de la transcriptasa reversa, la integridad y estructura secundaria del mRNA, así como las condiciones de la reacción. Esto podría explicar el comportamiento de las colonias, pues si la síntesis fue truncada, sólo se tenían pequeños fragmentos de cDNA que fueron los responsables de la interrupción del gen β -gal del plásmido pUC19, por ello se obtuvieron colonias blancas (transformantes) tanto de *P.candidum* como el control del sistema de síntesis Neopa, y sin embargo no se observan diferencias significativas con respecto al control, en la digestión de los plásmidos transformantes.

Ahora bien, en que punto se tiene el problema de la síntesis de cDNA?, esto podría localizarse en las condiciones de reacción o en la calidad de las enzimas involucradas, ya que tanto el cDNA del control Neopa, como el cDNA de *P.candidum* aparentemente se encuentran truncados de igual manera, como se nota en las transformantes que se obtuvieron. Por tanto, se debe considerar que para posteriores síntesis de cDNA se deben variar las condiciones para mejorar la eficiencia de la misma y de este modo evitar en lo posible que se interrumpa el producto del mRNA. Así también se espera mejorar la eficiencia de ligación, ya que esta fué baja y de esta manera aumentar el número de transformantes, para así mismo aumentar la probabilidad de obtener el gen de lipasa.

6.8 SELECCION DE COLONIAS CON ACTIVIDAD LIPOLITICA.

Antes de que se probaran las colonias transformantes en el medio con aceite, se montó esta técnica probando la actividad lipolítica del hongo, esto es, como un control positivo de actividad, para así conocer también la concentración mínima necesaria de aceite para poder observar con claridad el halo de hidrólisis. De este modo se hicieron varias placas a distintas concentraciones de aceite (0.5, 0.75 y 1%), y se hizo crecer en ellos al hongo. En la figura 12 se observan las placas con el hongo, en donde se pueden notar con facilidad los halos de hidrólisis en todas las condiciones de concentración de aceite; por esto se consideró usar la concentración de 0.5% en donde es fácil ver el halo de hidrólisis, además de que se utiliza una baja concentración de aceite, lo que permite su economía.

Por otro lado, se utilizó este mismo método para verificar que las transformantes tuvieran o no actividad lipolítica. A este respecto hay que mencionar que, se encuentra reportada como concentración de aceite 0.1-0.2%, ya que *E.coli* no secreta enzimas al medio, por lo que una concentración mayor afecta en la capacidad de formación del halo de hidrólisis. Así pues, se preparó medio mínimo con sales M9 suplementado con 0.2% de aceite, así también se le adicionó IPTG para inducir la posible producción de la lipasa, ya que como la clonación se llevó a cabo con cDNA, éste no posee secuencias regulatorias de aquí que se sirva de las que posee el plásmido. Sin embargo, no se observó ningún halo en las colonias, lo cual se confirmó después al hacer la preparación y digestión de los plásmidos en donde se encontró que el tamaño de inserto era muy pequeño como para contener un gen. A pesar de lo anterior esta técnica puede ser utilizada para

