

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

Proyecto Académico Especialización, Maestría y  
Doctorado en Biotecnología

Facultad de Química

“ESTUDIOS SOBRE LA PRODUCCIÓN DE LIPASA  
EN UNA CEPA SILVESTRE Y UNA MUTANTE  
DESREGULADA A CARBONO  
DE *Rhizopus delemar*”

*T E S I S*  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA  
P R E S E N T A:

ALICIA MARMOLEJO FLORES



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:** Dr. Sergio Sánchez Esquivel

**Vocal:** Dr. Francisco Ruiz Terán

**Secretario:** Dra. Martha Patricia Coello Coutiño

**Suplente:** Dra. Maricarmen Quirasco Baruch

**Suplente:** Dra. Laura Kawasaki Watanabe

El presente trabajo se realizó bajo la dirección de la  
Dra. Amelia Farrés González-Saravia en el laboratorio 312 del  
Departamento de Alimentos y Biotecnología, Conjunto E,  
Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México

Para la realización de este proyecto se contó con la beca de DGAPA,  
la beca otorgada por el CONACYT y el financiamiento del

IFS 1478/3

# **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a las siguientes personas por las facilidades prestadas para la realización de este trabajo:

Al Comité Tutorial integrado por la Dra. Amelia Farrés González-Saravia, el Dr. Sergio Sánchez y el Dr. Jesús Aguirre por sus acertados comentarios y ayuda técnica proporcionada durante el desarrollo del presente trabajo.

A la Dra. Amelia Farrés por su confianza y apoyo en todos estos años.

A todos los miembros del jurado por el tiempo dedicado a la revisión de este documento y las observaciones realizadas al mismo.

Al Dr. Luis Padilla y a Simón Guzmán por su asesoría y valiosa ayuda durante los tiempos difíciles.

# DEDICATORIA

*A*

*M. y E. S.*

# DEDICATORIA

A Dios por haberme dado la madurez y fortaleza para concluir este proyecto.

A mi familia por el cariño, confianza, paciencia y apoyo incondicional que he recibido a lo largo de mi vida.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por darme la oportunidad de forjarme como profesionista, pero sobre todo porque durante mi estancia en ella conocí a personas extraordinarias que me brindan, hasta la fecha su valiosa amistad.

A mis amigos de la Facultad de Ciencias, en especial a Magali Z., Jorge M, Alberto G., Lulú Z., Lulú F. y Lulú B.

Muy especialmente a mis amigos del laboratorio 312 del Conjunto E de la Facultad de Química: Carolina, Paty, Vanessa, Idalia, Maricarmen, Yazmin, Ana María, Lety, Tere F, Jesús, Anel, Mariana, Lilia, Tere R, Maria Luisa por los momentos compartidos...

Al Grupo Notre Dame de Vie por darme la oportunidad de crecer espiritualmente.

Porque sin ustedes este documento no sería una realidad.... Gracias.

***Lo que conseguimos con demasiada facilidad nunca  
es objeto de gran estimación. Sólo lo que nos  
cuesta obtener otorga valor a las cosas.***

***Thomas Paine***



# ÍNDICE

Contenido	Página
<b>Resumen</b>	1
1 <b>Introducción</b>	2
2 <b>Generalidades</b>	4
2.1 Las lipasas	4
2.2 <i>El género Rhizopus</i>	8
2.3 Enzimas producidas por <i>Rhizopus</i> : Lipasas	9
2.4 Enzimas producidas por <i>Rhizopus</i> : Proteasas	12
2.5 Sistemas de clonación en <i>A. nidulans</i>	13
3 <b>Antecedentes</b>	14
4 <b>Objetivos</b>	16
5 <b>Materiales y Métodos</b>	17
5.1 Cinética de producción de las lipasas de <i>R. delemar</i> WT y M2	17
5.1.1 Determinación de actividad lipolítica	17
5.1.2 Determinación de biomasa	17
5.1.3 Cuantificación de proteína extracelular	18
5.2 Determinación del perfil electroforético de las proteínas extracelulares	18
5.3 Determinación de glicosilación de las proteínas extracelulares	18
5.4 Modificación de sustratos lácteos con extractos enzimáticos de <i>R. delemar</i> WT y M2	19
5.4.1 Obtención de los perfiles de ácidos grasos libres (AGL) de los sustratos lácteos modificados	19
5.4.2 Determinación de amoniaco de los sustratos lácteos modificados	20
5.5 Determinación de actividad proteolítica	21
5.6 Aislamiento y comparación de los genes de lipasa de <i>R. delemar</i> WT y M2	21
5.6.1 Extracción de DNA fungal	21
5.6.2 Amplificación del gene de lipasa de <i>R. delemar</i>	23
5.6.3 Secuenciación de productos de PCR y análisis	24
5.6.4 Amplificación del gene de lipasa de <i>R. delemar</i> con región promotora	24
5.7 Evaluación de <i>A. nidulans</i> como hospedero	26
5.7.1 Actividad lipolítica en medio líquido	26
5.7.2 Actividad lipolítica en medio sólido	26
5.7.3 Hibridación de DNA genómico de <i>A. nidulans</i> con sonda específica para el gene de lipasa de <i>R. delemar</i>	27
5.8 Clonación de los genes de lipasa de <i>R. delemar</i> WT y M2 en <i>A. nidulans</i>	28
5.8.1 Selección de plásmidos para <i>A. nidulans</i>	28
5.8.1.1 Plásmido de replicación autónoma pDHG25	28
5.8.1.2 Plásmidos integrativos	28
5.8.2 Construcción de los plásmidos recombinantes	30
5.8.3 Transformación genética de <i>A. nidulans</i>	31
6 <b>Resultados y Discusión</b>	32
6.1 Cinética de fermentación de <i>R. delemar</i> WT con diferentes fuentes de carbono	32
6.2 Cinética de fermentación de <i>R. delemar</i> M2 con diferentes fuentes de carbono	35
6.3 Actividad proteolítica	38
6.4 Perfil electroforético de las proteínas extracelulares	39
6.5 Patrón de glicosilación de las proteínas extracelulares	41
6.6 Perfil de AGL de los sustratos lácteos modificados	42
6.7 Contenido de amoniaco de los sustratos lácteos modificados	47
6.8 Análisis de los genes de lipasa de <i>R. delemar</i> obtenidos por PCR	48
6.9 Plásmidos recombinantes	55

6.10	<i>A. nidulans</i> como hospedero	56
6.11	Transformación genética de <i>A. nidulans</i>	58
7	<b>Conclusiones</b>	60
8	<b>Recomendaciones</b>	62
9	<b>Referencias</b>	63
	Apéndice 1 Cepas y medios de cultivo	72
	<i>Rhizopus delemar</i>	72
	<i>Aspergillus nidulans</i>	74
	<i>Escherichia. coli</i>	77
	Apéndice 2 Determinación de actividad lipolítica	78
	Apéndice 3 Determinación de actividad proteolítica	80
	Apéndice 4 Protocolos de transformación genética	81
	Apéndice 5 Clasificación de lipasas	87

# RESUMEN

Las lipasas fungales se aplican en una gran variedad de campos biotecnológicos, entre los que destacan la industria de alimentos y lácteos. El grupo de trabajo ha explorado la producción de lipasas de hongos filamentosos y su aplicación en el área de producción de sabores.

En la búsqueda de mejorar los niveles de producción se ha planteado la obtención de mutantes desreguladas a carbono. El presente trabajo describe la diferencia en el comportamiento de producción así como la caracterización de las lipasas producidas por la cepa silvestre de *R. delemar* y la mutante M2 desregulada a carbono. Análisis de sustratos lácteos modificados con dichas enzimas muestran perfiles de ácidos grasos y sabores distintos entre la cepa silvestre y la mutante. Estas diferencias entre la especificidad de las lipasas sugieren que la cepa M2 sufrió una mutación en el gen estructural de la lipasa. Se aislaron los genes que codifican para la lipasa de ambas cepas por medio de PCR, el análisis de ambas secuencias obtenidas indica que no hay diferencia entre ellas, por lo que las diferencias en comportamiento deben explicarse a otros niveles

# INTRODUCCIÓN

## 1

Los hongos son un grupo diverso de organismos que presentan actividades biológicas que pueden ser tanto benéficas como perjudiciales para el hombre. Entre las primeras podemos destacar su importancia en la medicina, principalmente en la producción de antibióticos como la penicilina y la cefalosporina. Los hongos también son usados como alimento por si mismos, por ejemplo los champiñones, o son usados en la producción de sabores y aditivos alimenticios, así como en la producción de diferentes comidas y bebidas fermentadas. En contraste, algunas especies sintetizan y secretan metabolitos altamente tóxicos, como las aflatoxinas, otros causan infecciones, intoxicaciones y alergias. Anualmente, se atribuyen pérdidas millonarias de cosechas a especies de hongos filamentosos parásitas de cultivos y de granos almacenados.

Un factor importante del éxito biológico de los hongos filamentosos es su extraordinaria diversidad metabólica. Los hongos pueden secretar una amplia gama de enzimas diferentes, con las cuales degrada compuestos orgánicos que le sirven como fuente de nutrientes, lo que les ha permitido su adaptación y la explotación de ambientes inhóspitos para otros organismos. Lo anterior, ha provocado un interés creciente en el estudio y uso de los hongos filamentosos tanto en procesos industriales como en el laboratorio.

Actualmente, los hongos filamentosos son la fuente del 40% de las enzimas disponibles en el mercado mundial (106). Las enzimas fungales que se utilizan con mayor frecuencia catalizan la hidrólisis de polímeros vegetales tales como almidones, celulosa, hemicelulosa y pectinas. Las proteasas y lipasas son también un grupo importante de enzimas fungales que tienen múltiples aplicaciones en la industria alimentaria, química y farmacéutica entre otras (27, 78, 96).

Las lipasas fungales han sido estudiadas y explotadas desde los años 50's por muchos factores, entre los que destacan su bajo costo de extracción ya que son enzimas secretadas al medio de cultivo, a la estabilidad que presentan a ciertas temperaturas y pH's, la especificidad de sustrato y actividad en solventes orgánicos. En años recientes se han realizado estudios usando técnicas de biología molecular dirigidos a la explotación de hongos filamentosos como hospederos para la producción

de enzimas homólogas y heterólogas involucradas en diferentes procesos y aplicaciones. Una parte importante de la investigación en el área se lleva a cabo en empresas como Eli Lilly, Allelix y Novo, lo que limita la disponibilidad de información sobre procedimientos, cepas y vectores. Se debe señalar que no existe una gran variedad de los mismos debido a que los principales marcadores empleados complementan auxotrofías o confieren resistencia a antibióticos poco usuales. No obstante, existen plásmidos y cósmidos que son funcionales tanto en *E. coli* como en algunos de los hongos, lo que facilita el establecimiento de bancos genéticos.

Entre los sistemas de clonación-expresión que se han desarrollado, destaca el género *Aspergillus*. Actualmente, existe una amplia lista donde el género *Aspergillus* ha sido usado para producir proteínas recombinantes, algunas de las cuales ya se encuentran en el mercado, como la renina de ternera. Otras proteínas heterólogas son derivadas de genes fungales y de origen humano, en ambos casos se tienen aplicaciones farmacéuticas (9, 67).

# GENERALIDADES

## 2

### 2.1 Las lipasas

Las lipasas (triacilglicerol éster hidrolasas E.C. 3.1.1.3) son enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces éster de triacilglicéridos en diacilglicéridos, monoacilglicéridos, glicerol y ácidos grasos libres, ver Figura 2.1.

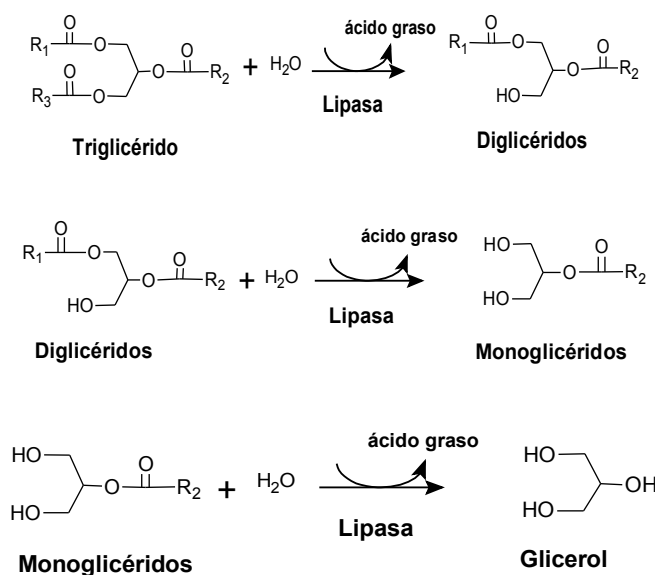


Figura 2.1. Reacción catalizada por lipasas (75, 10).

La actividad máxima de las lipasas se presenta cuando el sustrato insoluble en agua se encuentra emulsificado y la enzima es adsorbida en la interfase agua-aceite, esta propiedad es conocida como activación interfacial. La cantidad de aceite disponible en la interfase determina la actividad de las lipasas, sin embargo, al mismo tiempo dificulta el análisis del ensayo y la cinética de la reacción. El área de interfase puede incrementarse substancialmente al límite de saturación por el uso de emulsificantes, así como por la agitación del sistema. Bajo ciertas condiciones experimentales, tales como ausencia de agua, las lipasas son capaces de revertir la reacción. La reacción reversa conduce a la esterificación y formación de glicéridos a partir de ácidos grasos y glicerol. Dependiendo

del sustrato utilizado para la reacción de síntesis, se pueden llevar a cabo las siguientes reacciones:

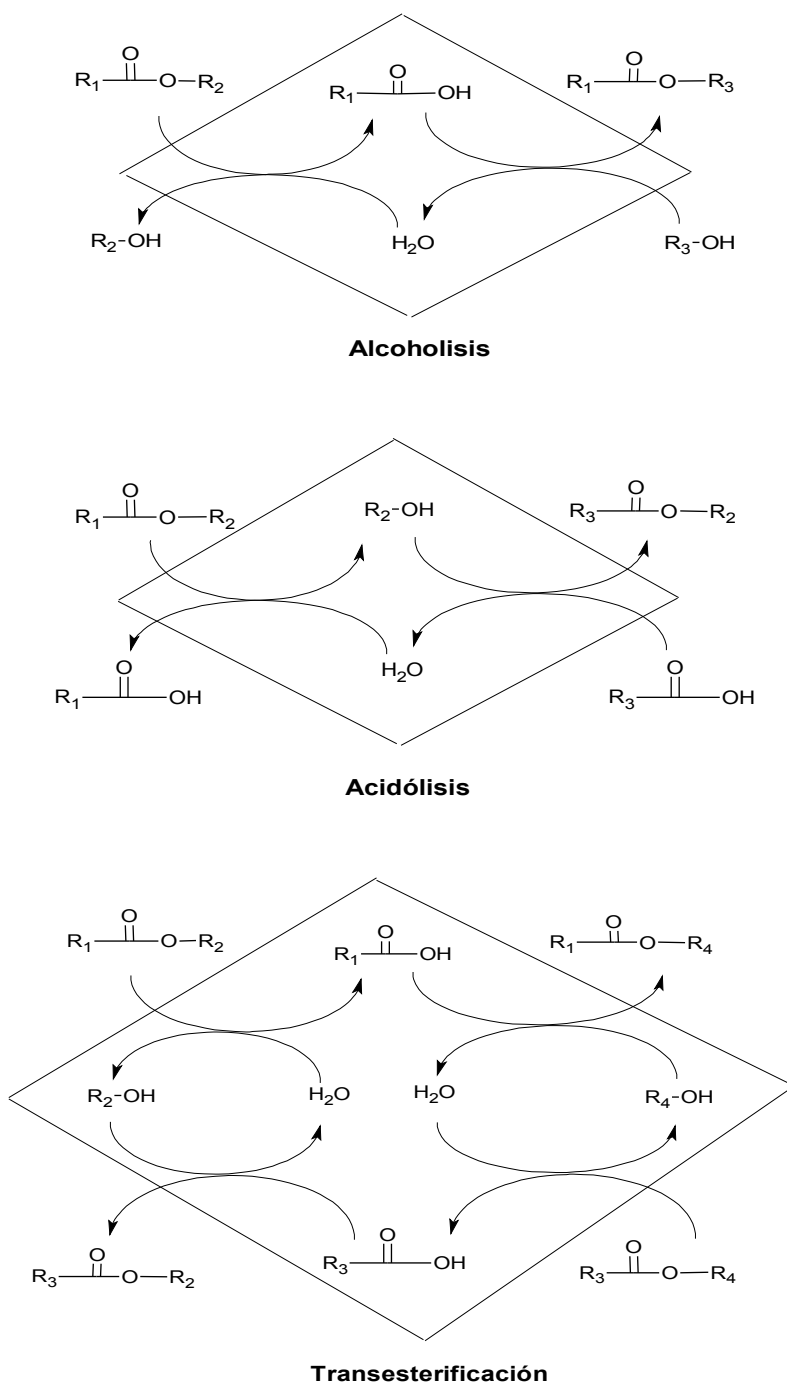


Figura 2.2. Reacciones catalizadas por lipasas. R (i= 1, 2, 3, 4) representa la cadena de hidrocarburo del ácido graso (65, 77, 94).

Acidólisis: Consiste en el intercambio de un grupo acilo de un éster con otro grupo acilo proporcionado por un ácido carboxílico. Ejemplo: refinación del aceite de sardina por acidólisis catalizada por la lipasa de *Pseudomonas*.

Alcohólisis: Consiste en el intercambio de un grupo acilo de un éster con otro grupo acilo proporcionado por un alcohol. Ejemplo: refinación del aceite de hígado de bacalao por alcohólisis catalizada por la lipasa de *Pseudomonas*.

Transesterificación: Consiste en el intercambio de dos grupos acilo entre dos ésteres. Ejemplo: transesterificación de triglicéridos de aceites de palma o girasol los cuales presentan un alto contenido de ácido oleico y esteárico para obtener derivados de grasa de cacao utilizando la lipasa de *Rhizomucor miehei* o *Rhizopus* (94). Ver Figura 2.2

Las lipasas se separan en tres grupos de acuerdo a la especificidad. En el primer grupo se encuentran las lipasas que tienen especificidad por la longitud e insaturación de los ácidos grasos. Algunas lipasas tienen afinidad por los ácidos grasos de cadena corta (ácido acético, butírico, cáprico, caproico, caprílico, etc), otras tienen preferencia por los ácidos grasos insaturados (oleico, linoleico, linoléico, etc). Ejemplo: *Aspergillus niger* tiene preferencia por los ácidos grasos C10 y C12 o C18:1 *cis*-9, *Geotrichum candidum* presenta especificidad por ácidos grasos de cadena larga con doble enlace *cis* en la posición C9.

Las denominadas “no específicas” que hidrolizan al azar los ácidos grasos de los triglicéridos, sin importar la posición del grupo acilo en la molécula de glicerol, la longitud ni saturación de las cadenas de ácidos grasos. Estas lipasas pueden hidrolizar totalmente el sustrato. Ejemplo: *G. candidum*, *Oospora lactis*, *Humicola lanuginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium acnes*, *Candida rugosa*.

El tercer grupo de lipasas presentan especificidad con respecto a la posición de los ácidos grasos en la molécula de glicerol. Algunas atacan los enlaces éster de ácidos grasos de la posición 1 ó 3 de la molécula de glicerol o ambas posiciones, pero no así el ácido graso de la posición 2. Sin embargo, el monoglicérido sufre un rearrreglo, en el cual el ácido graso de la posición 2 migra al azar a las posiciones 1 ó 3 de la molécula de glicerol; como la migración acilo es un proceso lento y las lipasas no actúan sobre los ésteres de



los glicerol 2-monoácidos grasos, la hidrólisis disminuye drásticamente hasta que la migración acilo se completa para que la lipasa ataque al monoglicérido en la posición 1 ó 3. Ejemplo: *Rhizopus oryzae*, *R. arrhizus*, *R. delemar*, *R. niveus*, *Mucor javanicus* *Rhizomucor miehei*, *A. niger* (85).

La masa molecular de las lipasas varía de 19 a 60 KDa (47); muchas presentan glicosilación y contienen de 2 a 15% de carbohidratos, el residuo más abundante es generalmente manosa (65).

Aunque las lipasas pertenecen a familias de proteínas muy diferentes que no presentan similitud de secuencias, se caracterizan por poseer la misma arquitectura: la hoja  $\alpha/\beta$ -hidrolasa, sitio activo conservado, el motivo  $GX_1SX_2G$  (donde X representa cualquier aminoácido). Todas presentan la misma maquinaria catalítica, la cual consiste de una triada catalítica (serina-histidina-ácido aspártico o glutámico) y el agujero oxianión, formado por un esqueleto de amidas de dos residuos conservados. Otras enzimas con la misma hoja y maquinaria catalítica son esterasas (E.C.3.1.1), como las acetilcolinesterasas (E.C.3.1.1.7), cutinasas (E.C.3.1.1.74), carboxilesterasas (E.C.3.1.1.1), arilesterasas (E.C.3.1.1.2), fosfolipasas  $A_1$  (E.C. 3.1.1.32), colinesterasas (E.C.3.1.1.8), las esterasas de hormona-juvenil (E.C.3.1.1.59), así como las tioesterasas (E.C.3.1.2.14) y las no-hemo peroxidasas (E.C. 1.11.1.10) (18).