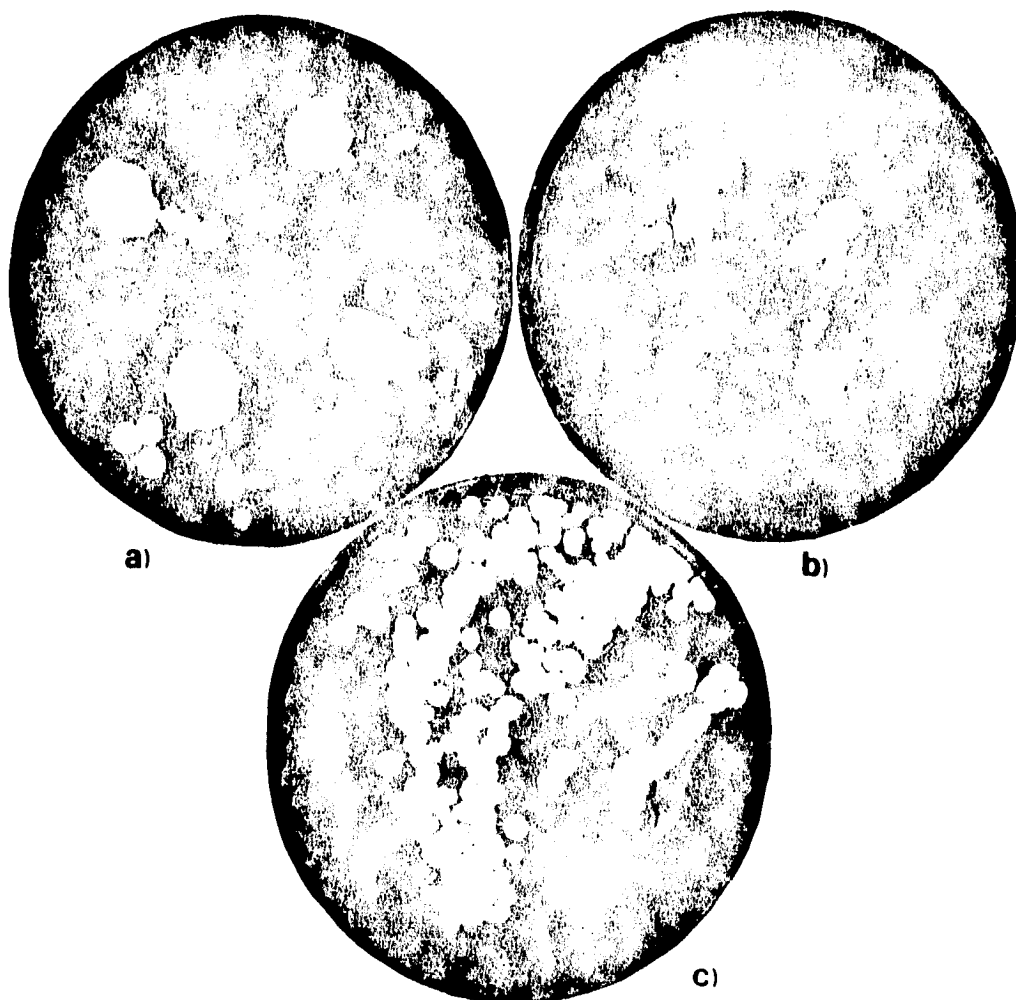


Figura 12. VERIFICACION DE ACTIVIDAD LIPOLITICA DE *P.candidum*, EN PLACAS CON TRIBUTIRINA EMULSIFICADA. El hongo se hizo crecer en medio "D" sin glucosa con: a) 0.5% de aceite, b) 0.75% de aceite y c) 1 % de aceite.

posteriores pruebas de actividad lipolítica de transformantes, ya que ésta es sencilla y relativamente confiable.

VII. CONCLUSIONES

Se planteó la estrategia de clonación del gen de lipasa de *P.candidum* mediante la síntesis de cDNA, tomando en cuenta que el receptor de la información es un organismo procariote, evitándose así el problema con los intrones del material genético del hongo.

El punto de máxima producción de lipasa de *P.candidum* se encontró a las 96 h, este punto se tomó como el momento de máxima expresión del gen de lipasa, es decir el momento en que se encuentra enriquecida la presencia de mRNA proveniente del gen de lipasa, y que por tanto se consideró como el tiempo de cosecha del micelio para el aislamiento del RNA total.

Se estableció una alternativa al uso de nitrógeno líquido para el rompimiento del micelio fungal, utilizando la técnica de preparación de "polvos de acetona", la cual resultó adecuada pues no afecta el estado de los ácidos nucleicos.

En cuanto al método de aislamiento de RNA total, se determinó que la técnica más conveniente es la planteada por Farrell (1990), debido a que permite la rápida obtención del RNA evitando así su degradación.

Se estableció también el método de purificación de RNA poliadenilado, mediante el uso de columna de afinidad de celulosa oligo(dT), en la cual se obtuvo una buena separación que permitió su posterior uso en la síntesis de cDNA.

VII. CONCLUSIONES

Se planteó la estrategia de clonación del gen de lipasa de *P.candidum* mediante la síntesis de cDNA, tomando en cuenta que el receptor de la información es un organismo procarionte, evitándose así el problema con los intrones del material genético del hongo.