Las lipasas son aplicadas en una gran variedad de campos biotecnológicos. En la industria alimentaria, los productos de la hidrólisis o modificación de triacilglicerol por lipasas generan aromas que son usados como saborizantes en muchos productos. Un ejemplo de ello es la modificación de sabor de productos lácteos para generar sabores más intensos en productos como crema, aderezos de ensaladas, margarina o quesos madurados como Roquefort, Italiano, Azul, Cheddar, Provolone, Romano, Mozzarella. También se lleva a cabo de manera comercial la modificación de aceite de palma y ácido esteárico para la elaboración de mantequilla de cacao empleando Lipozyme™, la cual es la lipasa inmovilizada de *Rhizomucor miehei* (105, 47).

Las lipasas tienen varias aplicaciones en la industria química. Se utilizan en la formulación de detergentes (Lipolase™), cosméticos, agroquímicos (insecticidas, pesticidas);

oleoquímicos (hidrólisis de grasas y aceites, modificación de grasas, síntesis de biosurfactantes); biocombustibles y para síntesis de productos de cuidado personal (47).

En el área de síntesis orgánica la naturaleza enantioselectiva y regioselectiva de las lipasas han sido utilizadas para la resolución de drogas quirales y para síntesis de farmacéuticos (naproxeno, ibuprofeno); etc (78).

Las razones del enorme potencial biotecnológico de las lipasas se deben a que:

- (a) son activas y estables en sistemas acuosos y no acuosos (solventes orgánicos)
- (b) no requieren de cofactores
- (c) poseen una amplia especificidad de sustratos
- (d) exhiben alta enantioselectividad
- (e) algunas presentan pH's óptimos y/o termoestabilidad en condiciones extremas (47).

Las lipasas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza. Entre las lipasas de origen vegetal, animal y microbiano, son estas últimas las que han tenido una mayor aplicación debido principalmente a que los microorganismos se cultivan fácilmente.

Las lipasas fungales presentan estabilidad a la temperatura y pH, especificidad de sustrato y actividad en solventes orgánicos, cuentan con la ventaja adicional de que son extracelulares, reduciendo el costo de extracción. Los principales hongos productores de lipasas comerciales son *Aspergillus niger*, *Candida cylindracea*, *Humicola lanuginosa*, *Mucor miehei*, varias especies del género *Rhizopus* como *R. arrhizus*, *R. delemar*, *R. japonicus*, *R. niveus* y *R. oryzae* (96).

## **2.2 El género *Rhizopus***

El género *Rhizopus* es un hongo filamentoso saprofito perteneciente al orden de los Mucorales, subdivisión Zigomicotina. A los Mucorales se les conoce por su capacidad para degradar sustratos complejos, tales como polisacáridos, lo que les permite colonizar diversos ambientes y utilizar rápidamente nutrientes antes que otros hongos. Esta característica es aprovechada para la producción de alimentos y bebidas fermentadas en el sureste de Asia y China. Un ejemplo es el "Tempe", el cual es una comida indonesia

obtenida a partir de la fermentación de la soya por *R. oligosporus*. En China se produce vino de arroz denominado "Sake" utilizando cultivos puros de *R. oryzae*, otra bebida fermentada es el "Sufu", para su elaboración se utiliza *R. chinensis* (28). *R. delemar* ha sido utilizado en el proceso para la producción de alcohol a partir de almidón (36).

### 2.3 Enzimas producidas por *Rhizopus*: Lipasas

Se han reportado para el género *Rhizopus* la producción de lipasas extracelulares por las siguientes especies: *R. arrhizus*, *R. chinensis*, *R. delemar*, *R. javanicus*, *R. microsporus*, *R. niveus*, *R. nodosus*, *R. oligosporus*, *R. nigricans* y *R. oryzae* (28, 78). Sin embargo, como se puede apreciar en la Tabla 2.1 la información publicada en algunos casos se limita a la masa molecular de la o las enzimas reportadas para cada especie.

Tabla 2.1. Características de las lipasas del género *Rhizopus* reportadas en la literatura.

Especie	Lipasa	KDa	Temp. óptima	Estabilidad a la Temp.	pH óptimo	Estabilidad al pH	pI	Referencia
<i>R. delemar</i>	A	---	30°C	65°C	5.5	3.0-8.0	---	Iwai, 1974 <sup>1</sup>
	B	---	35-40°C	45-50°C	5.6	4.0-7.0	---	
	C	---	35°C	45°C	5.6	4.0-7.0	---	
<i>R. delemar</i>		29 30.3	30°C	25-38°C	8-8.5	7.3-9.1	8.6	Haas, 1991 <sup>2</sup>
<i>R. niveus</i>		34						Kugimiya, et al, 1992
<i>R. delemar</i>							7.3	Shimada, 1988
<i>R. niveus</i>	I	34						Kohno, et al., 1994
	II	30						

1. Condiciones de cultivo: 96 h, 27°C, 110 rpm. Condiciones de ensayo de temperatura óptima: 60 min. Estabilidad a la temperatura: pH 5.6, 15 min.
2. Condiciones de cultivo: 36h, 30°C, 150 rpm. Estabilidad a la temperatura: 15 min.

Las lipasas del género *Rhizopus* contienen la región altamente conservada de las lipasas representada por los aminoácidos GLY-HIS-SER-LEU-GLY. Estudios sobre especificidad indican que hidrolizan triacilgliceroles preferencialmente en las posiciones 1 y 3 del glicerol (85).

Son sintetizadas como un gran precursor, la preproenzima que contiene 392 aa, la cual comprende una secuencia señal de 26 aa; una prosequencia de 97 aa y la lipasa madura de 269 aa. La proenzima (39 KDa) es completamente activa (28), y es cortada por proteólisis *in vivo* para dar la forma madura (29 KDa). Se tienen evidencias de que la prosequencia está involucrada en el correcto plegamiento por la existencia de un solo

residuo de cisteína y que la lipasa madura contiene dos sitios potenciales de glicosilación en Asn96 y Asn169.

*R. niveus* secreta dos lipasas: la lipasa I consiste de dos cadenas polipeptídicas, un péptido pequeño con una cadena de polisacárido (cadena A) y un péptido mayor con un peso molecular de 34 KDa (cadena B). La lipasa II es una cadena polipeptídica que tiene un peso molecular de 30 KDa. La lipasa I es convertida en lipasa II por una proteasa extracelular (55). Esto sugiere que el producto primario de traducción puede llevar a diferentes formas de lipasa debido al procesamiento proteolítico. Las diferentes propiedades de las lipasas del género *Rhizopus*, por ejemplo: temperatura y pH óptimos, así como la termoestabilidad descritos en la literatura no son consecuencia de genes diferentes sino a cortes postraduccionales de las enzimas (6).

Salah (87) realizó un inmunoblot con anticuerpos policlonales anti-ROL (lipasa de *Rhizopus oryzae*) con lipasas del mismo género y lipasas de *Geotrichum candidum*, *Candida*, *Penicillium*, *Pseudomonas* y *Chromobacterium*. Sólo las lipasas de *Rhizopus arrhizus*, *R. delemar* y *R. niveus* presentaron reacción inmunológica cruzada con el anti-ROL.

Estudios fisiológicos muestran que la síntesis de lipasa en *R. delemar* está sujeta a represión catabólica por glucosa (32). Se midió la actividad lipolítica en tres fuentes de carbono: glicerol, glucosa y aceite de oliva, encontrando la máxima actividad con glicerol, sobre glucosa y aceite de oliva. En el medio con glucosa la actividad lipolítica no aparece hasta que se consume este azúcar. Adicionalmente se encontró que las diferencias en la actividad lipolítica entre el glicerol y la glucosa no se debieron a la inactivación de la lipasa por el pH.

Las lipasas del género *Rhizopus* también se han explotado industrialmente en distintos procesos industriales, en la Tabla 2.2 se muestra el número de publicaciones encontradas en la base de datos de la Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos (<http://www.uspto.gov/patft/index.htm>). Se puede observar que la gama de aplicaciones es muy diversa, por lo que todos los esfuerzos encaminados a la mejora en sus condiciones de producción y a la mejor caracterización de la misma adquieren importancia, sobretodo en el área de alimentos para generación de sabores.

Tabla 2.2. Patentes otorgadas hasta septiembre del 2007 que involucran a lipasas del género *Rhizopus*

No. Patentes USPTO	Subclase CIP	Área
2	C02F	Tratamiento de aguas residuales
4	C14C	Tratamiento químico de pieles o cueros. Ej. Curtido
9	C12S	Procedimientos que utilizan enzimas o microorganismos para liberar, separar, o purificar un compuesto o composición preexistentes
16	C11C	Obtención de ácidos grasos a partir de aceites o ceras
57	C12Q	Cuantificación, investigación o análisis en los que intervienen enzimas o microorganismos
54	C11D	Composiciones de detergentes
291	C12N	Microorganismos o enzimas. Composiciones que las contienen
270	C12P	Procesos de fermentación o procesos que utilizan enzimas para síntesis o separación de muestras racémicas
429	Varias	Alimentos y comestibles

Nota: En la columna de Área se indica el rubro de las mismas según la Clasificación Internacional de Patentes, IPC por sus siglas en inglés. [http://www.wipo.int/classifications/fulltext/new\\_ipc/index.htm](http://www.wipo.int/classifications/fulltext/new_ipc/index.htm).

Los genes de lipasas del género *Rhizopus* también han sido clonados, secuenciados y expresados en varios organismos.

Las secuencias de los genes de lipasas de *Rhizopus delemar*, *R. niveus*, *R. javanicus* y *R. oryzae* tienen secuencias de aminoácidos idénticas en lo que respecta a la secuencia codificadora, la cual comprende las regiones del péptido señal, prolipasa y enzima madura. La secuencia codificadora tiene un contenido de GC de 45% y presenta aproximadamente el 60% de homología con la lipasa de *Rhizomucor miehei* (28, 60).

Los genes de lipasa del género *Rhizopus* aislados con regiones reguladoras comprenden la caja TATAAA y la secuencia CAAT, la cual representa el elemento del promotor que es usado en eucariontes superiores así como también en hongos filamentosos.

Existen varios reportes de clonación y expresión en sistemas heterólogos de los genes de lipasa, por ejemplo la lipasa de *R. oryzae* (ROL) fue clonada y expresada en *E. coli*,

aunque el producto fue inactivo e insoluble (30, 6). El cDNA que codifica para la lipasa de *R. niveus* fue clonado y expresado en *E. coli* como una proteína de fusión con *LacZ* (60). Takahashi (99) utilizó el sistema de expresión de *Saccharomyces cerevisiae* para clonar la ROL madura junto con la prosequencia en *trans*. Los resultados obtenidos indican que la prosequencia de ROL ayuda al correcto plegamiento de la enzima madura así como a la subsecuente secreción de las células de levadura.

Se desarrolló para las lipasas de *R. niveus*, un sistema de expresión eficiente usando la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* ND-12B y un plásmido multicopia; se observó que la estructura primaria fue la misma que la proteína nativa y presentó un correcto plegamiento, la diferencia consistió en el contenido de manosa (57).

Se utilizó la levadura *Pichia pastoris* para expresar y secretar la ROL bajo el promotor de la alcohol oxidasa *PAOX1*, se optimizó también la producción de alto nivel de la enzima. Sin embargo, su expresión fue afectada negativamente por la velocidad de asimilación del metanol (68, 69). En otro estudio el gene de lipasa de *Rhizopus oryzae* fue expresado en *Pichia pastoris* bajo el control del promotor de la formaldehído deshidrogenasa *PFLD1* de este organismo. Se compararon los niveles de expresión y secreción bajo diferentes condiciones de inducción de fuente de carbono y nitrógeno bajo el control de *PFLD1* y el promotor de la alcohol oxidasa *PAOX1*. Los resultados indican que el promotor *PFLD1* es tan eficiente como el *PAOX1* para la expresión extracelular de proteínas heterólogas (86).

#### **2.4 Enzimas producidas por *Rhizopus*: Proteasas**

Otra de las enzimas importantes secretadas por el género *Rhizopus* son las proteasas, pero a diferencia de otras enzimas, su producción es mayor en fermentaciones en estado sólido (34, 1, 102). A este respecto, se ha reportado que *R. oligosporum* produce una proteasa ácida, la mayor actividad enzimática se obtuvo entre las 72 y 96 horas de fermentación en salvado de trigo con un contenido de humedad del 50% a 25°C (Wang, 1974). Subramanian (98) realizó un estudio comparativo de difracción de rayos X de las proteasas ácidas de *Rhizopus chinensis* y *Endotia parasítica*. Los resultados muestran que ambas enzimas son bilobuladas y que tienen una gran hendidura entre los lóbulos, en la cual, se encuentra el sitio activo involucrando al residuo Asp35 situado en un asa en la base de la hendidura y adyacente a esta, pero en el otro lóbulo, el residuo Asp215. Dichas

enzimas presentan otras características en común, como el peso molecular alrededor de 35 KDa, un pH óptimo en el rango de 1.5 a 5.0. Son inhibidas por compuestos epoxy, compuestos diazonium en presencia de iones  $\text{Cu}^{2+}$  y por el oligopéptido microbiano pepstatina, un inhibidor específico de proteasas ácidas obtenido de filtrados de cultivos de *Streptomyces*.

## **2.5 Sistemas de clonación en *A. nidulans***

Los hongos filamentosos se han explotado extensamente para la producción homóloga y heteróloga de proteínas debido a la alta capacidad de secreción. Los primeros estudios de transformación de *A. nidulans* se llevaron a cabo con los plásmidos que contienen el gene *pyr4* de *Neurospora crassa*, los genes *amdS*, *trpC* y *argB* de *A. nidulans* (4, 100, 107). Recientemente se han clonado y sobreproducido varios genes, uno de ellos es el gen que codifica para una tirosinasa del hongo *Pycnoporus sanguineus* en *A. niger* bajo el control del promotor constitutivo fuerte de la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa y la preprosecuencia de la glucoamilasa como péptido señal (33). Sin embargo, la producción de proteínas homólogas y heterólogas es frecuentemente limitada por la expresión de altos niveles de proteasas. Para reducir la actividad proteolítica y mejorar considerablemente el rendimiento del producto, se han llevado a cabo técnicas de mutagénesis clásica y técnicas de interrupción de genes. Adicionalmente, se utilizan promotores eficientes para permitir la expresión bajo condiciones que reprimen la expresión de proteasas; se realizan técnicas de fusión de genes para mejorar la producción de proteínas heterólogas y se ha realizado la expresión de proteínas heterólogas con un alto rendimiento en cultivos en estado sólido (45).

# ANTECEDENTES

## 3

El presente trabajo forma parte de una línea de investigación en la producción de lipasas fungales y el modelo específico del mismo es *R. delemar*, el cual fue seleccionado entre una veintena de hongos filamentosos empleados en diversos procesos de producción de enzimas por el sabor que confería a sustratos lácteos modificados con su lipasa. El proyecto general pretende analizar la producción de enzimas lipolíticas de este hongo filamentoso abarcando aspectos fisiológicos y genéticos, tanto por técnicas clásicas como por técnicas moleculares.

Los estudios fisiológicos muestran que la lipasa de *R. delemar* es una enzima constitutiva, sin embargo, presenta variabilidad en cuanto a su producción. El peso molecular de la lipasa encontrado fue de 45 KDa. La producción de la enzima también se ve afectada por el fenómeno de represión catabólica por glucosa al 4% (52, 15). Peralta (81) obtuvo y caracterizó mutantes de *R. delemar* hiperproductoras de lipasa e insensibles al efecto negativo de la glucosa. Miralles (70) evaluó el comportamiento de las lipasas producidas por la cepa silvestre y dos de las mutantes obtenidas por Peralta (M1 y M2). La cepa silvestre presentó represión catabólica cuando crece en un medio con glucosa al 4%. La cepa M2 presentó un fenotipo más estable con respecto a la hiperproducción de lipasa así como su insensibilidad al efecto negativo de la glucosa, mientras que la mutante M1 perdió ambas características. Para revertir la represión catabólica de la cepa silvestre se adicionó AMPc y su análogo no natural (dibutiril-AMPc) al medio de cultivo con glucosa al 4%. Se presentó un efecto positivo con AMPc 100  $\mu$ M, en cambio con 10  $\mu$ M, la actividad lipolítica disminuyó un 30% con respecto al control. El dibutiril-AMPc en ambas concentraciones 10  $\mu$ M y 100  $\mu$ M, aumenta la actividad lipolítica en más del 50% con respecto a la cepa silvestre. Por otro lado, se encontraron sabores desagradables en los productos lácteos modificados con la enzima obtenida de la cepa mutante, sin explorar detalladamente las causas. Por tanto, en este trabajo se pretende abundar en las diferencias entre las propiedades de la enzima y genes provenientes de la cepa silvestre y de la mutante M2.



Con el fin de contar con un sistema de producción bien caracterizado molecularmente, se planteó la posibilidad de la producción heteróloga de esta lipasa, utilizando como sistema de expresión el hongo *A. nidulans*. Existen colecciones importantes de mutantes del mismo y ha sido usado para producir proteínas recombinantes derivadas de genes fungales y de otros organismos. Sin embargo, hasta muy recientemente se han identificado genes de lipasa en *A. nidulans* cuyas propiedades difieren de las de la cepa PW1 manejada en nuestro grupo de trabajo. Por tanto, en este trabajo se pretende explorar la posibilidad de emplearla como hospedera de una lipasa heteróloga. Como primer paso, se pretendía introducir el gene de lipasa a una cepa no productora de la misma, con el fin de facilitar el reconocimiento de las colonias recombinantes. Sin embargo, no existen cepas disponibles que carezcan de esta enzima, por lo que dentro del grupo de trabajo se obtuvo una mutante deficiente en la producción de lipasa (79). Esta conserva los requerimientos de la cepa PW1, de la cual se originó, por ejemplo la auxotrofia a arginina, marcador ampliamente utilizado en sistemas de clonación para hongos filamentosos. Con base en los antecedentes anteriores y a las cepas mutantes obtenidas dentro del grupo de trabajo, se plantearon los siguientes objetivos:

# OBJETIVOS

## 4

### OBJETIVO GENERAL

Caracterizar las lipasas de *Rhizopus delemar* CDB H313 y de la mutante M2, desregulada a glucosa; aislar y clonar los genes que codifican para estas enzimas en *Aspergillus nidulans*.

### OBJETIVOS PARTICULARES

1. Caracterizar las lipasas producidas por la cepa silvestre y la mutante M2 de *R. delemar* en términos de actividad enzimática, peso molecular y glicosilación.
2. Modificar sustratos lácteos con los extractos enzimáticos de la cepa silvestre y mutante M2 de *R. delemar* y caracterizar los productos modificados obtenidos.
3. Aislar y comparar los genes de las lipasas de la cepa silvestre y la mutante M2 de *R. delemar*.
4. Evaluar las características de *A. nidulans* como organismo hospedero en términos de actividad lipolítica.
5. Clonar los genes de lipasa de las cepas de *R. delemar* y transformar *A.nidulans*.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## 5

### 5.1 Cinética de producción de las lipasas de *R. delemar* WT y M2

Se realizó la cinética de crecimiento de las cepas de *R. delemar* WT (silvestre) y M2 (mutante 2) en medio "D" con dos fuentes de carbono (ver Apéndice 1). Se empleó dextrina amarilla al 1% y glucosa al 1 y 4%. Se tomaron muestras cada 24 horas durante 4 días. Después de la fermentación, se separó el micelio por filtración para la determinación de biomasa, al filtrado se le midió el pH directamente con un potenciómetro "Beckman  $\Phi$ 34 pH Meter" y se le determinó la actividad lipolítica, proteolítica y la concentración de proteína soluble.

#### 5.1.1 Determinación de actividad lipolítica

La actividad lipolítica se determinó por el método de caída de pH propuesto por Espinosa (16), usando tributirina emulsificada al 1% como sustrato con 0.01% de Tween 80 como emulsificante. En un tubo de ensaye grande con un agitador magnético se colocaron 7 ml de Tris 5mM pH 8, más 2 ml de tributirina emulsificada y un mililitro del filtrado, se mantuvo en agitación constante y se midió el pH de la mezcla de reacción cada minuto durante 10 minutos con un potenciómetro "Beckman  $\Phi$ 34 pH Meter", la reacción se llevó a cabo a 37°C. La curva patrón se realizó con ácido butírico al 0.5%. La actividad enzimática fue calculada y definida para una unidad de actividad como la liberación de un  $\mu$ mol de ácido graso por minuto bajo estas condiciones.

#### 5.1.2 Determinación de biomasa

Se determinó el crecimiento microbiano por peso seco. El micelio se separó del medio de cultivo por filtración mediante un sistema "Millipore" y papel filtro Whatman 540, previamente secado durante 24 horas a 50°C. Los papeles filtro con la biomasa se mantuvieron a 50°C hasta peso constante. El crecimiento se expresó como miligramos de biomasa/mL de caldo de fermentación.

### **5.1.3 Cuantificación de proteína extracelular**

Determinada por el método de Lowry modificado por Peterson (82).

## **5.2 Determinación del perfil electroforético de las proteínas extracelulares**

Para determinar el patrón electroforético de las proteínas extracelulares de las cepas de *R. delemar* se realizó una electroforesis del filtrado de la fermentación de 24 h. Los filtrados se concentraron en primer lugar por ultrafiltración en un equipo AMICON utilizando una membrana YM10 con límite de exclusión de 10 KDa, posteriormente por liofilización "Freeze-dryed RP2V, Groupe S.G.D. Canada y Freeze Dry System/Freezone 4.5 de LABCONCO". El liofilizado obtenido se redisolvió en un volumen mínimo, se precipitó con TCA al 10%, se neutralizó con NaOH 0.1 N y posteriormente se dializó contra agua destilada usando una membrana "Dialysis Seamless Tubing" de SIGMA con límite de exclusión de 10 KDa. Para eliminar los carbohidratos, las proteínas se precipitaron con acetona. Después de cada paso de precipitación se centrifugaron las muestras a 15,000 rpm durante 15 minutos a 4°C en una centrífuga "Beckman J2-MC". Se concentró por liofilización y se determinó la concentración de proteína por el método de Lowry modificado.