El punto de máxima producción de lipasa de *P.candidum* se encontró a las 96 h, este punto se tomó como el momento de máxima expresión del gen de lipasa, es decir el momento en que se encuentra enriquecida la presencia de mRNA proveniente del gen de lipasa, y que por tanto se consideró como el tiempo de cosecha del micelio para el aislamiento del RNA total.

Se estableció una alternativa al uso de nitrógeno líquido para el rompimiento del micelio fungal, utilizando la técnica de preparación de "polvos de acetona", la cual resultó adecuada pues no afecta el estado de los ácidos nucleicos.

En cuanto al método de aislamiento de RNA total, se determinó que la técnica más conveniente es la planteada por Farrell (1990), debido a que permite la rápida obtención del RNA evitando así su degradación.

Se estableció también el método de purificación de RNA poliadenilado, mediante el uso de columna de afinidad de celulosa oligo(dT), en la cual se obtuvo una buena separación que permitió su posterior uso en la síntesis de cDNA.

Se obtuvieron solamente 10 transformantes de cDNA de *P.candidum* y 2 del control neopa del sistema de síntesis de cDNA, debido a que se hizo una ligación del vector (pUC19) y el cDNA con extremos romos, lo cual tiene una eficiencia baja.

Las transformantes poseen insertos muy pequeños, pues no se observaron diferencias significativas entre los plásmidos digeridos con EcoRI y el control pUC19 linearizado.

El tamaño tan pequeño de los insertos de cDNA, se debe probablemente a una baja eficiencia en la síntesis, lo que provocó que ésta se truncara. Esta baja eficiencia se puede deber a la calidad de las enzimas involucradas, así como a las condiciones de reacción. Esto se deduce de que tampoco fue sintetizado adecuadamente el control Neopa del sistema de síntesis, ya que también el tamaño de inserto fue menor de lo que se esperaba.

VIII. APENDICE:

8.1 Antibióticos:

Antibiótico	solución stock	almacenamiento a	concentración final de trabajo
Ampicilina	50 mg/ml en agua	-20°C	60 mg/ml
Carbencilina	50 mg/ml en agua	-20°C	60 mg/ml

8.2 Soluciones:

0.1 M Adenosina trifosfato

Se disuelven 60 mg de ATP en agua. El pH se ajusta a 7.0 con NaOH 0.1 N, después se ajusta el volumen a un mililitro con agua destilada. La solución se coloca en pequeñas alícuotas y se almacena a 70°C bajo cero.

1 M CaCl₂

Se disuelven 54 g de CaCl₂ en 200 ml de agua, esta solución se esteriliza por filtración (poro de 0.22 µm) y se almacena en alícuotas a 20°C bajo cero.

1 M Dítioitreitol (DTT)

Se disuelven 3.09 g de DTT en 20 ml de acetato de sodio 0.01 M (pH 5.2). La solución se esteriliza por filtración y se coloca en alícuotas a 20°C bajo cero.

0.5 M EDTA (pH 8)

Adicionar 186.1 g de etilendiaminotetracetato disódico a 800 ml de agua, mezclando vigorosamente. Se ajustar el pH a 8.0 con NaOH, se coloca en alícuotas y se esteriliza en autoclave.

Bromuro de etidio (10 mg/ml)

Añadir 1 g de bromuro de etidio a 100 ml de agua y se mezcla vigorosamente durante varias horas para asegurarse de que el pigmento se ha disuelto. El contenedor se cubre con papel aluminio o la solución se transfiere a una botella oscura y se almacena a temperatura ambiente.

IPTG (isopropil- β -D-galactósido)

Disolver 2 g de IPTG en 8 ml de agua destilada, ajustando el volumen de la solución a 10 ml con agua destilada y se esteriliza por filtración (poro de membrana 0.22 μ m). La solución se coloca en alícuotas de un mililitro y se almacenan a 20°C bajo cero.

Fenol-cloroformo

Mezclar volúmenes iguales de fenol y cloroformo, la mezcla se equilibra mediante extracciones con Tris 0.1 M (pH 7.6), esto es, hasta que la mezcla tenga un pH de aproximadamente 7.0. Guardar la mezcla con un volumen igual de Tris 0.01 (pH 7.6) a 4°C en botellas oscuras de vidrio.