La electroforesis se realizó bajo condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE), de acuerdo con el método propuesto por Laemmli (63), con un gel al 10% de poliacrilamida (Bio-Rad).

## **5.3 Determinación de glicosilación de las proteínas extracelulares**

Para determinar el patrón de glicosilación de las proteínas extracelulares de las cepas de *Rhizopus*, se realizó una electroforesis en condiciones desnaturizantes en geles de poliacrilamida siguiendo las condiciones antes señaladas y usando los marcadores de peso molecular "Prestained SDS-PAGE Standards Low Range" de BIO-RAD.

Se preparó la membrana "Spectra/Por PolyScreen PVDF Transfer Membrane" Perkin Elmer según las indicaciones del proveedor, la transferencia de las proteínas se llevó a cabo durante 90 minutos en la cámara de transferencia "Trans-Blot SD Semi Dry Transfer Cell" de BIO-RAD a 15 V y 500 mA.

Para confirmar la transferencia de las proteínas, se incubó la membrana en solución de *Ponceau* durante 5 minutos para visualizar las bandas.

Se determinó el patrón de glicosilación utilizando el DIG “Glycan Differentiation Kit” de Roche, el cual reconoce manosa, galactosa, proteínas o-glicosiladas y Gal  $\beta$ -(1-4).

#### **5.4 Modificación de sustratos lácteos con extractos enzimáticos de *R. delemar* WT y M2**

Se llevó a cabo una modificación de dos productos lácteos comerciales con los extractos enzimáticos de cada cepa para conocer perfil de sabor y el perfil de ácidos grasos generados.

Los sustratos lácteos empleados fueron “Mediacrema Nestlé” y la crema ácida “Alpura”. El extracto enzimático corresponde al filtrado de la fermentación de 24 horas con dextrinas al 1% de cada cepa.

Para llevar a cabo la modificación, se homogenizó 50g de sustrato lácteo con 25 U de lipasa contenidos en 1 mL del extracto enzimático, posteriormente se incubó a 30°C durante 24 horas con agitación recíproca de 100 rpm. Al término de la modificación se determinó el pH, se realizó una evaluación sensorial preliminar y se analizó por cromatografía de gases el perfil de ácidos grasos libres generado.

##### **5.4.1 Obtención de los perfiles de ácidos grasos libres (AGL) de los sustratos lácteos modificados**

La determinación se llevó a cabo de la siguiente manera:

A un gramo de crema modificada se le agregaron 10  $\mu$ L de estándar C:5:0 o ácido valérico, 10 mL de una solución hexano-éter dietílico (1:1) y 0.1 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.2 N.

Se adicionó 0.5 g de sulfato de sodio anhidro y se centrifugó a 2000 rpm durante 5 minutos.

Se separó el sobrenadante y se pasó por una columna de BIO-RAD. De 10 cm x 10 mm que contenía 1 g de alúmina neutra (para análisis cromatográfico) grado I según Brockman y Schoedder (Sigma Chemical Company). Con flujo de 3 mL/min a 4°C.

El eluido se pasó varias veces por la columna de separación. Se lavó la columna con una mezcla de hexano-éter dietílico (1:1) y se secó con un flujo de nitrógeno. La alúmina se mezcló con éter diisopropílico (J.T. Baker) que contenía 6% (v/v) de ácido fórmico (J.T. Baker). Se colocó la muestra en tubos Eppendorfs de 1.5 mL, se mezcló vigorosamente y se centrifugaron las muestras a 2000 rpm durante 5 min. El sobrenadante se separó en viales de 1.5 mL y se mantuvieron a -20°C hasta su utilización.

Los ácidos grasos libres se cuantificaron en un cromatógrafo de gases Perkin ElmerXLS, con detector de ionización de flama y una columna capilar HP5 (fenilmetil silicón al 5%) de 30 m, 0.32 mm de diámetro interno y 0.25 µm de grosor de capa bajo las siguientes condiciones: Rampa 80°C/1 min e incremento de 10°C/min hasta llegar a 25°C y se mantuvo por 4 min. Temperatura del inyector: 250°C. Temperatura del detector: 250°C.

#### **5.4.2 Determinación de amoniaco de los sustratos lácteos modificados**

La determinación de amoniaco presente en las cremas modificadas se llevó a cabo con el Kit Ammonia UV-Method, de BOEHRINGER MANNHEIM/R-BIOPHARM Enzymatic BioAnalysis/Food Análisis.

Para llevar a cabo la determinación, se realizó un tratamiento previo de las muestras siguiendo las especificaciones del kit para productos con grasa y leche.

Para eliminar la grasa, se mantuvieron 10 mL de la dilución 1:10 de las muestras de crema modificada en un baño con agua a ebullición durante 10 minutos, al término de este periodo se dejaron enfriar las muestras a temperatura ambiente y posteriormente se filtraron con papel Watman no.1. Se mezcló 1 mL de filtrado con 4 mL de ácido tricloroacético 0.3 M, se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron 10 minutos a 10,000 rpm. Se decantó el sobrenadante y se neutralizó a pH

7.0 con KOH 10 M, posteriormente se filtró y se utilizaron 2 mL de cada muestra para la determinación de amoníaco con el kit.

## **5.5 Determinación de actividad proteolítica**

Se determinó incubando 800  $\mu$ L de una solución de caseína “Casein Hammarsten Quality, MW 75,000-100,000”, Research Organics; en buffer de fosfatos 100 mM, pH 7.0 con 200  $\mu$ L de filtrado de las fermentaciones de 24 horas de cada cepa crecidas en medio con dextrinas al 1%, por un periodo de 2 horas a 30 y 37°C. Después del periodo indicado se detuvo la reacción con la adición de 1.5 mL de TCA al 5%. Se centrifugaron las muestras por 10 minutos a 14,000 rpm, se leyó la densidad óptica a 280 nanómetros. La actividad proteolítica se reporta como U/mL min con una curva estándar de Tirosina 100  $\mu$ g/mL. Técnica modificada de Kunitz (61).

## **5.6 Aislamiento y comparación de los genes de lipasa de *R. delemar* WT y M2**

### **5.6.1 Extracción de DNA fungal**

Se diseñó el siguiente protocolo para la extracción y purificación de DNA total de hongos filamentosos, el cual es una combinación de los métodos propuestos por Towner (101) y Chow (13). Dicho método se aplicó para la extracción y purificación de DNA de las especies de hongos filamentosos que se manejaron en este trabajo.

1. Crecer a *R. delemar* en medio “D” y a *A. nidulans* en medio “A” por un periodo de 24 h, en las condiciones recomendadas para el crecimiento y con los suplementos adecuados para cada cepa.
2. Cosechar el micelio por filtración, retirar el exceso de humedad con papel absorbente.
3. Colocar el micelio en un mortero y congelar con nitrógeno líquido, adicionar un poco de sílica gel estéril y moler hasta convertirlo en polvo fino. Si las muestras de micelio no se van a procesar inmediatamente, se envuelve el micelio en papel aluminio, se congela con nitrógeno líquido y se almacena a -70°C. Las muestras almacenadas de esta manera, posteriormente se liofilizan y se pulveriza el micelio.

4. Se coloca el micelio pulverizado en un tubo Eppendorf de 1.5 ml (lo correspondiente a un volumen de 100  $\mu$ L, se adicionan 600  $\mu$ L de buffer de lisis. Agitar suavemente en el vortex hasta humedecer todo el micelio.

#### **Buffer de lisis**

Tris-HCl pH 8	50 mM
NaCl	200 mM
EDTA pH 8	100 mM
RNAsa A	0.1 mg/ml

5. Mantener en agitación los tubos Eppendorfs durante 10 minutos a temperatura ambiente.
6. Ajustar la concentración de SDS a 1%.
7. Incubar una hora a 55°C en agitación.
8. Adicionar 600  $\mu$ L de fenol equilibrado a pH 7, agitar suavemente por inversión.
9. Centrifugar 15 minutos a 14,000 rpm. Recuperar el sobrenadante en un tubo limpio.
10. Adicionar un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), agitar por inversión y centrifugar 15 minutos a 14,000 rpm.
11. Recuperar el sobrenadante en un tubo limpio y adicionar un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y centrifugar.
12. Recuperar el sobrenadante en un tubo limpio y adicionar 2.5 volúmenes de etanol absoluto y almacenar a -20°C por lo menos dos horas.
13. Recuperar el DNA centrifugando 15 minutos a 14,000 rpm. Lavar con etanol al 70% y resuspender en un volumen mínimo de buffer TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM pH 8.0) o agua bidestilada estéril.

Una vez que se obtuvo el DNA purificado de cada cepa, se corrió una electroforesis en gel de agarosa (BIO-RAD) al 1% en buffer Tris-Boratos-EDTA (TBE) para confirmar la integridad del mismo.



## 5.6.2 Amplificación del gene de lipasa de *R. delemar*

Se diseñaron cebadores para amplificar por medio de PCR el gene de lipasa de las cepas de *R. delemar* WT y M2 a partir de la secuencia del cDNA reportada por Haas (30), utilizando como templado DNA genómico. La secuencia del cDNA se muestra en la Figura 5.1, los nucleótidos subrayados corresponden a los cebadores.

FORLIP 5' ATCCCTTT TCTTCT TACCCC T<sub>m</sub> = 60°C

REVLIP 5' TTTATTATAAAATTAGAGTAACACGT T<sub>m</sub> = 62°C

```

1 GAATTCCTT TTCTTCTTAC CCCTTCCAGT TCTTTACTAT CAATCATGGT TTCATTCAAT
61 TCCATTTCTC AAGGTGTTAG TCTTTGTCTT CTTGTCTCTT CCATGATGCT CGGTTTCATCT
121 GCTGTTCCCTG TTTCTGGTAA ATCTGGATCT TCCAACACCG CCGTCTCTGC ATCTGACAAT
181 GCTGCCCTCC CTCCTCTCAT CTCCAGCCGT TGTGCTCCTC CTTCTAACAA GGAAGTAAA
241 AGCGATCTCC AAGCTGAACC TTACAACATG CAAAAGAATA CAGAATGGTA TGAGTCCCAT
301 GGTGGCAACC TGACATCCAT CGGAAAGCGT GATGACAAC TGGTTGGTGG CATGACTTTG
361 GACTTACCCA GCGATGCTCC TCCTATCAGC CTCTCTAGCT CTACCAACAG CGCCTCTGAT
421 GGTGGTAAGG TTGTTGCTGC TACTACTGCT CAGATCCAAG AGTTCACCAA GTATGCTGGT
481 ATCGTGCCA CTGCCTACTG TCGTCTGTG GTCCCTGGTA ACAAGTGGGA TTGTGTCCAA
541 TGTCAAAAGT GGGTTCCTGA TGGCAAGATC ATCACTACCT TTACCTCCTT GCTTCCGAT
601 ACAAATGGTT ACGTCTGAG AAGTGATAAA CAAAAGACCA TTTATCTTGT TTTCCGTGGT
661 ACCAACTCCT TCAGAAGTGC CATCACTGAT ATCGTCTTCA ACTTTTCTGA CTACAAGCCT
721 GTCAAGGGCG CCAAAGTTCA TGCTGGTTTC CTTTCCTCTT ATGAGCAAGT TGTCAATGAC
781 TATTTCCCTG TCGTCCAAGA ACAATTGACC GCCCACCTA CTTATAAGGT CATCGTTACC
841 GGTCACACAC TCGGTGGTGC ACAAGCTTTG CTTGCCGGTA TGGATCTCTA CCAACGTGAA
901 CCAAGATTGT CTCCAAGAA TTTGAGCATC TTCACTGTGCG GTGGTCCCTCG TGTGGTAAC
961 CCCACCTTTG CTTACTATGT TGAATCCACC GGTATCCCTT TCCAACGTAC CGTTCACAAG
1021 AGAGATATCG TTCCTCACGT TCCTCCTCAA TCCTTCGGAT TCCTTCATCC CGGTGTTGAA
1081 TCTTGGATCA AGTCTGGTAC TTCCAACGTT CAAATCTGTA CTCTGAAAT TGAAACCAAG
1141 GATTGCAGTA ACTCTATCGT TCCTTTCACC TCTATCCTTG ACCACTTGAG TTACTTTGAT
1201 ATCAACGAAG GAAGCTGTTT GTAAAACACT TGACGTGTTA CTCTAATTTT ATAATAAAAT
1261 TAAGTTTTTA TACAATAAAA GGAATTC

```

**Figura 5.1** Secuencia del cDNA del gene de lipasa de *R. delemar* (30). El marco de lectura abierto está comprendido entre los nucleótidos 46 y 1224 (codones subrayados). La secuencia del péptido señal corresponde a los nucleótidos 46 al 123 y la del péptido maduro a los nucleótidos 415 al 122. La secuencia de los cebadores se encuentra subrayada.

Las amplificaciones se realizaron en un Termociclador Robocycler (Stratagene) como sigue: el primer ciclo tenía un paso de desnaturalización de 3 minutos a 95°C, seguidos por 30 ciclos con los siguientes tres segmentos: 1 minuto a 95°C, 30 segundos a 62°C y 5 minutos a 72°C; y un ciclo final de 15 minutos a 72°C. La concentración de los componentes de la reacción fue la siguiente:

## Mezcla de Reacción

	Concentración final
PCR Buffer	1 X
DNTP's	75 $\mu$ M
FORLIP	1 $\mu$ M
REVLIP	1 $\mu$ M
MgCl <sub>2</sub>	2.5 mM
DNA Templado	100 ng
Taq DNA Polimerasa Recombinante (GIBCO, BRL)	2.5 Unidades

Los productos de PCR obtenidos fueron analizados por electroforesis de geles de agarosa al 1% y posteriormente purificados con "High Pure PCR Product Purification Kit" de Boehringer Mannheim.

### 5.6.3 Secuenciación de productos de PCR y análisis

Las secuencias de nucleótidos de los productos obtenidos fueron determinadas por un método automatizado en un ABI PRISM 310 DNA "Sequencer System" de Perkin Elmer, Applied Biosystems Division, en el Instituto de Fisiología Celular, México y en Auckland University, Nueva Zelanda. Para la secuenciación fueron usados los oligonucleótidos sintéticos FORLIP y REVLIP anteriormente mencionados. El análisis se llevó a cabo en el programa Clustal W1.6 (38).

### 5.6.4 Amplificación del gene de lipasa de *R. delemar* con región promotora

Después de realizar el alineamiento de las secuencias de lipasa reportadas para el género *Rhizopus*, se sintetizaron dos cebadores para amplificar el gene completo de la lipasa de la cepa CDBH 313 que incluye la región del promotor. Estos cebadores se diseñaron con un sitio de restricción para Bam HI y Eco RI respectivamente, para posteriormente clonar el producto de PCR en un vector para *Aspergillus*.

Bam HI

FORLIP95 5' ATAGGATCCGCTTTGTGTGATGTermo Tm = 61.2°C; %GC Tm = 55.8°C

Eco RI

REVLIP96 5' AGGAATTCAAGTTTGAAGTTGAGG Termo Tm = 60.0°C; %GC Tm = 54.4°C

Se llevaron a cabo experimentos con diferentes concentraciones de cebadores, dNTP's y cloruro de magnesio para determinar las mejores condiciones de amplificación de los genes de lipasa. Se probaron condiciones de baja afinidad en la que los dNTP's, los cebadores y el cloruro de magnesio se encuentran en exceso, una condición de afinidad intermedia y una de afinidad alta con concentraciones mínimas de los componentes antes señalados, las concentraciones se muestran a continuación:

### Mezclas de Reacción

#### Concentración final

	<b>Baja afinidad</b>	<b>Afinidad intermedia</b>	<b>Alta afinidad</b>
PCR Buffer	1 X	1 X	1 X
dNTP's	200 µM	100 µM	50 µM
FORLIP95	400 nM	200 nM	100 nM
REVLIP96	400 nM	200 nM	100 nM
MgCl <sub>2</sub>	2.5 mM	2 mM	1 mM
DNA Templado	100 ng	100 ng	100 ng
Taq DNA Polimerasa	2.5 U	2.5 U	2.5 U
Recombinant GIBCO BRL			

Las amplificaciones se realizaron en el Termociclador Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400 de la siguiente manera: el primer ciclo tenía un paso de desnaturalización de 1 minuto a 95°C, seguidos por 30 ciclos con los siguientes tres segmentos: 1 minuto a 95°C, 30 segundos a 55°C y 90 segundos a 72°C; y un ciclo final de 10 minutos a 72°C. Los productos de PCR obtenidos fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1% y posteriormente purificados con el High Pure PCR Product Purification Kit (Boehringer Mannheim).

La secuenciación y el análisis de los productos de PCR obtenidos se llevaron a cabo como en el apartado anterior. Para confirmar las secuencias obtenidas con los cebadores FORLIP95 y REVLIP96, se secuenciaron adicionalmente los productos de PCR con el cebador F580 5' TTTACCTCCTTGCTTTCCGATACA para confirmar la secuencia.

## **5.7 Evaluación de *A. nidulans* como hospedero**

### **5.7.1 Actividad lipolítica en medio líquido**

Se creció *A. nidulans* por un periodo de 24 horas en medio "A" (ver Apéndice 1), después de la fermentación se separó el micelio por medio de filtración, se midió el pH al filtrado, y se cuantificó la cantidad de proteína soluble por el método de Lowry modificado y la actividad lipolítica.

La actividad lipolítica se determinó tanto con el método de caída de pH mencionado anteriormente para el caso de *R. delemar* así como con el método espectrofotométrico propuesto por Isobe (61), el cual emplea *o*-nitrofenil laurato como sustrato, pero con algunas modificaciones.

Se disolvieron 2.5  $\mu$ moles de *o*-nitrofenil laurato en 200  $\mu$ L Triton X-100 (SIGMA), se colocó la solución obtenida en un buffer de fosfatos 100 mM a pH 7.2. Se tomaron 900  $\mu$ L de esta mezcla de reacción y se adicionó 100  $\mu$ L del filtrado y se midió absorbancia a 410 nm, tomando lecturas cada minuto durante 10 minutos. Se hizo una curva estándar con *o*-nitrofenol para determinar la actividad lipolítica. Una unidad de actividad fue definida como la cantidad de enzima que libera una micromol de *o*-nitrofenol por minuto.

### **5.7.2 Actividad lipolítica en medio sólido**

La actividad lipolítica en medio sólido se llevó a cabo creciendo al hongo en medio "A" con los suplementos adecuados para cada cepa y tributirina emulsificada al 1%, las cepas productoras de lipasa forman un halo de hidrólisis alrededor de la colonia en el medio con tributirina.

### 5.7.3 Hibridación de DNA genómico de *A. nidulans* con sonda específica para el gene de lipasa de *R. delemar*

La homología entre el gen de lipasa reportado por Haas (30) y los genes de lipasas de *R. delemar* y *A. nidulans* de nuestro laboratorio fue analizada por medio de la técnica de *Southern blot*. Para este experimento se utilizó el DNA de la cepa silvestre de *R. delemar* y la cepa de *A. nidulans* PW1.

Se llevó a cabo una digestión exhaustiva (12 horas a 37°C) de 3 µg de DNA cromosomal de cada una de las cepas con las siguientes enzimas de restricción: Bam HI, Eco RI y Hind III (BRL). Se realizó una electroforesis de las digestiones en gel de agarosa al 1% en buffer TBE.

Se trató el gel para transferir el DNA a la membrana de nylon "Hybond-N" de Amersham International. Al término de la transferencia el DNA se fijó a la membrana mediante la exposición de 5 minutos a luz ultravioleta. Tanto el tratamiento del gel, la transferencia y la hibridación, se llevaron a cabo siguiendo los protocolos sugeridos por Sambrook (88).

La sonda usada fue la secuencia de 1287 bases que corresponde al cDNA de la lipasa de la cepa de *R. delemar* ATCC 34612 (30), la cual se obtuvo mediante la digestión con Eco RI del plásmido pUC8-2.14. La sonda se marcó radiactivamente con P<sup>32</sup> siguiendo el protocolo del Kit Random Primer de BRL.

Se realizó la extracción y purificación del plásmido a gran escala siguiendo el protocolo de lisis alcalina propuesto por Sambrook (88).

Las condiciones de la hibridación fueron 68°C durante 12 horas. En experimentos preliminares con dots se probaron diferentes condiciones de lavado con 0.1% de SDS y diferentes concentraciones de SSC: 2X, 1X, 0.5X, 0.25X y 0.1X, respectivamente. Con los resultados obtenidos se estableció que las membranas tendrían un primer lavado con 2X SSC y 0.1% SDS y posteriormente con la solución 0.5X SSC y 0.1% de SDS.