Acetato de sodio 3 M

Disolver 408.1 g de acetato de sodio en 800 ml de agua. Se ajusta el pH a 5.2 con ácido acético glacial o se ajusta a pH 7.0 con ácido acético glacial diluido. El volumen se ajusta a un litro con agua, se coloca en alícuotas y se esteriliza en autoclave.

NaCl 5M

Disolver 292.2 g de NaCl en 800 ml de agua, se ajusta el volumen a un litro con agua, se coloca en alícuotas y se esteriliza en autoclave.

SDS 10%

Disolver 100 g de dodecil sulfato de sodio en 900 ml de agua, calentando a 68°C para facilitar la disolución. El pH se ajusta a 7.2 adicionando unas cuantas gotas de HCl concentrado y finalmente se ajusta el volumen a un litro con agua.

Tris 1M

Disolver 121.1 g de Tris en 800 ml de agua, ajustando el volumen de la solución a un litro con agua. Se coloca en alícuotas y se esteriliza en autoclave.

X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- -D-galactósido)

Se hace una solución stock disolviendo X-gal en dimetilformamida para hacer una solución 20 mg/ml, cuidando de usar tubos de vidrio o de propileno. El tubo que contiene la solución debe taparse con papel aluminio para evitar el daño con la luz y debe almacenarse a 20°C bajo cero. No es necesario esterilizar las soluciones de X-gal por filtración.

Lisozima

Preparar una solución stock de lisozima a una concentración de 50 mg/ml en agua. Se coloca en alícuotas y se almacena a 20°C bajo cero.

RNAasa

Disolver RNAasa pancreática a una concentración de 10 mg/ml en acetato de sodio 0.01 M (pH 5.2). Se calienta a 100°C durante 15 min. Después se deja que enfríe lentamente a temperatura ambiente. El pH se ajusta adicionando 0.1 volumen de Tris·HCl (pH 7.4), finalmente se hacen alícuotas y se almacenan a 20°C bajo cero.

Buffer:**TE pH 7.4**

10 mM Tris·HCl (pH 7.4)

1 mM EDTA (pH 8.0)

STE

0.1 M NaCl

10 mM Tris·HCl (pH 8.0)

1 mM EDTA (pH 8.0)

Buffer de electroforesis:**TAE**

50 X 242 g Tris

57.1 ml de ácido acético glacial

100 ml EDTA 0.5 M (pH 8.0)

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

IX. BIBLIOGRAFIA:

1. Arbige, M.V.; Freund, P.R.; Silver, C.S.; Zelko, S.T. (1986) Novel lipase for Cheddar cheese flavor development. *Food. Technol.* vol: 91-98.
2. Ausubel, F.M.; Brent, R.; Kingston, R.E.; Moore, D.D.; Seidman, J.G.; Smith, J.A.; Struhl, K. (1993) *Current protocols in molecular biology*. Vol. 1 y 2. Green Publishing Associates and John Wiley & Sons.
3. Bedding, P. and M. John. Cleaning soft contact lens. *Pat. Specif.* (Australia) AU 628, 853 (CIG02C13/00), 19 May 1983, Appl. 79/51, 885, 17 oct. 1979: 16 pp.
4. Berger, M.; Laumen, K.; Schneider, M.P. (1992) Enzymatic esterification of glycerol. I. Lipase-catalyzed synthesis of regioisomerically pure 1,3-sn-diacylglycerols. *J.Am. Oil Chem. Soc.*, 69(10): 955-960.
5. Björkling, F.; Sven, E.G.; Kirk, O. (1991) The future impact of industrial lipases. *Trends in Biotechnol.* 9: 360-363.
6. Boyd, C.A. (1993) Turbo cloning: a fast, efficient method for cloning PCR products and other blunt-ended DNA fragments into plasmids. *Nucleic Acids Research*, 21(4): 817-821.
7. Brown, T.A. (1991) *Essential molecular biology: A practical approach*. Vol. 1, Oxford University Press, N.Y.
8. Bulipeacu, L.; Radu, G.; Iliescu, N. and M. Greucenco. Pharmaceutical for treating intestinal disorders. ROM, Ro 85, 157 (Cl. A61K37/48) 28 feb. 1985, Appl. 108, 660, 21 sep. 1982: 2 pp.
9. Calvo, L. Cosmetics composition containing immobilized enzymes. U.S.A., US 4, 556, 554 (Cl: 424-70, A6 IK7), 3 dec. 1985, Appl. 269, 935, 1 jun. 1981: 5 pp.
10. Celerin, E.M.; Fergus, C. L. (1971) Effects of nutrients, temperature and relative humidity on germination and longevity of the ascospores of *Chaemium thermophile* var. *coprophile*. *Mycologia*, 63: 1030-1045.
11. Chirgwin, J.M.; Przybyla, A.E.; MacDonald, R.J.; Rutter, W.J. (1979) Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochem.*, 18(24): 5294-5299.