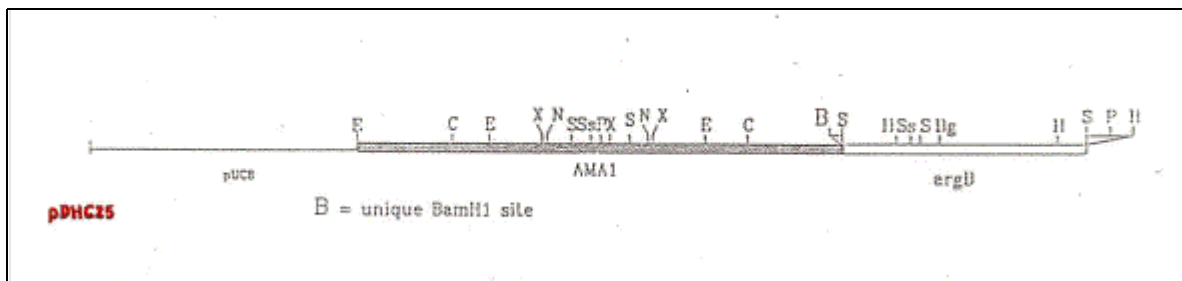
## 5.8 Clonación de los genes de lipasa de *R. delemar* WT y M2 en *A. nidulans*

### 5.8.1 Selección de plásmidos para *A. nidulans*

#### 5.8.1.1 Plásmido de replicación autónoma pDHG25

Debido a la falta de una cepa de *Aspergillus* carente de lipasas que permitiera una estrategia directa de selección de posibles transformantes, se siguió una estrategia de cotransformación (23), en la cual se transformó protoplastos de *A. nidulans* RMS11 (ver Apéndice 1) con los plásmidos pDHG25 (Figura 5.2) y el plásmido pUC8-2.14.

El pDHG25 es un plásmido de replicación autónoma para *Aspergillus* que contiene un marcador fungal que complementa la auxotrofia a arginina. Tanto el plásmido como el protocolo de transformación de protoplastos fueron proporcionados por el Dr. Jesús Aguirre.



**Figura 5.2** Plásmido de replicación autónoma pDHG25.

Los protoplastos transformados se crecieron en medio mínimo con ácido *p*-aminobenzoico, diferentes concentraciones de glucosa (0.1, 0.5, 1 y 4%) y tributirina al 1% con el fin de observar la producción de halos de lipólisis.

#### 5.8.1.2 Plásmidos integrativos

Los plásmidos integrativos pDC1, pDE1, pMS12 y pILJ16 (Figura 5.3), son específicos para el género *Aspergillus* y contienen marcadores selectivos compatibles con las cepas

disponibles de *A. nidulans*. Todos los plásmidos se obtuvieron en el Fungal Genetics Stock Center (University of Kansas).

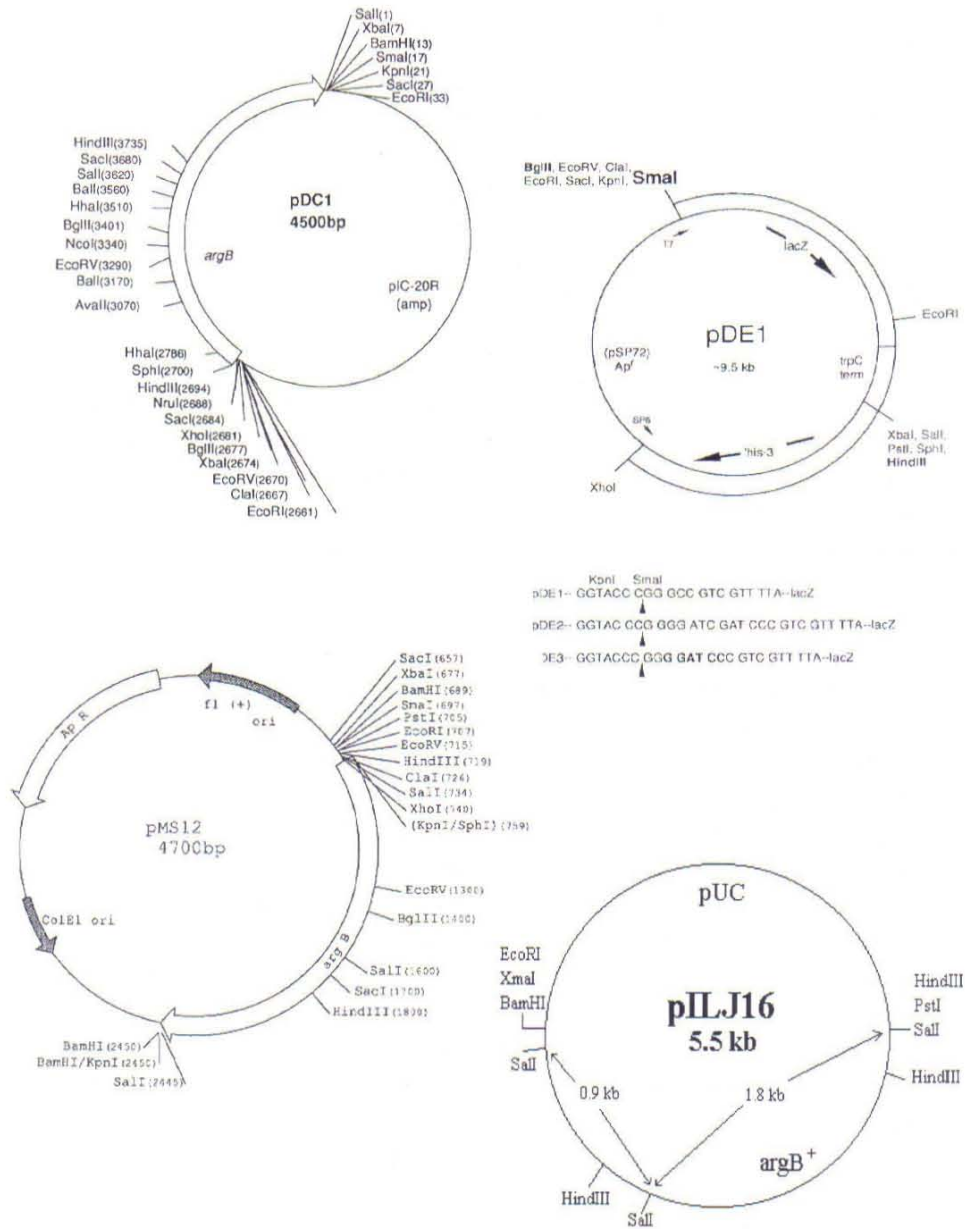


Figura 5.3 Plásmidos integrativos de *A. nidulans*.

### 5.8.2 Construcción de los plásmidos recombinantes

En un primer intento por obtener el plásmido recombinante se hizo una digestión con Eco RI (GIBCO) para linearizar los plásmidos pLJ16 y pMS12, así como para obtener el inserto del pUC8-2.14 que corresponde al cDNA del gene de lipasa de *R. delamar* (Haas, 1991). Se separaron los productos de las digestiones en un gel de agarosa de bajo punto de fusión (BRL) al 0.6%, se cortaron las bandas de interés del gel y se purificaron con el QIAquick Gel Extraction Kit de QIAGEN.

Los plásmidos linearizados y purificados se desfosforilaron con la enzima CIAP de GIBCO. Después de la reacción, se desnaturalizó la enzima con la adición de 2  $\mu$ L de EDTA 0.5 M pH 8 a la mezcla de reacción y se incubó a 65°C por 20 minutos, seguida de una extracción con fenol-cloroformo y precipitación con etanol absoluto. Posteriormente se llevó a cabo la reacción de ligación con 100 ng totales de DNA guardando la proporción 1:3 (vector:inserto) utilizando la enzima T4 DNA ligasa de GIBCO.

Se transformó por dos métodos células de *E. coli* con 10 ng de DNA de la reacción de ligación. En primer lugar se transformó por choque térmico (Heat shock) células competentes por RbCl de la cepa de *E. coli* DH10B. Por otro lado, se transformaron células electrocompetentes de *E. coli* DH10B, para este fin se utilizó el Electroporador de Bio Rad (Mod 1652076) Gene Pulse Controller Apparatus II (Mod 1652109).

La segunda estrategia para construir los plásmidos recombinantes, se llevó a cabo sólo con el plásmido pLJ16, para ello se digirió el plásmido y los productos de PCR tanto de la cepa silvestre como de la mutante con Eco RI (GIBCO), se separaron las bandas en un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 6%, se cortaron las bandas de interés del gel y se purificaron con el QIAquick Gel Extraction Kit de QIAGEN. Posteriormente, se digirieron con Bam HI (GIBCO), se siguió la metodología anterior para la purificación del vector y de los productos de PCR antes de realizar la reacción de ligación con 100ng totales de DNA guardando la proporción 1:3 (vector:inserto) utilizando la enzima T4 DNA ligasa de GIBCO.



Se llevó a cabo la transformación con 10 ng de la reacción de ligación en células electrocompetentes de *E. coli* DH10B en el electoporador de BIORAD. Después de sembrar las transformantes obtenidas se realizaron minipreps para verificar la existencia de plásmidos recombinantes en las células de *E. coli* DH10B antes de la extracción a gran escala del plásmido.

Se llevó a cabo también una amplificación del gene de lipasa clonado en los plásmidos recombinantes a partir de las transformantes con el siguiente protocolo: Se tomó una colonia de *E. coli* transformada con un asa bacteriológica, se resuspendió en 50µL de agua destilada estéril, se agitó en vórtex por 30 segundos, se aplicó un ciclo de desnaturalización de 95°C por 10 minutos. Se centrifugo un minuto a 12,000 rpm a temperatura ambiente. Se tomaron 2 µL del sobrenadante para hacer la amplificación en las condiciones antes señaladas en un volumen final de 20 µL.

### **5.8.3 Transformación genética de *A. nidulans***

Se obtuvieron protoplastos de la cepa *A. nidulans* CP309 con actividad lipolítica reducida siguiendo el protocolo propuesto por Aguirre y se transformaron con 10 ng de cada uno de los plásmidos recombinantes pILJ16-LipWT y pILJ16-LipM2.

Los protoplastos transformados se plaquearon en medio mínimo con sorbitol 1.2 M, tributirina al 1% y sin arginina para seleccionar transformantes.

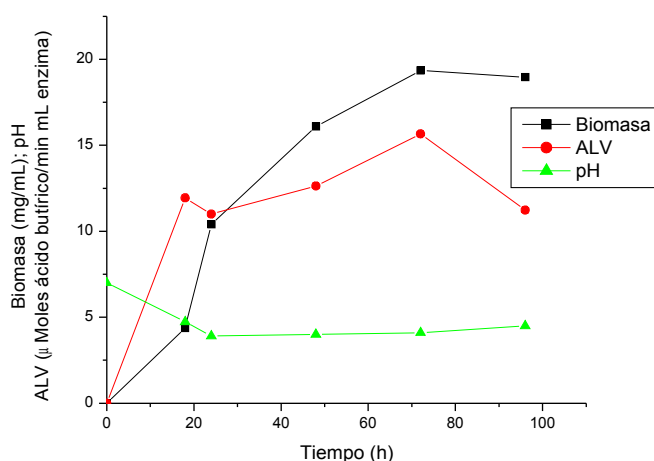
# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## 6

### 6.1 Cinética de fermentación de *R. delemar* WT con diferentes fuentes de carbono

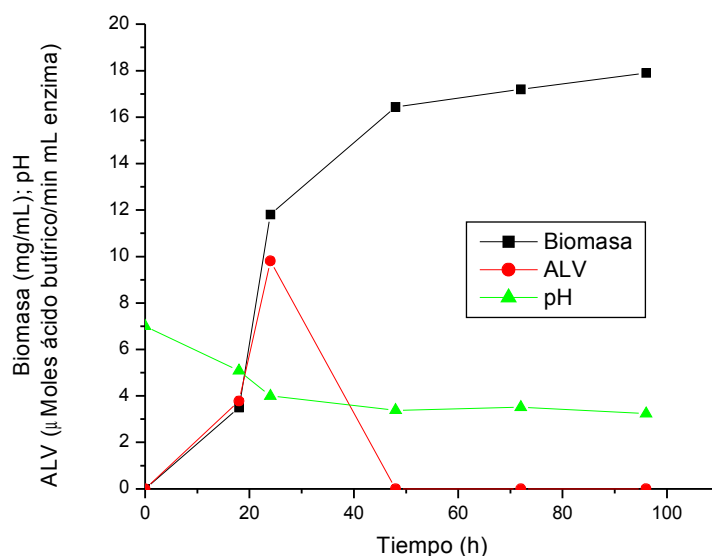
Las cepas objeto del presente estudio habían sido caracterizadas previamente por Peralta (1994) y Miralles (70). En virtud de la variabilidad mostrada previamente, se consideró importante verificar los fenotipos presentados. Con este propósito se llevaron a cabo determinaciones de crecimiento y actividad lipolítica utilizando como fuentes de carbono glucosa al 1 y al 4% así como dextrina amarilla al 1%, tanto para la cepa silvestre de *R. delemar* como para la cepa mutante 2 derregulada a glucosa.

Los resultados que se presentan en las figuras subsecuentes indican que, en general, se mantiene el mismo comportamiento en la cinética de producción de la lipasa por la cepa silvestre que la observada por Miralles (70). En el medio con glucosa al 1% (Figura 6.1) se detecta una alta actividad lipolítica volumétrica desde las 18 horas de fermentación; el nivel se mantiene elevado por el tiempo restante, aunque la producción máxima ocurre a las 72 horas. En el anexo 1 se encuentra una tabla con los datos de cada gráfica y su respectiva desviación estándar.



**Figura 6.1** Cinética de Fermentación de *R. delemar* WT en medio "D" con Glucosa al 1%, a 29°C durante 96 h de incubación.

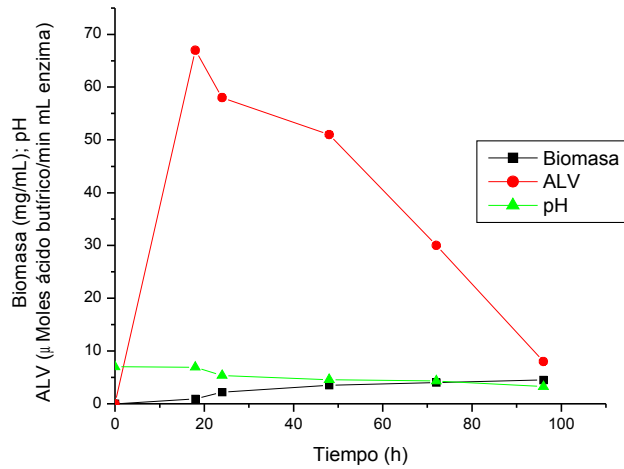
La Figura 6.2 muestra que si bien la cepa silvestre presentó actividad lipolítica a las 18 y 24 horas de fermentación en el medio con 4% de glucosa, ligeramente menor a la observada a las 24 horas en la cinética de fermentación con glucosa al 1%, la cepa es sensible al efecto negativo ejercido por la glucosa al 4%, ya que se abatió completamente la actividad lipolítica desde las 48 horas hasta el final de fermentación. Este resultado indica que la cepa WT es sensible al efecto regulador de altas concentraciones de glucosa.



**Figura 6.2** Cinética de Fermentación de *R. delamar* WT en medio “D” con Glucosa al 4%, a 29°C durante 96 h de incubación.

Al ser regulada por carbono, la mejor fuente de carbono para la producción de lipasa por parte de la cepa silvestre es la dextrina amarilla al 1%, como se puede observar en la Figura 6.3. Se presenta un máximo de producción de lipasa a las 18 horas, disminuyendo en forma gradual a lo largo de la fermentación.

En la Tablas 6.1 se presentan los datos de biomasa, actividad lipolítica volumétrica y pH con las desviaciones estándar respectivas para las cinéticas de crecimiento de la cepa silvestre con las diferentes fuentes de carbono. La actividad lipolítica se abatió completamente a partir de las 48 horas de fermentación con glucosa al 4%.



**Figura 6.3** Cinética de Fermentación de *R. delamar* WT en medio “D” con Dextrina al 1%, a 29°C durante 96 h de incubación.

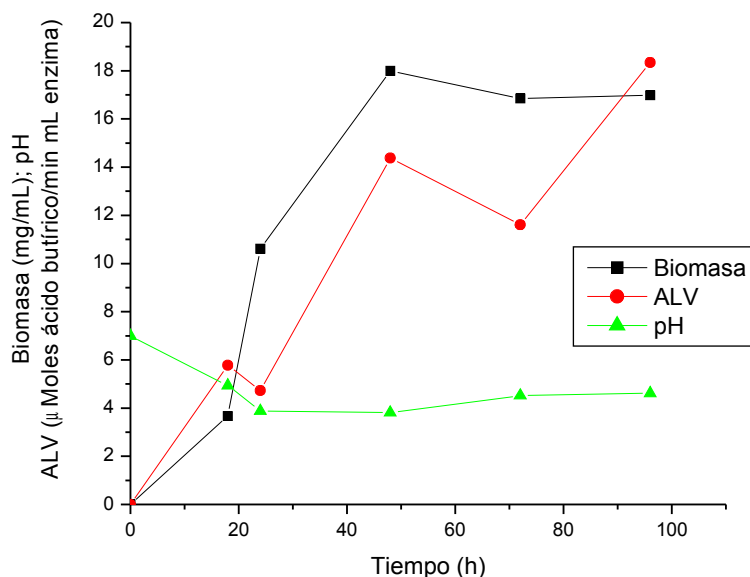
**Tabla 6.1** Datos de la cinética de crecimiento y producción actividad lipolítica de *R. delamar* WT en tres diferentes fuentes de carbono durante 96 h de fermentación.

Fuente de Carbono	Tiempo h	Biomasa mg/mL	ALV $\mu\text{mol}$ ác butírico/min mL enzima	pH
Glucosa 1%	18	$4.378 \pm 0.02531$	$11.945 \pm 2.4678$	$4.73 \pm 0.08485$
	24	$10.411 \pm 0.04731$	$11.045 \pm 0.34648$	$3.91 \pm 0.04243$
	48	$16.096 \pm 0.06166$	$12.63 \pm 1.85262$	$4.12 \pm 0.09899$
	72	$19.355 \pm 0.05621$	$15.58 \pm 0.11314$	$4.2 \pm 0.02828$
	96	$18.964 \pm 0.03635$	$11.23 \pm 0.60811$	$4.59 \pm 0.12728$
Glucosa 4%	18	$3.499 \pm 0.01492$	$3.78 \pm 0.89095$	$5.09 \pm 0.01414$
	24	$11.812 \pm 0.00368$	$9.815 \pm 0.28991$	$4.005 \pm 0.03536$
	48	$16.44 \pm 0.08627$	0	$3.385 \pm 0.00707$
	72	$15.45 \pm 0.11597$	0	$3.51 \pm 0.11314$
	96	$17.94 \pm 0.02263$	0	$3.24 \pm 0.05657$
Dextrinas 1%	18	$0.924 \pm 0.00962$	$67.425 \pm 3.21734$	$6.925 \pm 0.03536$
	24	$2.191 \pm 0.0012$	$58.3 \pm 1.27279$	$5.35 \pm 0.07071$
	48	$3.457 \pm 0.0029$	$51.09 \pm 3.46482$	$4.595 \pm 0.02121$
	72	$4.025 \pm 0.0111$	$30.475 \pm 1.37886$	$4.435 \pm 0.0495$
	96	$4.542 \pm 0.02574$	$8.35 \pm 1.06066$	$4.115 \pm 0.02121$

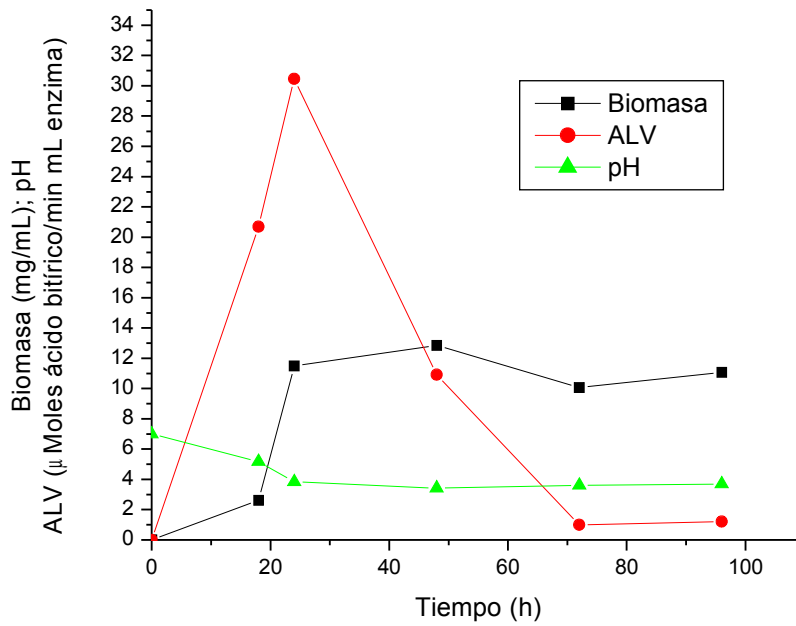
## 6.2 Cinética de fermentación de *R. delemar* M2 con diferentes fuentes de carbono

El comportamiento de la cepa mutante en glucosa al 1% es similar al presentado por la cepa silvestre, puesto que en la Figura 6.4 se observa que presenta una mayor producción de actividad lipolítica a las 18 horas de fermentación y una ligera disminución a las 24 horas en el medio con glucosa al 1%. La producción de actividad enzimática presenta una disminución hasta las 72 horas de fermentación, en tanto que Miralles observaba oscilaciones en la producción con disminución a las 48 y 96 horas.