12. Crossman, T.L. Use of whey-derived products as cheese flavors agents of enhancers. U.S.A., US 4 500, 549 (Cl. 426-33; A23C21/02), 19 feb. 1985, Appl. 472, 735, 7 mar. 1983: 7 pp.
13. Dartois, V.; Coppée, J.-Y.; Colson, D.; Baulard, A. (1994) Genetic analysis and overexpression of lipolytic activity in *Bacillus subtilis*. Appl. Environ. Microbiol. 60(5): 1670-1673.
14. Derewenda, U.; Brzozowski, A.M.; Lawson, D.M.; Derewenda, Z.S. (1992) Catalysis at the interface: the anatomy of a conformational change in a triglyceride lipase. Biochem., 31: 1532-1541.
15. Diaz, A.A. (1991) Lipasa: Estudios sobre su síntesis en *Penicillium candidum* (tesis de maestría) U.N.A.M., CCH.
16. Dordick, J.S. (1989) Enzymatic catalysis in monophasic solvents. Enzyme Microb. Technol., 11: 194-211.
17. Dziezak, J. (1986) Enzyme modification of dairy products. Food Technol. 44: 114-120.
18. Espinoza, E.; Nurko, E.; Orozco, M.E.; Farrés, A. (1989) Enzimas lipolíticas de origen microbiano: propiedades y usos. Boletín de Educación Bioquímica, 8(1): 3-10.
19. Farrell, R.E. (1990) RNA methodologies: A laboratory guide for isolation and characterization. Academic Press, USA.
20. Feller, G.; Thiry, M.; Arpigny, J.L.; Gerday, C. (1991) Cloning and expression in *Escherichia coli* of three lipase-encoding genes from the psychrotrophic antarctic strain *Moraxella* TA144. Gene, 102: 111-115.
21. Fitzgerald, R.; Nuti, M.; O' Gara, F. (1991) Significance of genetic engineering to food enzymology. Cap. 30 de " Food enzymology", vol. II, Fox, P.F. ed. pp 343 Elsevier Applied Science.
22. Frenken, L.G.; Maarten, R.E.; Batenburg, A.M., Bos, J.W.; Visser, C.; Verrips, T. (1992) cloning of the *Pseudomonas glumae* lipase gene and determination of the active site residues. Appl. Environ. Microbiol., 58(12): 3787-3791.
23. Fuji Oil Co. and Ltd., Cocoa butter substitute. Jpn. Kokai Tokkyo Koho, Jp 81, 163, 196 (Cl. C11C3/10), 15 dec. 1981, Appl. 80/67, 555, 20 may 1980: 6 pp.