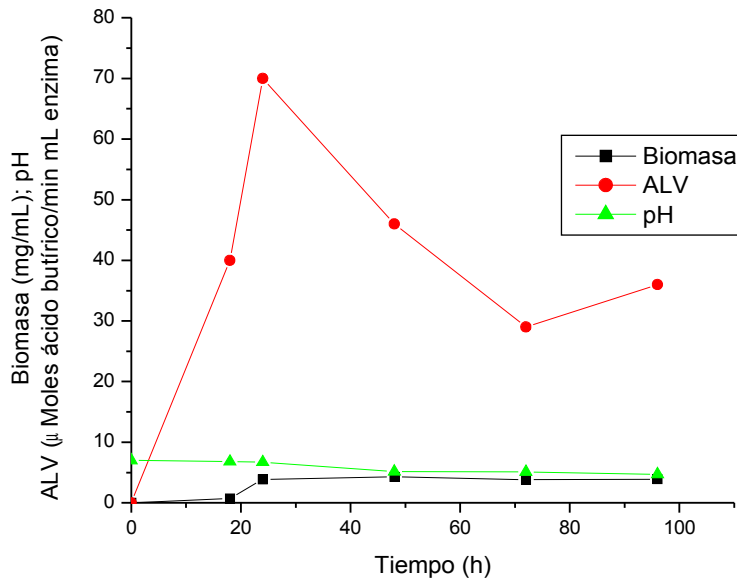
La cepa mutante mantiene el carácter de hiperproductora que reportan Peralta (81) y Miralles (70), ya que presenta un máximo de actividad lipolítica a las 24 horas de fermentación en medio con glucosa al 4%, aunque conforme avanza la fermentación la actividad enzimática se reduce drásticamente a las 72 y 96 horas de fermentación (Figura 6.5). La actividad lipolítica en la cepa mutante a las 24 horas de fermentación en estas condiciones, llega a ser 3 veces mayor que la presentada por la cepa silvestre. Estos resultados indican que se mantiene el fenotipo mutante insensible al efecto negativo de la glucosa por parte de la cepa M2.



**Figura 6.4** Cinética de Fermentación de *R. delemar* M2 de en medio "D" con Glucosa al 1%, a 29°C durante 96 h de incubación.



**Figura 6.5** Cinética de Fermentación de *R. delemar* M2 de en medio “D” con Glucosa al 4%, a 29°C durante 96 h de incubación.



**Figura 6.6** Cinética de Fermentación de *R. delemar* M2 de en medio “D” con Dextrina al 1%, a 29°C durante 96 h de incubación.

La máxima producción de actividad lipolítica de la cepa mutante se presenta a las 24 horas de fermentación con dextrina al 1%, como se muestra en la Figura 6.6, tal y como se comporta la cepa silvestre. Sin embargo, la actividad enzimática se reduce a la mitad a las 72 horas y nuevamente se observa un aumento a las 96 horas. Esta cinética de producción coincide con la reportada por Miralles. En la Tabla 6.2 se presentan los datos para biomasa, actividad lipolítica volumétrica y pH con sus respectivas desviaciones estándar.

**Tabla 6.2** Datos de la cinética de crecimiento y producción actividad lipolítica de *R. delemar* M2 en tres diferentes fuentes de carbono durante 96 h de fermentación.

Fuente de Carbono	Tiempo h	Biomasa mg/mL	ALV $\mu\text{mol}$ $\acute{\text{a}}\text{c}$ butírico/min mL enzima	pH
Glucosa 1%	18	$3.248 \pm 0.03012$	$5.785 \pm 0.26163$	$4.94 \pm 0.04243$
	24	$11.148 \pm 0.03741$	$4.73 \pm 1.30108$	$3.88 \pm 0.07071$
	48	$18.456 \pm 0.03189$	$14.385 \pm 0.50205$	$3.815 \pm 0.09192$
	72	$15.992 \pm 0.06124$	$11.615 \pm 0.14849$	$4.52 \pm 0.05657$
	96	$16.274 \pm 0.05028$	$18.34 \pm 1.92333$	$4.62 \pm 0.14142$
Glucosa 4%	18	$2.7 \pm 0.00544$	$20.69 \pm 0.96167$	$5.17 \pm 0.01414$
	24	$11.822 \pm 0.02312$	$30.46 \pm 0.59397$	$3.835 \pm 0.09192$
	48	$13.17 \pm 0.02206$	$10.92 \pm 0.66468$	$3.425 \pm 0.06364$
	72	$9.894 \pm 0.01209$	$1.005 \pm 0.00707$	$3.6 \pm 0.05657$
	96	$8.09 \pm 0.211$	$1.215 \pm 0.09192$	$3.765 \pm 0.13435$
Dextrinas 1%	18	$0.662 \pm 0.00445$	$40.53 \pm 0.43841$	$6.895 \pm 0.00707$
	24	$4.07 \pm 0.01336$	$70.055 \pm 0.0495$	$6.75 \pm 0.18385$
	48	$4.328 \pm 0.00233$	$46.25 \pm 1.41421$	$5.15 \pm 0.04243$
	72	$3.552 \pm 0.00919$	$29.13 \pm 2.58801$	$5.115 \pm 0.00707$
	96	$3.6 \pm 0.02114$	$36.96 \pm 1.00409$	$6.705 \pm 0.07778$

Se calculó la actividad lipolítica específica para ambas cepas en las tres condiciones de crecimiento. En la Tabla 6.3 se observan las variaciones en cuanto al comportamiento. La cepa mutante mantiene su característica de insensibilidad al efecto negativo de carbono en el medio con glucosa al 4% y su carácter de cepa hiperproductora en el medio con dextrina al 1%, incluso supera en más de 4 veces la actividad lipolítica específica a la cepa silvestre al final de la fermentación con esta fuente de carbono.

**Tabla 6.3** Actividad lipolítica específica de *R. delemar* WT y M2 en tres diferentes fuentes de carbono durante 96 h de fermentación.

Fuente de Carbono	Tiempo h	Actividad Lipolítica Específica ALE U/g de Biomasa	
		WT	M2
Glucosa 1%	18	54.56	31.49
	24	21.21	8.90
	48	15.69	15.97
	72	16.09	13.77
	96	11.84	21.59
Glucosa 4%	18	21.60	157.75
	24	16.61	52.99
	48	0	16.98
	72	0	1.99
	96	0	2.19
Dextrinas 1%	18	1459.41	1118.06
	24	532.17	361.01
	48	295.57	215.36
	72	151.42	158.22
	96	36.76	189.58

### 6.3 Actividad proteolítica

*R. delemar* produce enzimas proteolíticas. Estas son también reguladas por carbono e inciden en el sabor de productos lácteos, por lo que se intentó su cuantificación. Esta presentó varios problemas. En un caso, la utilización de azocaseína como sustrato se descartó por la inestabilidad del color, lo que hace poco confiable la lectura espectrofotométrica.

Finalmente se determinó la actividad proteolítica de las dos cepas con el método espectrofotométrico propuesto por Kunitz (61). La actividad se determinó en los extractos enzimáticos de las 24 horas de fermentación en los tres medios (Tabla 6.4) ya que según lo reportado por Díaz y Ruiz (15) el máximo de actividad lipolítica se observó a las 24 horas de fermentación.



**Tabla 6.4** Comparación de la actividad proteolítica de *R. delemar* WT y M2

Fuente de Carbón	Actividad Proteolítica (U/ml min)	
	Silvestre	Mutante 2
Glucosa 1%	0.0012	0.0041
Glucosa 4%	0.0007	0.0014
Dextrinas 1%	0.0011	0.0013

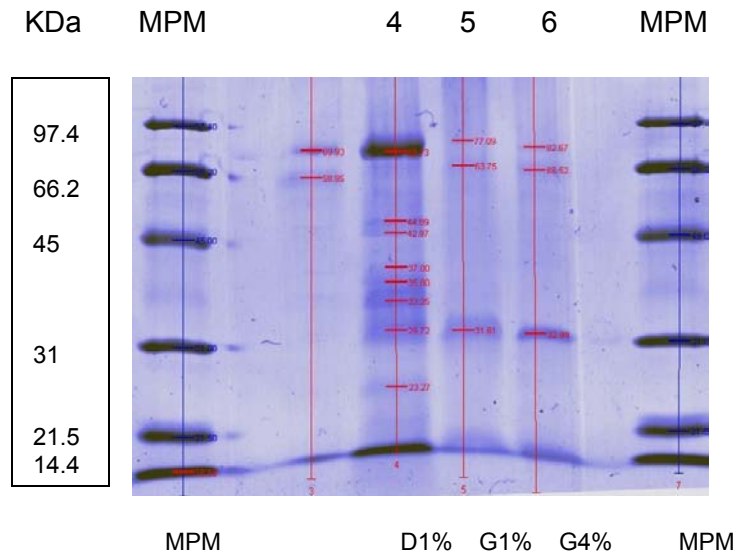
Caseína 1% en buffer de fosfatos 100 mM pH 7.0 a 37°C.

Los resultados indican que, a diferencia de lo observado por Díaz y Ruiz (15) la actividad proteolítica fue mínima. No obstante los bajos niveles, se puede observar que la cepa mutante presenta en todos los casos valores de actividad proteolítica mayor que la cepa silvestre: poco más de tres veces el valor en el medio con glucosa al 1%, el doble en el medio con glucosa al 4%. Sólo en el medio con dextrinas se observan valores muy similares en ambas cepas. Este comportamiento indica que la mutación generada en la cepa M2 puede ser una mutación pleiotrópica, que afectó algún gene involucrado con la sensibilidad a metabolismo a carbono, por lo que la actividad proteolítica también se ve afectada. Esta hipótesis se explorará parcialmente en la siguiente etapa del trabajo, en la que se evaluarán propiedades de las enzimas lipolíticas y de los genes que codifican para las mismas en ambas cepas.

#### **6.4 Patrón electroforético de las proteínas extracelulares**

A continuación se llevó a cabo el análisis del perfil electroforético de las proteínas extracelulares, obtenidas por la concentración de sobrenadantes del medio de fermentación de ambas cepas cultivadas en diferente fuente de carbono.

La Figura 6.7 muestra un gel electroforesis PAGE-SDS teñido con azul de Coomassie, los carriles 1 y 8 corresponden a marcadores de peso molecular MPM y las muestras al patrón electroforético de las proteínas extracelulares de *R. delemar* cepa silvestre a las 24 horas de fermentación con diferentes fuentes de carbono.



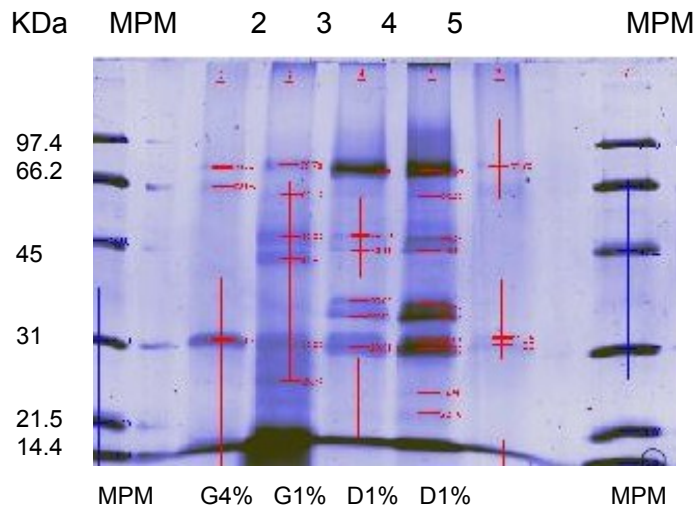
**Figura 6.7.** Perfil electroforético de las proteínas extracelulares de *Rhizopus delemar* WT. Electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturizantes, tinción con azul de Coomassie. El carril número 4 corresponde al medio con dextrina al 1%, el carril número 5 a glucosa al 1% y el número 6 a glucosa al 4%. Muestra con 50 µg de proteína.

Los resultados muestran que en los medios con glucosa al 1 y 4% sólo se expresa la proteína con el peso molecular de 29.72 KDa. En el medio con dextrina al 1% se encontraron proteínas con los siguientes pesos moleculares: 23.27, 29.72, 33.35, 35.80, 37.80, 42.97, 44.89 y 69.93 KDa.

La Figura 6.8 muestra el patrón electroforético de las proteínas extracelulares de *R. delemar* M2. Los resultados obtenidos indican que, efectivamente, el perfil electroforético de las dos cepas difiere entre si y de acuerdo a las condiciones de cultivo empleadas. En todas las condiciones se aprecia una banda de 29.72 KDa en el caso de la cepa silvestre y de 31.22 KDa, en el de la mutante M2, cercanas al peso molecular de 30 y 30.3 KDa reportados por Kohno (55) y Haas (32) respectivamente, para la lipasa de *R. delemar*. Sin embargo, no se llevó a cabo un gel de actividad *in situ*, para determinar que proteína presenta esta actividad.

Los resultados obtenidos indican que el perfil electroforético de las dos cepas difiere entre sí y de acuerdo con las condiciones de cultivo empleadas. En todas las condiciones se

aprecia una banda de 29.72 KDa en el caso de la cepa WT y de 31.22 KDa en la cepa M2, ambas cercanas al peso molecular de 30 KDa reportados por Khono (55) y Haas (31) para las lipasas de *R. delemar*. Sin embargo, no se hicieron geles de actividad *in situ* para demostrar que estas bandas corresponden a las lipasas.



**Figura 6.8.** Perfil electroforético de las proteínas extracelulares de *R. delemar* M2

Electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturalizantes. Los carriles 1 y 8 corresponden a marcadores de peso molecular, el carril número 2 corresponde al medio con glucosa al 4%, el carril número 3 corresponde a glucosa al 1%, el carril 4 y 5 a dextrina al 1%.

El gel se tiñó con azul de Coomassie y se colocó 50µg de proteína.

## 6.5 Patrón de glicosilación de las proteínas extracelulares

Un elemento que puede modificar el peso molecular observado, así como el comportamiento de la enzima, es el patrón de glicosilación. A tal efecto, se llevó a cabo la determinación de carbohidratos en las proteínas extracelulares de *R. delemar* y los resultados indican que todas las proteínas secretadas, tanto por la cepa silvestre como por la cepa mutante están glicosiladas con manosa, ver Figura 6.9. El kit empleado (Dig Glycan Differentiation Kit, Roche) permite la identificación de los residuos de azúcares presentes por la interacción con lectinas específicas; para el caso de la manosa, este carbohidrato es reconocido por la lectina GNA.

Los resultados de la Figura 6.9 no permiten distinguir diferencias entre las enzimas provenientes de las dos cepas. Por tanto, de presentarse diferencias en comportamiento, no pueden ser atribuidas a esta característica.

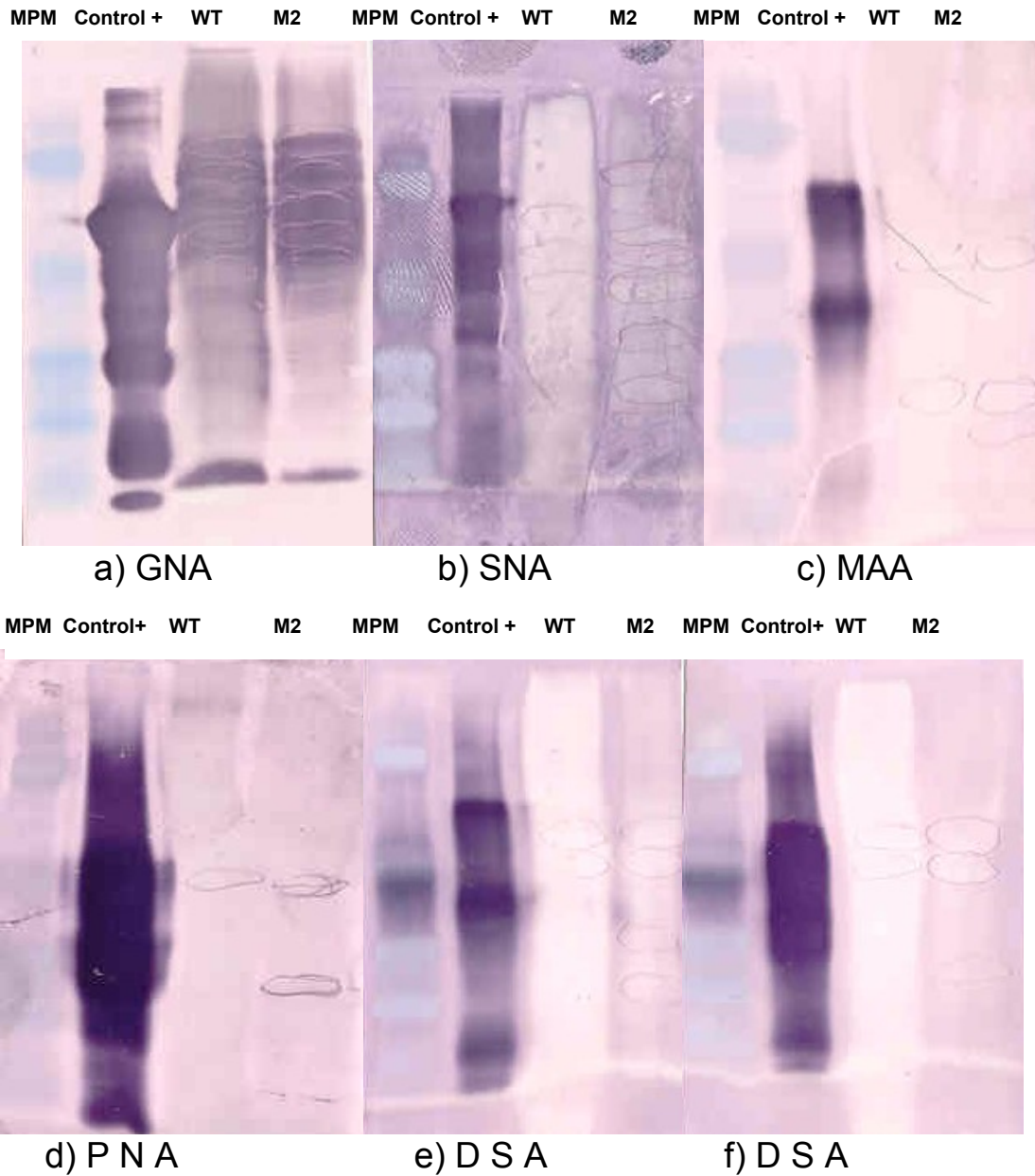
## 6.6 Perfil de AGL de los sustratos lácteos modificados

El uso de lipasas en modificación de sustratos lácteos ha sido ampliamente estudiado y existen comercialmente diversas enzimas disponibles. En particular, en este grupo de trabajo se ha explorado la utilización de las lipasas de *Rhizopus* (Gálvez, 2003). Por tanto, se exploró el efecto que generaba la aplicación de estas enzimas en sustratos lácteos. Se emplearon dos tipos de base: crema Alpura y mediacrema Nestlé, cuyas diferencias en composición se presentan a en la Tabla 6.5.

**Tabla 6.5** Información nutrimental de la crema y mediacrema

<b>Composición</b>	<b>Crema Alpura</b>	<b>Mediacrema Nestlé</b>
Lípidos	Crema de leche de vaca 30 g	Crema de leche de vaca 25% de grasa butírica
Carbohidratos	3.08 g Goma guar, carboximetil celulosa de sodio y carragenina	
Proteína	2.04 g	
Sodio	80 mg	
Calcio	70 mg	
Otros		Fosfato disódico

Información proporcionada por el proveedor en la etiqueta de producto para 100 g de crema Alpura y 100 g de mediacrema Nestlé.



**Figura 6.9.** Determinación de glicosilación de las proteínas de *R. delemar* cepa silvestre y mutante 2. Determinado con el kit Dig Glycan Differentiation Kit de Roche, las lectinas permiten identificar los siguientes carbohidratos: GNA, manosa 43terminal; SNA, galactosa 2-6; MAA, galactosa 2-3; PNA, galactosa-galactosamina, disacáridos unidos en enlaces o-glicosídicos; DSA reconoce galactosa-galactosamina en glicanos complejos, los cuales corresponden a los controles de cada caso..

La mediacrema contiene sólo crema de leche de vaca y fosfato disódico a diferencia de la crema Alpura, la cual contiene grasa de origen animal y carbohidratos empleados como estabilizantes de la emulsión.

El efecto de la enzima lipolítica sobre el sustrato lácteo es liberar ácidos grasos, que a su vez repercuten en el sabor generado. A continuación en la Tabla 6.6, se presenta el perfil basal de los mismos, obtenidos por cromatografía de gases.

La mediacrema Néstlé contiene mayor cantidad de los ácidos grasos láurico, mirístico y palmítico característicos de la grasa de la leche; llama la atención que contiene niveles mayores de los ácidos grasos palmitoleico y margárico, diez y veinte veces más que la crema Alpura respectivamente.

**Tabla 6.6** Perfil de ácidos grasos libres presentes en los sustratos lácteos  
Determinación por cromatografía de gases

Ácidos Grasos	No. Carbonos	Crema Alpura µg de ácido graso/gr de muestra	Mediacrema Nestlé µg de ácido graso/gr de muestra
Butírico	4	0.10	0.08
Caproico	6	0.02	0.03
Caprílico	8	0.01	0.02
Cáprico	10	0.03	0.04
Láurico	12	0.05	0.06
Mirístico	14	0.13	0.17
Pentadecanoico	15	0.02	0.02
Palmítico	16	0.44	0.50
<b>Palmitoleico</b>	<b>16-1</b>	<b>0.03</b>	<b>0.30</b>
<b>Margárico</b>	<b>17</b>	<b>0.01</b>	<b>0.20</b>
Esteárico	18	0.21	0.24
Oleico	18.1	0.40	0.42
Linoleico	18.2	0.04	0.04

El sabor generado en las cremas por el extracto enzimático de cada cepa fue completamente diferente, ver Tabla 6.7. La lipasa de la cepa silvestre genera un sabor agradable a queso madurado, en cambio, la lipasa de la cepa mutante genera un sabor astringente y desagradable. Es de llamar la atención que, a diferencia de lo observado en la cinética de crecimiento de ambas cepas (ver figuras 6.1 a 6.7), el pH ácido de la crema Alpura no afectó la actividad lipolítica.

**Tabla 6.7** Características de las cremas modificadas por los extractos enzimáticos de *R. delemar* WT y M2

Muestra	pH		Sabor
	Crema Alpura	Mediacrema Nestlé	
<b>Silvestre</b>	4.50	5.79	Queso madurado Agradable
<b>Mutante</b>	4.56	5.86	Astringente Desagradable
<b>Controles</b>	4.55	6.43	Característico

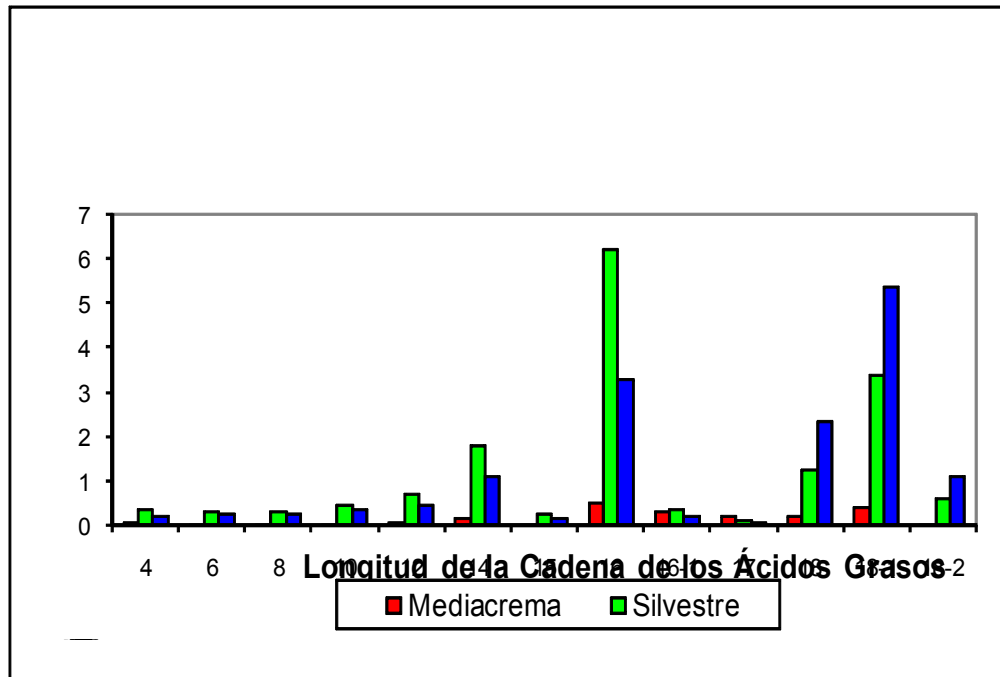
Los controles corresponden a la crema Alpura y a la Media crema Nestlé respectivamente

Los ácidos grasos generados de la hidrólisis de la mediacrema Nestlé y la crema Alpura por las lipasas de ambas cepas, confirman que el sabor generado corresponde a una especificidad por el sustrato diferente.

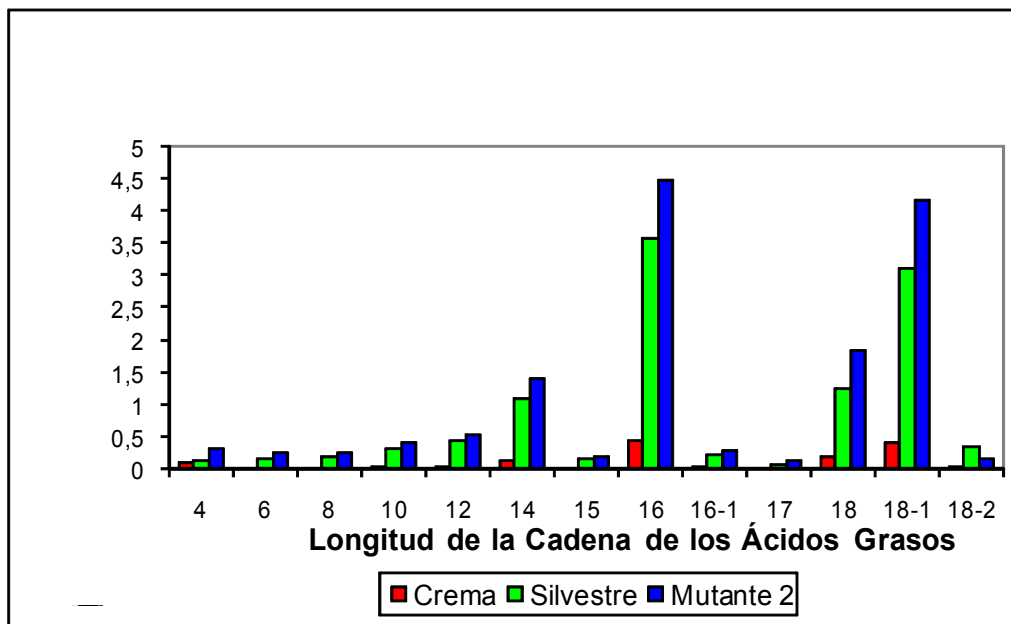
Los resultados de la modificación de la mediacrema (Figura 6.10), muestran que la lipasa de la cepa silvestre libera casi el doble de ácido palmítico que la lipasa de la cepa mutante, lo cual indica que este producto contiene grasa vegetal en una emulsión muy estable que sólo la lipasa de la cepa silvestre pudo hidrolizar.

La crema modificada con el extracto enzimático de la cepa mutante contiene alrededor de 30% más ácido esteárico, oleico y linoleico que la mediacrema modificada el extracto enzimático de la cepa silvestre.

En cambio, el perfil de ácidos grasos generado por la lipasas de ambas cepas en la crema Alpura fue diferente al obtenido con la mediacrema de Nestlé (Figura 6.11), en este caso la lipasa de la cepa mutante generó mayor proporción de cada ácido graso que la lipasa de la cepa silvestre. Sólo la proporción de ácido linoleico fue menor en la crema modificada con la lipasa de la cepa mutante.



**Figura 6.10** Perfil de Ácidos Grasos Liberados por las Lipasas de *R. delamar* WT y M2 a partir de Mediacrema Nestlé.



**Figura 6.11** Perfil de Ácidos Grasos Liberados por las Lipasas de *R. delamar* WT y M2 a partir de Crema Alpura.



## 6.7 Contenido de amoniaco de los sustratos lácteos modificados

Se encontraron niveles altos de amoniaco en la mediacrema Nestlé (Tabla 6.8), cerca de 40 mg/g de muestra, en contraste con los niveles encontrados en la crema Alpura. El extracto enzimático de la cepa silvestre bajó el nivel de amoniaco tanto en la crema Alpura como en la mediacrema Nestlé, aunque redujo más de tres veces el contenido de amoniaco en esta última.

La cepa M2 presenta mayores niveles de amoniaco en ambas cremas modificadas, superando tres veces los niveles de la cepa silvestre cuando el sustrato fue crema “Alpura”.

Los niveles de amoniaco en la mediacrema Nestlé disminuyeron con la modificación con ambos extractos enzimáticos. Sin embargo, es de llamar la atención que los niveles de amoniaco disminuyeran 3.5 veces en el caso de la modificación de la mediacrema Nestlé con el extracto enzimático de la cepa silvestre.

**Tabla 6.8** Determinación de amoniaco de las cremas modificadas por los extractos enzimáticos de de *R. delemar* WT y M2

<b>Muestra</b>	<b>Crema Alpura (mgNH<sub>3</sub>/g muestra)</b>	<b>Mediacrema Nestlé (mgNH<sub>3</sub>/g muestra)</b>
Silvestre	9.69 ± 0.145	11.10 ± 0.1414
Mutante 2	35.285 ± 0.862	32.72 ± 1.025
Controles	10.6 ± 0.282	39.57 ± 1.735

Los controles corresponden a sustratos lácteos.

Los niveles de amoniaco presentes en la crema Alpura modificada con la cepa silvestre son ligeramente menores con respecto al control. Sin embargo, estos niveles se vieron drásticamente incrementados con el extracto enzimático de la cepa mutante, de igual manera el pH del sustrato lácteo modificado se mantuvo ligeramente arriba que el control (Tabla 6.8). Estos resultados coinciden con la producción mayor de actividad proteolítica por parte de la cepa mutante.

Los resultados indican que existen claras diferencias en los perfiles de ácidos grasos generados por las dos cepas y que las diferencias en actividad proteolítica afectan la

generación de amonio, lo que repercute en los sabores percibidos. Si bien el fenómeno de generación de sabores y los factores involucrados en la generación de compuestos de sabor en productos lácteos son muy complejos quedan aún hipótesis por explorar. Una de ellas es que la cepa M2 haya sufrido una mutación en la secuencia de DNA que codifica para la lipasa y con ello modificar la especificidad por el sustrato y que los perfiles obtenidos puedan deberse a esto. Para saberlo, se aislaron los genes de ambas cepas, tal como se describe a continuación.

### 6.8 Análisis de los genes de lipasa de *R. delemar* obtenidos por PCR

A partir de la secuencia de cDNA clonada en el plásmido pUC8-2.14, se diseñaron primers específicos para el aislamiento del gene en la cepa silvestre.

FORLIP                    5' ATCCCTTT TCTTCT TACCCC

REVLIP                    5' TTTATTATAAAATTAGAGTAACACGT

Se establecieron condiciones de amplificación que permitieron la obtención de un único producto de 1.3 Kb con los cebadores FORLIP y REVLIP (Figura 6.13). El tamaño es similar al obtenido con los controles positivos y al fragmento correspondiente al cDNA de lipasa clonado en el plásmido pUC8-2.14 obtenido a partir de la digestión con Eco RI. Los resultados anteriores indican que el gen no presenta intrones, coincidiendo con los demás genes reportados para este género (Haas, 1991; Kugimiya, 1992 y Beer, 1998). Con respecto a la secuencia de estos productos de amplificación, no existe diferencia con la reportada por Haas.

Buscando diferencias en las regiones regulatorias del gen, se diseñaron los siguientes primers:

Bam HI

FORLIP95            5' ATAGGATCCGCTTTGTGTGATG

Eco RI

REVLIP96            5' AGGAATTCAAGTTTGAAGTTGAGG

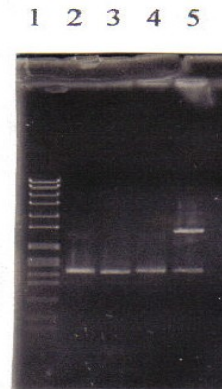
Se establecieron nuevas condiciones de amplificación con afinidad baja, intermedia y alta.

**Figura 6.13.** Amplificación del gene de lipasa de *R. delemar*

1. MPM
2. cDNA gene de lipasa (Haas,1991)
3. Producto de PCR *R. delemar* WT
4. Producto de PCR *R. delemar* M2
5. pUC8.14 digerido con Eco RI

Marcador de  
Peso Molecular

8576  
7424  
6106  
4899  
6639  
2799  
1953  
1882  
1515  
**1482**  
**1164**  
992  
718  
710  
492  
359



Los resultados obtenidos en la amplificación el gene de lipasa con la región promotora en condiciones de baja afinidad fue inespecífica, ya que se obtuvieron productos desde 1 hasta 3 Kb, aunque en mayor proporción el producto esperado de 1.5 Kb.

En la condición de alta afinidad se obtuvo el producto de 1.5 Kb y productos menores (Figura 6.14). Sin embargo, la concentración del producto esperado fue menor.

**Figura 6.14.** Amplificación de productos de PCR en condiciones diferentes de afinidad

Carril	Muestra
1	Marcador de peso molecular
2	Baja afinidad
3	Alta afinidad

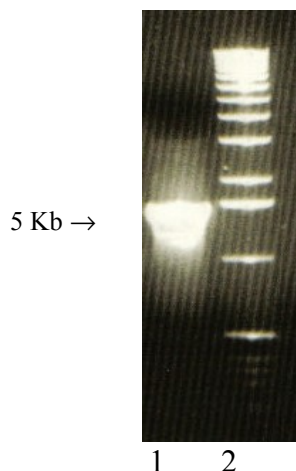


1.5 pb

Las condiciones óptimas de amplificación del gene de lipasa con los cebadores FORLIP95 y REVLIP96, fueron de afinidad intermedia ya que se obtuvo un único producto de 1.5 Kb en alta concentración (Figuras 6.14 y 6.15) tanto para la cepa silvestre como para la cepa mutante.

**Figura 6.15.** Amplificación del gene de lipasa de *R. delemar* WT en condiciones de afinidad intermedia.

- 1 Producto de PCR purificado 1.5 Kb
- 2 MPM 1Kb



← 2 Kb

Recientemente se ha integrado la información conocida en cuanto a secuencia, estructura y función de las lipasas en el Lipase Engineering Database (LED) ver Apéndice 5, tales proteínas son asignadas a familias homólogas y superfamilias basadas en la similitud de la secuencia y estructura del agujero del oxianión. En este sentido, las proteínas fueron agrupadas en dos clases, la clase GX y la clase GGGX. La clase GX consiste de 11 superfamilias y 22 familias homólogas, las cuales contienen 376 proteínas con 600 secuencias y 125 cadenas de estructura conocida. La clase GGGX consiste de 5 superfamilias y 16 familias homólogas incluyendo 430 proteínas con 767 secuencias y 73 cadenas de estructura conocida. Esta clase comprende esterasas bacterianas,  $\alpha$ -esterasas, carboxilesterasas eucarióticas, lipasas activadas con las sales biliares, esterasas hormona-juvenil, lipasas hormona-sensibles, acetilcolinesterasas y tioesterasas, así como gliotactina, glutactina, neurotactina, neurologina y tiroglobulina (40).

La lipasa de *Rhizopus* pertenece a la clase GX que corresponde principalmente a lipasas bacterianas y fungales, lipasas eucarióticas (lipasa hepática, lipasa pancreática, lipoproteína, lipasa gástrica y lipasas ácidas lisosomales), cutinasas, fosfolipasas y peroxidasas no-hemo. Sin embargo, a pesar de las diferencias encontradas en los niveles de producción de lipasa y la afinidad por el sustrato, el alineamiento de las secuencias tanto de la región codificadora como de la región regulatoria indica que la cepa mutante M2 no contiene una mutación en este gene, ver Figuras 6.16 y 6.17. Por lo que es necesario analizar la mutante en otras zonas, principalmente en los secuencias de regulación a carbono.

**Figura 6.16** Alineamiento del gene de lipasa de *R. niveus* con número de acceso en el Genebank D13206 con el producto de PCR de *R. delemar* WT realizado con el programa ClustalW.

```

D13206      1  AATCAGTCGTAACAATAATTGATTACTTGGTACTACTATTAAATGTACCT    50
              |||
WT          1  TAACAATAATTGATTACTTGGTACTACTATTAAATGTACCT    41

D13206     51  AATTCATCGAGGGGTACAATGTCGCGTGGATAAATGCCATTGGTCTC    98
              |||
WT          42  AATTCATCGAGGGGTACAATGTCGCGTGGATAAATGCCATTGGTCTC    91

D13206     99  GCTATTTTTTGAAC-AAAAAACATATAAATAGAGGCCAGTTTATGTTA    147
              |||
WT          92  GCTATTTTTTGAACAAAAAACATATAAATAGA-GCAAGTTTATGTTA    140

D13206    148  TGTTC AAGTCTCTATCTTCATCAAGTCAAAGTGATACAGACTCTTCTTT    197
              |||
WT          141  TGTTC AAGTCTCTATCTTCATCAAGTCAAT-TGATACAGACTCTTCTTT    189

D13206    198  CTTTTCTTCTTACCCTTCCAGTCTTTACTATCAATCATGGTTTCATTC    247
              |||
WT          190  CTTTTCTTCTTACCCTTCCAGTCTTTACTATCAATCATGGTTTCATTC    239

D13206    248  ATTTCCATTTCTCAAGGTGTAGTCTTTGTCTTCTGTCTCTTCCATGAT    297
              |||
WT          240  ATTTCCATTTCTCAAGGTGTAGTCTTTGTCTTCTGTCTCTTCCATGAT    289

D13206    298  GCTCGGTCATCTGCTGTTCTGTCTTCTGGTAAATCTGGATCTTCCAACA    347
              |||
WT          290  GCTCGGTCATCTGCTGTTCTGTCTTCTGGTAAATCTGGATCTTCCAACA    339

D13206    348  CCGCCGCTCTGCATCTGACAATGCTGCCCTCCCTCCTCTCATCTCCAGC    397
              |||
WT          340  CCGCCGCTCTGCATCTGACAATGCTGCCCTCCCTCCTCTCATCTCCAGC    389

D13206    398  CGTTGTGCTCCTCTCTAACAAGGGAAGTAAAAGCGATCTCCAAGCTGA    447
              |||
WT          390  CGTTGTGCTCCTCTCTAACAAGGGAAGTAAAAGCGATCTCCAAGCTGA    439

D13206    448  ACCTTACAACATGCAAAAGAATACAGAATGGTATGAGTCCCATGGTGGCA    497
              |||
WT          440  ACCTTACAACATGCAAAAGAATACAGAATGGTATGAGTCCCATGGTGGCA    489

D13206    498  ACCTGACATCCATCGGAAAGCGTGATGACA ACTTGGTTGGTGGCATGACT    547
              |||
WT          490  ACCTGACATCCATCGGAAAGCGTGATGACA ACTTGGTTGGTGGCATGACT    539

D13206    548  TTGACTTACCCAGCGATGCTCCTCTATCAGCCTCTCTAGCTCTACCAA    597
              |||
WT          540  TTGACTTACCCAGCGATGCTCCTCTATCAGCCTCTCTAGCTCTACCAA    589

D13206    598  CAGCGCTCTGATGGTGGTAAGGTTGTTGCTGCTACTACTGCTCAGATCC    647
              |||
WT          590  CAGCGCTCTGATGGTGGTAAGGTTGTTGCTGCTACTACTGCTCAGATCC    639

D13206    648  AAGAGTTCACCAAGTATGCTGGTATCGCTGCCACTGCCTACTGTCGTTCT    697
              |||
WT          640  AAGAGTTCACCAAGTATGCTGGTATCGCTGCCACTGCCTACTGTCGTTCT    689
    
```

D13206	698	GTTGTCCCTGGTAACAAGTGGGATTGTGTCCAATGTCAAAAGTGGGTTC	747
WT	690	GTTGTCCCTGGTAACAAGTGGGATTGTGTCCAATGTCAAAAGTGGGTTC	739
D13206	748	TGATGGCAAGATCATCACTACCTTTACCTCCTTGCTTCCGATACAAATG	797
WT	740	TGATGGCAAGATCATCACTACCTTTACCTCCTTGCTTCCGATACAAATG	789
D13206	798	GTTACGTCTTGAGAAGTGATAAACAAAAGACCATTTATCTTGTTTTCCGT	847
WT	790	GTTACGTCTTGAGAAGTGATAAACAAAAGACCATTTATCTTGTTTTCCGT	839
D13206	848	GGTACCAACTCCTTCAGAAGTGCCATCACTGATATCGTCTTCAACTTTTC	897
WT	840	GGTACCAACTCCTTCAGAAGTGCCATCACTGATATCGTCTTCAACTTTTC	889
D13206	898	TGACTACAAGCCTGTCAAGGGCGCCAAAGTTCATGCTGGTTTCCTTTCCT	947
WT	890	TGACTACAAGCCTGTCAAGGGCGCCAAAGTTCATGCTGGTTTCCTTTCCT	939
D13206	948	CTTATGAGCAAGTTGTCAATGACTATTTCCCTGTCGTCCAAGAACAATTG	997
WT	940	CTTATGAGCAAGTTGTCAATGACTATTTCCCTGTCGTCCAAGAACAATTG	989
D13206	998	ACCGCCACCTACTTATAAGGTCATCGTTACCGGTCACTCACTCGGTGG	1047
WT	990	ACCGCCACCTACTTATAAGGTCATCGTTACCGGTCACTCACTCGGTGG	1039
D13206	1048	TGCACAAGCTTTGCTTGCCGGTATGGATCTCTACCAACGTGAACCAAGAT	1097
WT	1040	TGCACAAGCTTTGCTTGCCGGTATGGATCTCTACCAACGTGAACCAAGAT	1089
D13206	1098	TGTCTCCAAGAATTTGAGCATCTTCACTGTCCGGTGGTCCCTCGTGTGGT	1147
WT	1090	TGTCTCCAAGAATTTGAGCATGTTCACTGTCCGGTGGTCCCTCGTGTGGT	1139
D13206	1148	AACCCACCTTTGCTTACTATGTTGAATCCACCGGTATCCCTTTCCAACG	1197
WT	1140	AACCCACCTTTGCTTACTATGTTGAATCCACCGGTATCCCTTTCCAACG	1189
D13206	1198	TACCGTTCACAAGAGAGATATCGTTCCTCACGTTCCCTCCTCAATCCTTCG	1247
WT	1190	TACCGTTCACAAGAGAGATATCGTTCCTCACGTTCCCTCCTCAATCCTTCG	1239
D13206	1248	GATTCTTCATCCCGGTGTTGAATCTTGATCAAGTCTGGTACTTCCAAC	1297
WT	1240	GATTCTTCATCCCGGTGTTGAATCTTGATCAAGTCTGGTACTTCCAAC	1289
D13206	1298	GTTCAAATCTGTACTTCTGAAATTGAAACCAAGGATTGCAGTAACTCTAA	1346
WT	1290	GTTCAAATCTGTACTTCTGAAATTGAAACCAAGGATTGCAGTAACTCTAA	1339
D13206	1347	TCGTTCCCTTTCACCTCTATCCTTGACCCTTGAGTACTTTGATATCAAC	1396
WT	1340	TCGTTCCCTTTCACCTCTATCCTTGACCCTTGAGTACTTTGATATCAAC	1385
D13206	1397	GAAGGAAGCTGTTTG <span style="background-color: yellow;">TAA</span> AACACTTGACGTGTTACTCTAATTTTATAATA	1446
WT	1386	GAAGGAAGCTGTTTG <span style="background-color: yellow;">TAA</span> AACACTTGACGTGTTACTCTAATTTTCAATA	1420
D13206	1447	AAATTAAGTTTTTATAACAATAAATTTTTGCATGTCTATACATAATTTAGA	1496
		.	
WT	1421	AAAA	1424

**Figura 6.17** Alineamiento del gene de lipasa de *R. niveus* con número de acceso en el Genbank D13206 con el producto de PCR de *R. delemar* M2 realizado con el programa ClustalW.