24. Gilbert, J.E. (1993) *Pseudomonas* lipases: biochemical properties and molecular cloning. *Enzyme Microb. Technol.* 15: 634-645.
25. Haas, M.J.; Allen, J.; Berka, R.T. (1991) Cloning, expression and characterization of a cDNA encoding a lipase from *Rhizopus delemar*. *Gene*, 109: 107-113.
26. Haas, M.J. (1984) Methods and applications of genetic engineering. *Food technol.*, 38(2): 69-77.
27. Harris, T.J.R. (1983) Expression of eukaryotic genes in *Escherichia coli*, de "Genetic engineering", vol. 4. Williamson, R., de., pp 127-185.
28. Hofelmann, M.; Hartmann, J.; Zink, A.; Schreier, P. (1985) Isolation, purification and characterization of lipase isoenzymes from a technical *Aspergillus niger* enzyme. *J. of Food Sci.*, 50: 1721-1725.
29. Institute for production, development and science. Rice cooking without prior washing. *Jpn. Kokai Tokyko Koho. Jp 60, 38, 047 (85, 58, 047)*, (Cl. A23L1/10), 4 apr 1985, 7 sep 1983: 7 pp.
30. Jaeger, K.E.; Ransac, S.; Dijkstra, B.W.; Colson, C.; Heuvel, V.M.; Misset, O. (1994) Bacterial lipases. *FEMS Microb. Rev.* 15: 129-163.
31. Johnson, L.A.; Ifor, R.B.; MacRae, I.C.; Free, M.L. (1992) Degradation of triglyceride by a *Pseudomonad* isolated from milk: Molecular analysis of a lipase-encoding gene and its expression in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58(5): 1776-1779.
32. Kilara, A. (1985) Enzyme-modified lipid food ingredients. *Process Biochem.* 120: 35-45.
33. Knorr, D.; Sinskey, A.J. (1985) Biotechnology in food production and processing. *Science*, 229: 1224-1229.
34. Kouker, G. ; Jaeger, K. -E. (1987) Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. *Appl. Environ. Microbiol.* 53(1): 211-213.
35. Li, S-J.; Chang, L-H.; Chen, S-M.; Marshall, A:G: (1984) Preparative-scale isolation and purification of procaryotic and eucaryotic ribosomal 5s RNA: *Bacillus subtilis*, *Neurospora crassa*, and wheat germ. *Anal. Biochem.* 138: 465-471.

36. Longhi, S.; Fusetti, F.; Grandori, R.; Lotti, M.; Vanoni, M.; Alberghina, L. (1992) Cloning and nucleotide sequences of two lipase genes from *Candida cylindracea*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1131: 227-232.
37. Lotti, M.; Grandori, R.; Fusetti, F.; Longhi, S.; Brocca, S.; Tramontano, A.; Alberghina, L. (1993) Cloning and analysis of *Candida cylindracea* lipase sequences. *Gene*, 124: 45-55.
38. Lucas, M.C.; Jacobson, J.W.; Giles, N.H. (1977) Characterization and in vitro translation of polyadenylated messenger ribonucleic acid from *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.*, 130(3): 1192-1198.
39. Lupova, L.M.; Fedorova, L.G.; Grebeshova, R.N.; Aleahina, Z.P., Anton, A.G.; Belinekii, A.L. and M.I. Alekseeva. Enzyme-containing detergent for presterilizing treatment of medical instruments. USSR, SU 1 132, 288 (Cl. C11D1/12), 7 jan 1985, Appl. 3,276, 102, 13 may 1982.
40. Macrae, A.R. (1989) The versatility of lipases for industrial uses. *Trends in Biochem. Sci.* 14(4): 125-126.
41. Margolin, A.L.; Klibanov, A.M. (1987) Peptide synthesis catalyzed by lipases in anhydrous organic solvents. *J. Am. Chem. Soc.* 109: 3802-3804.
42. Penz, P.J. Stain remover and methods. Ger. Offen DE 3, 223, 568 (Cl. C11D3/386), 29 dec 1983, Appl. 24 jun 1982: 10 pp.
43. Pérez, C.; Juárez, K.; García-Castells, E.; Soberón, G.; Servín, L. (1993) Cloning, characterization, and expression in *Streptomyces lividans* 66 of an extracellular lipase-encoding gene from *Streptomyces* sp. M11. *Gene*, 123: 109-114.
44. Posorske, L.K. (1984) Industrial scale application of enzymes to the fats and oil industry. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 61(11): 1758-1766.
45. Rigau, J.; Montiel, F. (1991) Construcción de una biblioteca genómica y de cDNA de maíz. Manual del curso de biología molecular de plantas. UNAM, Facultad de Química.
46. Rekhina, N.I., Gorbunov, K.A.; Novikova, M.V.; Abramova, L.S.; Agapoya, S.K. and T.D. Kozubenko. (1984) Production of fish protein preparations and fibrous protein based on them. In: B.Y.K.O.V. Vp edited by Technol. Rybn. Prod. Inst. Mark. Khoz. Okeanog. Moscow, USSR: 71-5.

47. Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual. Second edition, vol. 1,2 y 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Usa.
48. Shigematsu, H.; Moridhita, Y.; Aoyanagi, Y. and Y. Kaburagi. Manufacture of tobacco flavorants from tobacco extracts. Jpn. Kokai Tokyoo Koho Jp 61 67, 469 (8667, 409), (Cl. A24B3/12), 7 apr 1986, Appl. 84/188, 775, 11 sep. 1984: 9 pp.
49. Shimada, Y.; Sugihara, A.; Tominaga, Y.; Iizumi, T.; Tsunasawa, S. (1989) cDNA molecular cloning of *Geotrichum candidum* lipase. J. Biochem., 106: 383-388.
50. Shimada, Y.; Sugihara, A.; Iizumi, T.; Tominaga, Y. (1990) cDNA cloning and characterization of *Geotrichum candidum* lipase II. J. Biochem., 107: 703-707.
51. Schrag, J.D.; Li, Y.; Wu, S.; Cygler, M. (1991) Ser-His-Glu triad forms the catalytic site of the lipase from *Geotrichum candidum*. Nature, 351: 761-764.
52. Slater, R.J. (1988) La expresión de ADN exógeno en *Escherichia coli*, de "Biología molecular y biotecnología", Walker, J.M.; Gingold, E. B., de. pp 40-61. Acríbia ESpaña.
53. Sonnet, P.E. (1988) Lipase selectivities. J. Am. Oil Chem. Soc. 65(6): 900-904.
54. Svensson, I.; Adlercreutz, P.; Mattiasson, B. (1992) Lipase-catalyzed transesterification of phosphatidylcholine at controlled water activity. J. Am. Oil Chem. Soc., 69(10): 986-991.
55. Tan, Y.; Miller, K.J. (1992) Cloning, expression, and nucleotide sequence of a lipase gene from *Pseudomonas fluorescens* B52. Appl. Environ. Microbiol., 58(4): 1402-1407.
56. Teeri, T.T.; Kumar, V.; Lehtovaara, P.; Knowles, J. (1987) Construction of cDNA libraries by blunt-end ligation: high-frequency cloning of long cDNAs from filamentous fungi. Anal. Biochem., 164: 60-67.
57. Tinoco, J.R. (1989) Producción de lipasas microbianas en un sistema de fermentación semisólida. Tesis de licenciatura. UNAM, Facultad de Ciencias.
58. Trommier K.R. Descomposition of clarifier sludge and manure. Ger.(East) DD 149, 057(Cl. C02F11/14), 24 jun 1981, Appl. 212, 681, 7 may 1979: 5 pp.

59. Vernet, T.; Ziomek, E.; Recktenwald, A.; Schrag, J.D.; Montigny, C. de.; Tessier, D.C.; Thomas, D. Y.; Cygler, M. (1993) Cloning and expression of *Geotrichum candidum* lipase II gene in yeast. *J. Biol. Chem.*, 268(35): 26212-26219.
60. Wasserman, B.P. (1988) Food biotechnology. *Food Technol.*, 38(2): 69-77.
61. Yamaguchi, S.; Mase, T. and Takeuchi, K. (1991) Cloning and structure of the mono- and diacylglycerol lipase-encoding gene from *Penicillium camembertii* U-150. *Gene*, 103:61-67.
62. Yoshizumi, H.; Amachi, T.; Kusumi, T.; Tanaka, T. and H. Ishigooka. hair tonic to control dandruff and itching and stimulate hair growth. *Eur.Pat.Appl.*, EP 117,867 (Cl. A61K7/06), 29 aug 1984, JP Appl. 83/14, 556. 2 feb 1983: 29 pp.
63. Zaks, A.; Empie, M.; Gross, A. (1988) Potentially commercial enzymatic processes for the fine and specialty chemical industries. *Trends Biotechnol.*, 6: 272-275.