D13206	1	AATCAGTCGTAACAATAATTGATTACTTGGTACTACTATTTAAATG	45
M2	1	AGAGGAATCAGTCGTAACAATAATTGATTACTTGGTACTACTATTTAAATG	50
D13206	46	TACCTAATTTTCATGAGGGGTTACAATGT-GCGTGGATAAAATTGCCATTGG	94
M2	51	TACCTAATTTTCATGAGGGGTTACAATGTAGCGTGGATAAAATTGCCATTGG	100
D13206	95	TCTCGCTATTTTTTGAAC-AAAAAAAAACA <b>TATAA</b> ATAGAGGCCAGTTTAT	143
M2	101	<b>TCTCGCTATTTTTTGAACAAAAAAAAACA TATAA ATAGA</b> -GCAAGTTTAT	149
D13206	144	GTTATGTTCAAGTCTCTATCTTCATCAAGTCAAAGTGATACAGACTCTTC	193
M2	150	GTTATGTTCAAGTCTCTATCTTCATCAAGTCAAT-TGATACAGACTCTTC	198
D13206	194	<b>TTTTCTTTTCTTCTTACCCCTTCCAGTTCTTTACTATCAATC ATGGTTTC</b>	243
M2	199	TTTTCTTTTCTTCTTACCCCTTCCAGTTCTTTACTATCAATC <b>ATG</b> GTTTC	248
D13206	244	ATTCATTTCCATTTCTCAAGGTGTTAGTCTTTGTCTTCTTGCTCTTCCA	293
M2	249	ATTCATTTCCATTTCTCAAGGTGTTAGTCTTTGTCTTCTTGCTCTTCCA	298
D13206	294	TGATGCTCGGTTTCATCTGCTGTTCCCTGTTTCTGGTAAATCTGGATCTTCC	343
M2	299	TGATGCTCGGTTTCATCTGCTGTTCCCTGTTTCTGGTAAATCTGGATCTTCC	348
D13206	344	AACACCGCGTCTCTGCATCTGACAATGCTGCCCTCCCTCCTCTCATCTC	393
M2	349	AACACCGCGTCTCTGCATCTGACAATGCTGCCCTCCCTCCTCTCATCTC	398
D13206	394	CAGCCGTTGTGCTCCTCCTTCTAACAAGGGAAGTAAAAGCGATCTCCAAG	443
M2	399	CAGCCGTTGTGCTCCTCCTTCTAACAAGGGAAGTAAAAGCGATCTCCAAG	448
D13206	444	CTGAACCTTACAACATGCAAAAAGAATACAGAATGGTATGAGTCCCATGGT	493
M2	449	CTGAACCTTACAACATGCAAAAAGAATACAGAATGGTATGAGTCCCATGGT	498
D13206	494	GGCAACCTGACATCCATCGGAAAGCGTGATGACAACCTGGTTGGTGGCAT	543
M2	499	GGCAACCTGACATCCATCGGAAAGCGTGATGACAACCTGGTTGGTGGCAT	548
D13206	544	GACTTTGGACTTACCCAGCGATGCTCCTCCTATCAGCCTCTCTAGCTCTA	593
M2	549	GACTTTGGACTTACCCAGCGATGCTCCTCCTATCAGCCTCTCTAGCTCTA	598
D13206	594	CCAACAGCGCCTCTGATGGTGGTAAGGTTGTTGCTGCTACTACTGCTCAG	643
M2	599	CCAACAGCGCCTCTGATGGTGGTAAGGTTGTTGCTGCTACTACTGCTCAG	648

D13206	644	ATCCAAGAGTTCACCAAGTATGCTGGTATCGCTGCCACTGCCTACTGTCTG	693
M2	649	ATCCAAGAGTTCACCAAGTATGCTGGTATCGCTGCCACTGCCTACTGTCTG	698
D13206	694	TTCTGTTGTCCCTGGTAACAAGTGGGATTGTGTCCAATGTCAAAAGTGGG	743
M2	699	TTCTGTTGTCCCTGGTAACAAGTGGGATTGTGTCCAATGTCAAAAGTGGG	748
D13206	744	TTCTGATGGCAAGATCATCACTACCTTTACCTCCTTGCTTTCCGATACA	793
M2	749	TTCTGATGGCAAGATCATCACTACCTTTACCTCCTTGCTTTCCGATACA	798
D13206	794	AATGGTTACGTCTTGAGAAGTGATAAACAAAAGACCATTTATCTTGTTTT	843
M2	799	AATGGTTACGTCTTGAGAAGTGATAAACAAAAGACCATTTATCTTGTTTT	848
D13206	844	CCGTGGTACCAACTCCTTCAGAAGTGCCATCACTGATATCGTCTTCAACT	893
M2	849	CCGTGGTACCAACTCCTTCAGAAGTGCCATCACTGATATCGTCTTCAACT	898
D13206	894	TTTCTGACTACAAGCCTGTCAAGGGCGCCAAAGTTCATGCTGGTTTCCTT	943
M2	899	TTTCTGACTACAAGCCTGTCAAGGGCGCCAAAGTTCATGCTGGTTTCCTT	948
D13206	944	TCCTCTTATGAGCAAGTTGTCAATGACTATTTCCCTGTCGTCCAAGAACA	993
M2	949	TCCTCTTATGAGCAAGTTGTCAATGACTATTTCCCTGTCGTCCAAGAACA	998
D13206	994	ATTGACCGCCACCCTACTTATAAGGTCATCGTTACCGGTCACTCACTCG	1043
M2	999	ATTGACCGCCACCCTACTTATAAGGTCATCGTTACCGGTCACTCACTCG	1048
D13206	1044	GTGGTGACAAGCTTTGCTTGCCGGTATGGATCTCTACCAACGTGAACCA	1093
M2	1049	GTGGTGACAAGCTTTGCTTGCCGGTATGGATCTCTACCAACGTGAACCA	1098
D13206	1094	AGATTGTCTCCCAAGAATTTGAGCATCTTCACTGTCGGTGGTCCTCGTGT	1143
M2	1099	AGATTGTCTCCCAAGAATTTGAGCATCTTCACTGTCGGTGGTCCTCGTGT	1148
D13206	1144	TGGTAACCCACCTTTGCTTACTATGTTGAATCCACCGGTATCCCTTTC	1193
M2	1149	TGGTAACCCACCTTTGCTTACTATGTTGAATCCACCGGTATCCCTTTC	1198
D13206	1194	AACGTACCGTTCACAAGAGAGATATCGTTCCTCACGTTCCCTCCTCAATCC	1243
M2	1199	AACGTACCGTTCACAAGAGAGATATCGTTCCTCACGTTCCCTCCTCAATCC	1248
D13206	1244	TTCGGATTCCCTTCATCCCGGTGTTGAATCTTGGATCAAGTCTGGTACTTC	1293
M2	1249	TTCGGATTCCCTTCATCCCGGTGTTGAATCTTGGATCAAGTCTGGTACTTC	1298
D13206	1294	CAACGTTCAAATCTGTACTTCTGAAATTGAAACCAAGGATTGCAGTAACT	1343
M2	1299	CAACGTTCAAATCTGTACTTCTGAAATTGAAACCAAGGATTGCAGTAACT	1348
D13206	1344	CTATCGTTCCTTTCACCTCTATCCTTGACCACTTGAGTACTTTGATATC	1393
M2	1349	CTATCGTTCCTTTCACCTCTATCCTTGACCACTTGAGTACTTTGATATC	1398
D13206	1394	AACGAAGGAAGCTGTTGTAAACACTTGACGTGTTACTCTAATTTTATA	1443
M2	1399	AACGAAGGAAGCTGTTGTAAACACTTGACGTGTTACTCTAATTTTATA	1448



D13206	1444	ATAAAATTAAGTTTTTATACAATAAATTTTTGCATGTCTATACATAATTT	1493
M2	1449	ATAAAATTAAGTTTTTATACAATAAATTTTTGCATGTCTATACATAATTT	1498
D13206	1494	AGAACATAACCTCAACTTCAAACCTGTATATCAATAGCTCTTCTCATTCT	1543
M2	1499	AGAAC	1503
D13206	1544	ATCTCGCCCATTTGTAAAACAGTGTTTCATAGAGCCATTTATATTAGACGT	1593
M2	1504		1503
D13206	1594	ATTCTAT	1600
M2	1504		1503

## 6.9 Plásmidos recombinantes

Al realizarse el análisis de restricción de la secuencia codificadora reportada para el gene de lipasa de *R. delamar* (30), se encontraron los sitios de restricción Ava II, Hind III, Kpn I y Nco I presentes también en los plásmidos pDC1 y pDE1, por lo que se trabajó con los plásmidos pMS12 y pLJ16. Para tener suficiente cantidad de estos plásmidos se transformó *E. coli* DH10B. La eficiencia de transformación fue diferente para cada plásmido. Para el pMS12 fue de  $6 \times 10^5$  transformates/ $\mu\text{g}$  DNA, en tanto que la obtenida para el pLJ16 fue de  $1.08 \times 10^6$  transformates/ $\mu\text{g}$  DNA.

De primera instancia se emplearon los plásmidos pLJ16 y pMS12 para construir los plásmidos recombinantes con los fragmentos de PCR obtenidos para cada cepa. Sin embargo, se obtuvo una frecuencia de transformación muy baja en *E. coli*, alrededor de  $10^2$  transformantes/ $\mu\text{g}$  de DNA para el pMS12. Debido a los resultados anteriores, se planteó diseñar los plásmidos recombinantes utilizando sólo el plásmido pLJ16 el cual tuvo una eficiencia de transformación mayor que el pMS12. Adicionalmente, cuando se pretendió hacer una maxiprep para tener suficiente cantidad de plásmidos, las cepas de *E. coli* que contenían dichos plásmidos crecieron pobremente. No obstante, se obtuvo una cantidad suficiente para transformar *A. nidulans*. Sin embargo, no se obtuvieron transformantes con ninguno de los plásmidos antes mencionados.

## 6.10 *A. nidulans* como hospedero

Los sistemas fungales representan interés para la industria de producción de enzimas por la alta capacidad de secreción. Sin embargo, los casos reportados han sido realizados por industrias y no existe gran disponibilidad de vectores. Incluso en el terreno académico, no fue fácil conseguir vectores fungales para realizar las pruebas.

En este trabajo se pretendió hacer una primera exploración del sistema de *A. nidulans* como hospedero para la producción de lipasas. Es el hongo mejor conocido genéticamente y su genoma está ahora disponible. En la literatura no existen prácticamente reportes de lipasas producidas por la especie, a excepción de Mayordomo (67), García Lepe (20) y el caso de Peña en el grupo de trabajo.

A continuación se presentan resultados de la caracterización de *A. nidulans* como organismo hospedero para el sistema de clonación de lipasa, comparando su comportamiento con el de la cepa donadora, esto es, *R. delemar* WT.

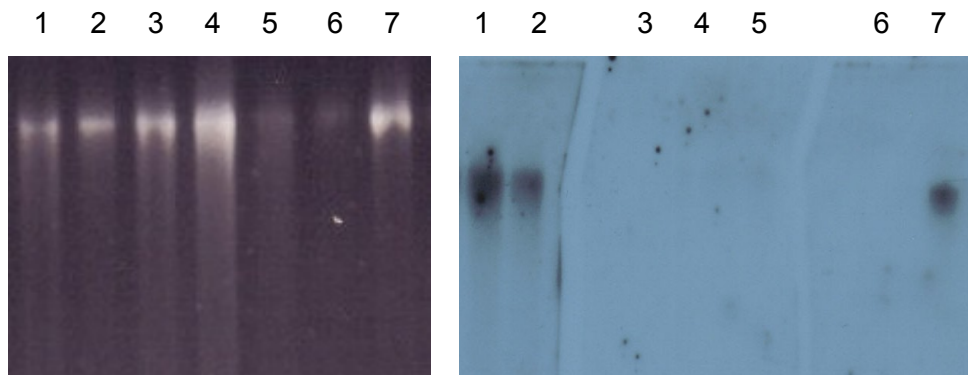
Se determinó la actividad lipolítica a las cepas empleadas en este trabajo con dos técnicas diferentes el método de caída de pH y un método espectrofotométrico, los resultados obtenidos se reportan en la Tabla 6.9. Como se puede observar, la actividad lipolítica del extracto enzimático de *A. nidulans* PW1 se manifiesta mejor con el método de caída de pH. Sin embargo, este nivel de actividad lipolítica es mínima comparada con la obtenida por *R. delemar* WT. En cambio, la lipasa de *Rhizopus delemar* no es posible detectarla con el método espectrofotométrico. Esta diferencia en el comportamiento sugiere que pueden tratarse de esterasa y lipasa, respectivamente, lo que se podrá comprobar con el análisis de la secuencia génica o de aminoácidos de *A. nidulans*. Cabe señalar que en su genoma reportado se encuentran numerosas secuencias putativas para esta actividad.

En lo que respecta a la actividad en medio sólido, *A. nidulans* presenta un halo de actividad lipolítica bien definido en medio mínimo utilizando como única fuente de carbono tributirina al 1%.

**Tabla 6.9** Determinación de actividad lipolítica de *A. nidulans* y *R. delemar*

Método de Determinación de Actividad Lipolítica	<i>Aspergillus nidulans</i> PW1	<i>Rhizopus delemar</i>
<b>Caída de pH</b> Sustrato: Tributirina UI/mL de Enzima	0.32 ± 0.003	11.04 ± 0.0001
<b>Espectrofotométrico</b> Sustrato: <i>o</i> -Nitrofenil laurato UI/mL de Enzima	0.0043 ± 0.0001	---

Los resultados de la hibridación del DNA genómico de *Aspergillus* con la sonda específica para el gene de lipasa de *R. delemar* (Figura 6.18), mostraron que el gene de lipasa de *R. delemar* presenta cierta homología con el material genético de *A. nidulans*; en cambio con *Penicillium candidum* y *P. camembert* no presentan homología.



**Figura 6.18** Hibridación del DNA cromosomal con sonda específica para la lipasa de *Rhizopus*.

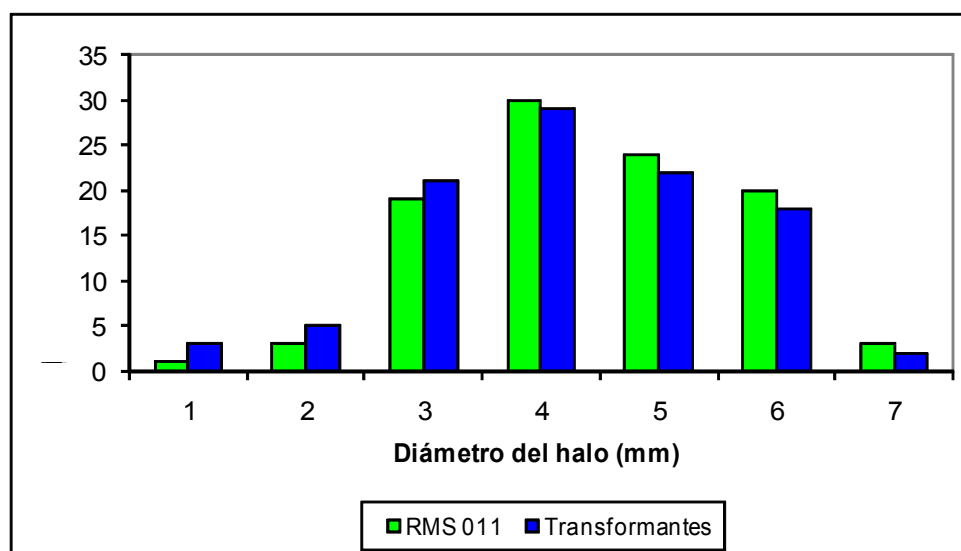
Condiciones de lavado: 2X SSC 1% de SDS y 0.5X de SSC, 0.1% de SDS. Carriles 1 y 2 *R. delemar*, 3 y 4 *Penicillium candidum*, 5 y 6 *P. camembert* y 7 *A. nidulans*.

Los resultados obtenidos en la caracterización de la cepa de *A. nidulans* PW1 como hospedero nos indican que su genotipo y fenotipo no nos permite reconocer transformantes positivas para los genes heterólogos de lipasa de *R. delemar* WT y M2, por lo que no es recomendable usarla para este sistema en particular.

Durante el desarrollo del presente trabajo, se obtuvo dentro del grupo de trabajo la mutante de *A. nidulans* CP309 con actividad lipolítica reducida, lo que permitió utilizar dicha cepa como organismo hospedero fungal y llevar a cabo los experimentos de transformación.

### 6.11 Transformación genética de *A. nidulans*

De los experimentos de cotransformación de *A. nidulans* con los plásmidos pDHG25 y pUC8-2.14, se obtuvieron 230 transformantes positivas para el plásmido pDHG25, las cuales se crecieron en medio selectivo (medio mínimo "A" con PABA, tributirina 1%, sin arginina). Sin embargo, no fue posible determinar la actividad lipolítica de la enzima clonada en el plásmido pUC8-2.14 debido a que en primer lugar, el plásmido no presenta una secuencia de reconocimiento para organismos eucariotes y por otro lado la cepa RM011 es productora de lipasa. En la Figura 6.19 se observa la variabilidad de los halos de hidrólisis tanto de la cepa silvestre como de las transformantes. En relación al comportamiento de los plásmidos introducidos, no se observó la presencia de plásmidos libres, a pesar de que el pDHG25 es de replicación autónoma.



**Figura 6.19** Variabilidad del halo de hidrólisis en medio sólido de las transformantes obtenidas con los plásmidos pDHG25 y pUC8-2.14.

Con los plásmidos recombinantes se transformó protoplastos de la cepa *Aspergillus nidulans* CP309 con actividad lipolítica reducida. Sin embargo, no se obtuvieron transformantes.

Se presume que la inestabilidad de las construcciones puede deberse a varios factores, el primero es que los fragmentos no se clonaron en el vector, que el tamaño de los plásmidos recombinantes provoque su inestabilidad o que hubiera existido un evento de recombinación con el DNA genómico, mismo que se favorece debido al alto número de secuencias homólogas a lipasas, esterases y cutinasas, por lo que no resultan vectores adecuados.

# CONCLUSIONES

## 7

### ESTUDIOS FISIOLÓGICOS

#### **La cepa silvestre de *Rhizopus delemar*:**

- ♦ Presenta actividad lipolítica desde las 18 horas de fermentación en medio con glucosa al 1% y tiene el máximo de producción a las 72 h.
- ♦ Es sensible al efecto negativo ejercido por la glucosa al 4%.
- ♦ Con dextrinas al 1% alcanza su máxima actividad lipolítica a las 72 horas de fermentación.
- ♦ La lipasa tiene un peso molecular de 29.72 KDa.
- ♦ Genera sabor agradable a queso madurado en sustratos lácteos.

#### **La cepa mutante M2 de *R. delemar*:**

- ♦ Mantiene el fenotipo mutante insensible al efecto negativo de la glucosa.
- ♦ Presenta mayor actividad lipolítica a las 18 h de fermentación en medio con glucosa al 1%.
- ♦ Es hiperproductora en actividad lipolítica con respecto a la cepa silvestre, en el medio con dextrina 1% presenta 5 veces más actividad lipolítica específica.
- ♦ La lipasa se expresa en las tres fuentes de carbono con un peso molecular de 31.22 KDa.
- ♦ Genera sabor astringente y desagradable en sustratos lácteos.

#### **Las lipasas de la cepa silvestre y mutante M2 de *R. delemar*:**

- ♦ Presentan máxima actividad lipolítica en medio con dextrinas al 1%.
- ♦ Generan perfiles de ácidos grasos diferentes en sustratos lácteos.
- ♦ Las proteínas de ambas cepas están glicosiladas con manosa.

## ESTUDIOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

- ♦ Se aislaron los genes de lipasa de *R. delemar* WT y M2 por PCR en condiciones de afinidad intermedia.
- ♦ El gene de lipasa es altamente conservado en el género *Rhizopus*.
- ♦ El gene de lipasa de la cepa mutante no presenta mutaciones.
- ♦ *A. nidulans* presenta homología con el gene de lipasa de *R. delemar*.
- ♦ Las construcciones del plásmido pILJ16 y los productos de PCR que contienen los genes de lipasa de *R. delemar* WT y M2 son inestables y no generaron transformantes en *A. nidulans*

# RECOMENDACIONES

## 8

Se proponen las siguientes recomendaciones para este trabajo

- Para caracterizar las proteínas de cada cepa, se recomienda:
  - Hacer la cinética de crecimiento.
  - Electroforesis en condiciones no desnaturizantes acopladas con geles de actividad *in situ* para lipasas y proteasas.
  - Purificar la lipasa de cada cepa.
  
- Modificar sustratos lácteos con las lipasas purificadas de cada cepa.
  
- Aislar y secuenciar al menos 1000 bases “rio arriba” de los genes de lipasa para identificar regiones regulatorias.
  
- Utilizar plásmidos para *Aspergillus* que contengan un promotor fuerte que asegure la expresión del gene de lipasa de *Rhizopus*.



# REFERENCIAS

## 9

1. Aikat, K., Maiti, T.K. y Bhattacharyya, B.C. 2001. Decolorization and purification of crude protease from *Rhizopus oryzae* by activated charcoal and its electrophoretic analysis. *Biotechnol. Lett.* 23:295-301.
2. An, Z., Farman, M. L., Budde, A., Taura, S. y Leong, S. A. 1996. New cosmid vectors for library construction, chromosome walking and restriction mapping in filamentous fungi. *Gene* 176: 93-96.
3. Arenas, B.D. 1998. Aceleración en la maduración de quesos mediante lipasas de *Penicillium caseicolum* encapsuladas en liposomas. Tesis para obtener el Título de Químico en Alimentos. Facultad de Química, UNAM. México, D.F.
4. Ballance, D.J.; Buxton, F.P. y Turner, G. 1983. Transformation of *Aspergillus nidulans* by the orotidine-5'-phosphate decarboxylase gene of *Neurospora crassa*. *Biochem Biophys Res Commun.* 15:112(1):284-9.
5. Balcão, V.M. y Malcata X. 1998. Lipase catalyzed modification of milkfat. *Biotechnol. Adv.* 16 (2):309-341.
6. Beer, H.D.; McCarthy, J.E.; Bornscheuer U.T. y Schmid, R.D. 1998. Cloning, expression, characterization and role of the leader sequence of a lipase from *Rhizopus oryzae*. *Biochim Biophys Acta.* 20:1399(2-3):173-80.
7. Bell, P. J. L., Sunna, A., Gibbs, M. D., Curach, N. C., Nevalainen, H., y Bergquist, P. L. 2002. Prospecting for novel lipase genes using PCR. *Microbiology* 148: 2283-2291.
8. Bertolini, M. C., Laramée, L., Thomas, D. Y., Cygler, M., Schrag, J. D. y Vernet, T. 1994. Polymorphism in the lipase genes of *Geotrichum candidum* strains. *Eur. J. Biochem.* 219: 119-125.
9. Boel, E. *et al.* 1999. Methods for producing *Humicola* lipases in *Aspergillus*. United States Patent US 5,965,384.
10. Bornscheuer, U.T., *et al.* 2000. Lipases from *Rhizopus* species : genetics, structure and applications. En *Protein Engineering in Industrial Biotechnology*, L. Alberghina, ed. Amsterdam: Harwood Academic Publishers. Pp 115-134.
11. Brucker, B. *et al.* 1992. Transformation of *Giberella fujikuroi*: effect of the *Aspergillus nidulans* AMA1 sequence on frequency and integration. *Curr. Genet.* 22:313-316.

12. Celerin, E.M. y Fergus, C.L. 1973. Effects of nutrients, temperature and relative humidity on germination and longevity of ascospores of *Chaetomiium thermophile* var. Coprophile. *Mycology*. 63; 1030-1045.
13. Chow. A rapid method for isolation of total nucleic acids from *Aspergillus nidulans*. [http://www.kumc\\_edu/research/fgsc/fgn/chow.html](http://www.kumc_edu/research/fgsc/fgn/chow.html).
14. Dalboge, H., Heldt-Hansen, H. P. 1994. A novel method for efficient expression cloning of fungal enzyme genes. *Mol. Gen. Genet.* 243: 253-260.
15. Díaz, M.L. y Ruiz, C.A. 1994. Cinética de producción de lipasas con diversas fuentes de carbono en *R. delemar*. Tesis Mancomunada para obtener el Título de Químico Farmacéutico Biólogo (Tecnología de Alimentos). Facultad de Química, UNAM. México, D.F.
16. Espinosa, G.E. 1990. Mejoramiento de las condiciones de producción de lipasa de *Rhizopus delemar* destinada a la modificación de un sustrato lácteo. Tesis para obtener el Grado de Maestría en Biotecnología. Colegio de Ciencias y Humanidades, Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de Posgrado. UNAM. Pp. 76.
17. Farley, P.C. y Ikasari, L. 1992. Regulation of secretion of *Rhizopus oligosporus* extracellular carboxyl proteinase. *J. Gen Microbiol.* 138(12):2539-44.
18. Fischer, M. y Pleiss, J. 2003. The lipase engineering database: a navigation and analysis tool for protein families. *Nucleic Acids Research*, Vol 31, No. 1. pp 319-312.
19. Gálvez, C.Y. 2003. Desarrollo de un análogo de queso para régimen especial. Tesis para obtener el Título de Química de Alimentos. Facultad de Química, UNAM. México, D.F.
20. García-Lepe, R., Nuero, O. and Reyes, F. 1997. Esterases in Autolysed Cultures of Filamentous Fungi. *Lett. Appl. Microbiol.* 25, 127-130.
21. Gems, D. and A.J. Clutterbuck. 1993. Conversion of a gene bank in an integrating vector to autonomous replication by cotransformation with an autonomously replicating plasmid and its use in cloning the *Aspergillus nidulans* genes *adC* & *adD*.
22. Gems, D., Aleksenko, A., Belenky, L., Robertson, S., Ramsden, M., Vinetski, Y., y Clutterbuck, A. J. 1994. An instant gene bank' method for gene cloning by mutant complementation. *Mol Gen Genet* 242: 467-471.
23. Gems, D., H. and Clutterbuck, A. J. 1993. Cotransformation with autonomously-replicating helper plasmids facilitates gene cloning from an *Aspergillus nidulans* gene library. *Curr Genet* 94:520-524.

24. Gems, D., I. L. Johnstone, And A. J. Clutterbuck, 1991 An autonomously replicating plasmid transforms *Aspergillus nidulans* at high frequency. *Gene* 98:61-67.
25. Godtfredsen, S.E. 1993. Lipases. En: *Enzymes in Food Processing*, Third edition. Ed. Nagodawithana, T. y Reed, G. Eds. Academic Press, Inc. U.S.A.: 205-219.
26. González-Navarro, H., Bañó, M. C., y Abad, C. 2001. The closed/open model for lipase activation. Addressing intermediate active forms of fungal enzymes by trapping of conformers in water-restricted environments. *Biochemistry* 40: 3174-3183.
27. Gouka, R. J., Punt, P. J., Hessing, J. G. M., *et al.* 1996. Analysis of heterologous protein production in defined recombinant *Aspergillus awamori* strains. *Appl. Environ. Microbiol*, Vol 62, No. 6: 1951-1957.
28. Haalck, L. y Spener F. 1997. On the inhibition of microbial lipases by tetrahydrolipstatin. *Methods Enzymol.* 286:252-63.
29. Haas, M. J., Genuario, R. y Fearheller, S. H. 1990. Construction of a *Rhizopus delemar* genomic library and screening for direct lipase gene expression. *Food Biotechnology* 4 (2): 647-661.
30. Haas, M.J., Allen, J. y Berka, T.R. 1991. Cloning, expresión and characterization of a cDNA encoding a lipase from *Rhizopus delemar*. *Gene* 109: 107-113.
31. Haas, M.J., Cichowicz, D.J., Bailey, D.G. 1992. Purification and characterization of an extracellular lipase from the fungus *Rhizopus delemar*. *Lipids* , Vol. 27, No. 8: 571-576.
32. Haas, M.J. y Bayley, D.G. 1993. Glycerol as carbon source for lipase production by the fungus *Rhizopus delemar*. *Food Biotechnol.* 7(1), 49-73.
33. Halaouli, S. *et al.* 2006. Cloning and characterization of a tyrosinase gene from the white-rot fungus *Pycnoporus sanguineus*, and overproduction of the recombinant protein in *Aspergillus*. *APPL Microbiol Biotechnol.* 70 (5): 580-589.
34. Haq, I. Y Mukhtar, H. 2004. Biosíntesis of proteases by *Rhizopus oligosporus* IHS<sub>13</sub> in low-cost medium by solid-state fermentation. *J. Basic Microbiol.* 44:280-287.
35. Horiuchi, H. Yanai, K., Okasaki, T.m Takagi, M. y K. Yano. 1988. Isolation and sequencing of a genomic Clone encoding aspartic proteinase of *Rhizopus niveus*. *J. Bacteriol.* 170:272-278.
36. Horiuchi, H., Takaya, N., Yanai, K., Nakamura, M., Ohta, A., Takagi, M. 1995. Cloning of the *Rhizopus niveus pyr4* gene and its use for the transformation of *Rhizopus delemar*. *Curr Genet* 27: 472-478.

37. Hsu, A., Jones, K., Foglia, T. A., Marmer, W. N. 2002. Immobilized lipase-catalysed production of alkyl esters of restaurant grease as biodiesel. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 36: 181-186.
38. <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html>
39. <http://www.fgsc.net/index.html>
40. <http://www.led.uni-stuttgart.de>
41. Hube, B., Stehr, F., Bossenz, M., Mazur, A., Kretschmar, M., Schäfer, W. 2000. Secreted lipases of *Candida albicans*: cloning, characterization and expression analysis of a new gene family with at least ten members. *Arch. Microbiol.* 174: 362-374.
42. Hüge-Jensen, B., Andreasen, F., Christensen, T., Christensen, M., Thim, L. y Boel, E. 1989. *Rhizomucor miehei* triglyceride lipase is processed and secreted from transformed *Aspergillus oryzae*. *Lipids*, Vol. 24, No. 9: 781-785.
43. Isobe, K. y K. Nokihara. 1993. Primary structure determination of mono- and diacylglycerol lipase from *Penicillium camembertii*. *FEBS Lett.* 320(2):101-106.
44. Iwai, M. y Tsujisaka, Y. 1974. The purification and the properties of three kinds of lipases from *Rhizopus delemar*. *Agr. Biol. Chem.* 38 (6):1241-1247.
45. Iwashita, K. 2002. Recent studies of protein secretion by filamentous fungi. *J. Biosc Bioeng* 94(6) : 530-535.
46. Jaeger, K.E., Ransac, S ; Dijkstra, B.; Colson, C. y Misset, O. 1994. Bacterial lipases. *FEMS Microbiol Rev.* 15 :29-63.
47. Jaeger, K.E., y Reetz, M. 1998. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnol.* 16(9):396-403.
48. Joerger, R. D., Haas, M. J. 1993. Overexpression of a *Rhizopus delemar* lipase gene in *Escherichia coli*. *Lipids*, Vol. 28, No. 2 : 81-88.
49. Joerger, R.D., Haas, M. J. 1994. Alteration of chain length selectivity of a *Rhizopus delemar* lipase through site-directed mutagenesis. *Lipids*, Vol. 29, No. 6 : 377-384.
50. Johnstone, I.L.; *et al.* 1991. Cloning an *Aspergillus nidulans* developmental gene by transformation. *EMBO J.* 4:1307-1311.
51. Käfer, E. 1977. Meiotic and mitotic recombination in *Aspergillus* and its chromosomal aberrations. *Adv genet* 19: 33-131.
52. Kawasaki, L. 1991. Efecto de la glucosa sobre la producción de lipasas por *Rhizopus delemar* en fermentación sumergida. Tesis para obtener el Título de Biólogo. Facultad de Ciencias, UNAM. México, D.F.

53. Kawasaki, L. 1995. Obtención y caracterización de mutantes de *Aspergillus nidulans* incapaces de utilizar lípidos como fuente de carbono. Tesis para obtener el Grado de Maestra en Biotecnología. UACPyP, UNAM. México, D.F.
54. Klein, R. R., King, G., Moreau, R. A., y Haas, M. J. 1997. Altered acyl chain length specificity of *Rhizopus delemar* lipase through mutagenesis and molecular modeling. *Lipids.*, Vol. 32 No.2 :123-130.
55. Kohno, M., Kugimiya, W., Hashimoto, Y., y Morita, Y. 1994. Purification, characterization, and crystallization of two types of lipase from *Rhizopus niveus*. *Biosci. Biotech. Biochem.*, Vol. 58 (6):1007-1012.
56. Kohno, M., Enatsu, M., Takee, R., Kugimiya, W. 1999. Thermal stability of *Rhizopus niveus* lipase expressed in a *Kex2* mutant yeast. *Journal of Biotechnology.*, 81:141-150.
57. Kohno, M., Enatsu, M., Yoshiizumi, M., y Kugimiya, W. 1999. High-level expresión of *Rhizopus niveus* lipase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and structural properties of the expressed enzyme. *Protein Expression and Purification.* 15:327-335.
58. Kohno, M., Enatsu, M., Funatsu, J., Yoshiizumi, M., Kugimiya, W. 2000. Improvement of the optimum temperature of lipase activity for *Rhizopus niveus* by random mutagenesis and its structural interpretation. *Journal of Biotechnology.*, 87:203-210.
59. Kruszewska, J.S. 1999. Heterologous expression of genes in filamentous fungi. *Acta Biochimica Polonica.* Vol 46:1.
60. Kugimiya, W., Otani, Y., Kohno, M., y Hashimoto, Y. 1992. Cloning and sequence analysis of cDNA encoding *Rhizopus niveus* lipase. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56 (5): 716-719.
61. Isobe. K.; Akiba, T. y Yamaguchi, S. 19988. Crystallization and characterization of lipase from *Penicillium cyclopium*. *Agric Biol Chem* 52(1):41-47.
62. Kunitz, M. 1947. Crystalline soybean trypsin inhibitor. General properties. *J. Gen. Physiol.* 30:291.
63. Laemmli, V.K. 1970. Cleavage of the structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685.
64. Lee, G., Tang, S., Sun, K., Shaw, J. 1999. Analysis of the gene family encoding lipases in *Candida rugosa* by competitive reverse transcription-PCR. *Applied And Environmental Microbiology.*, Vol. 65, No. 9: 3888- 3895.
65. Malcata, F., et al. 1992. Kinetics and mechanism of reactions catalysed by immobilized lipases. *Enzyme Microb. Technol.* 14:426-445.

66. Matute, P. 1992. Producción y evaluación de sistemas enzimáticos lipolíticos obtenidos por fermentación en estado sólido con *Penicillium candidum* y su aplicación en la elaboración de un ingrediente modificado enzimáticamente con sabor a queso. Tesis para obtener el Título de Licenciado en Nutrición y Ciencia de los Alimentos en el Área de Ciencia y Tecnología de Alimentos. México, D. F.
67. Mayordomo, I., Randez-Gil, F. and Prieto, J. 2000. Isolation, Purification and Characterization of a Cold-Active Esterase from *Aspergillus nidulans*. *J. Agric. Food Chem.* 48; 105-109.
68. Minning, S., Schmidt-Dannert, C., Schmid, R. D. 1998. Functional expression of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris*: high-level production and some properties. *Journal of Biotechnology.*, 66: 147-156.
69. Minning, S., Serrano, A., Ferrer, P., Solá, C., Schmid, R. D., Valero, F. 2001. Optimization of the high-level production of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology.*, 86: 59-70.
70. Miralles, M. 2000. Estudio de la regulación por fuente de carbono en la producción de lipasas de cepas de *Rhizopus delemar*. Tesis para obtener el título de Química de Alimentos. Facultad de Química, UNAM. México.
71. Nagao, T., Shimada, Y., Sugihara, A., y Tominaga, Y. 1993. Cloning and sequencing of two chromosomal lipase genes from *Geotrichum candidum*. *J. Biochem.* 113: 776-780.
72. Nagata, O., Takashima, T., Tanaka, M., y Tsukagoshi, N., 1993. *Aspergillus nidulans* nuclear proteins bind to a CCAAT element and the adjacent upstream sequence in the promoter region of the starch-inducible Taka-amylase A gene. *Mol Gen Genet.* 237: 251-260.
73. Nasser Eddine, A., Hannemann, F., Schäfer, W. 2001. Cloning and expression analysis of *NhL1*, a gene encoding an extracellular lipase from the fungal pea pathogen *Nectria haematococca* MP VI (*Fusarium solani* f. sp. *pisii*) that is expressed *in planta*. *Mol Genet Genomics.* 265: 215-224.
74. Nini, L., Sarda, L., Comeau, L-C., Boitard, E., Dubés, J-P., Chahinian, H. 2001. Lipase-catalysed hydrolysis of short-chain substrates in solution and in emulsion: a kinetic study. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1534: 34-44.
75. O'Connor, K.C. y Bailey, J.E. 1988. Hydrolysis of emulsified tributyrin by porcine pancreatic lipase. *Enzyme Microb. Technol.* 10: 352-356.

76. Ohnishi, K., Toida, J., Nakazawa, H., Sekiguchi, J. 1995. Genome structure and nucleotide sequence of a lipolytic enzyme gene of *Aspergillus oryzae*. FEMS Microbiology Letters. 126: 145-150.
77. Paiva, A; Malcata, F; Balcao, B. 2000. Kinetics and mechanisms of reactions catalysed by immobilized lipases. Enzyme Microb. Technol. 27:187-204.
78. Pandey. A., Benjamín, S., Soccol, C. R., Nigam, P., Krieger, N., Soccol, V.T. 1999. REVIEW. The realm of microbial lipases in biotechnology. Biotechnol. Appl. Biochem. 29: 119-131.
79. Peña, C. 1998. Obtención de mutantes alteradas en el metabolismo de lípidos en *Aspergillus nidulans*. Tesis para obtener el título de Química en Alimentos. Facultad de Química, UNAM. México, D.F.
80. Peña, C. 2001. Producción, purificación y caracterización bioquímica de una enzima con actividad lipolítica en *Aspergillus nidulans*. Tesis que para obtener el grado de Maestra en Ciencias. Facultad de Química, UNAM. México.
81. Peralta, Z. 1994. Mejoramiento genético de *Rhizopus delemar* para la producción de lipasa. Tesis para obtener el grado de Maestra en Química (Química de Alimentos). Facultad de Química, UNAM. México, D.F.
82. Peterson G.L. 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry which is more generally applicable. Anal Biochem 83:346.
83. Phillip, A., Pretorius, G. H. J., Rensburg, H. G. V. 1995. Molecular characterization of a *Galactomyces geotrichum* lipase, another member of the cholinesterase /lipase family. Biochimica et Biophysica Acta. 1252: 305-311.
84. Pignée, G., Wang, H., Fudalej, F., Seman, M., Gaillardin, C., Nicaud, J-M. 2000. Autocloning and amplification of *LIP2* in *Yarrowia lipolytica*. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 66, No. 8. 3283-3289.
85. Pleiss, H., Scheib, R, y Schmid, R. 2000. The *His gap* motif in microbial lipases: A determinant of stereoselectivity toward triacylglycerols and analogs. Biochimie. 82:1043-1052.
86. Resina, D., Serrano, A., Valero F. y Ferrer, P. 2004. Expresión of a *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris* under control of the nitrogen source-regulated formaldehyde dehydrogenase promoter. J. Biotechnol. 109: 103-113.
87. Salah, B. et al. 2001. Kinetic studies of *Rhizopus oryzae* lipase using monomolecular film technique. Biochimie. Jun;83(6):463-9.

88. Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Plainview, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
89. Sánchez, O. and Aguirre, J. Transformation of *Aspergillus nidulans* by Electroporation: Efficient Transformation of *Aspergillus nidulans* by Electroporation of Germinated Conidia. Instituto de Fisiología Celular. Universidad Nacional Autónoma de México.
90. Sawicka-Zukowska, R., Juszczakiewicz, D., Misiewicz, A., Krakowiak, A., Jedrychowska, B. 2004. Intensification of lipase biosynthesis as a result of electrofusion of *Rhizopus cohnii* protoplasts. *J. Appl. Genet.* 45(1) 37-48.
91. Saxena, R.K., *et al.* Microbial lipases: potential biocatalysts for the future industry. <http://www.ias.ac.in/currsci/jul10/articles18.htm>
92. Scheib, H., Pleiss, J., Kovac, A., Paltauf, F., Schmid, R. D. 1999. Stereoselectivity of *Mucorales* lipases toward triradylglycerols- A simple solution to a complex problem. *Protein Science.* 8: 215-221.
93. Scheib, H., Pleiss, J., Stadler, P., Kovac, A., Potthoff, A. P., Haalck, L., Spener, F., Paltauf, F., Schmid, R. D. 1998. Rational design of *Rhizopus oryzae* lipase with modified stereoselectivity toward triradylglycerols. *Protein Engineering.* Vol. 11 No. 8 : 675-682.
94. Schmid, R. y Verger, R. 1998. Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications. *Angew. Chem. Int. Ed.* 37: 1608-33.
95. Schmidt-Dannert, C., Pleiss, J., Schmid, R. D. 1998. A toolbox of recombinant lipases for industrial applications. *Ann N Y Acad Sci.* Vol. 13;864:14-22.
96. Sharma, R., Chisti, Y., Banerjee, U. C. 2001. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances.* 19: 627-662.
97. Shimada, Y; Iwai, M.; y Tsujisake Y. 1981. Reversibility of the modification of *Rhizopus delemar* lipase by phosphatidylcoline. *J Biochem.* 89:937-942.
98. Subramanian, E., Swan, I.D.A., Liu, M., Davies, D.R., Jenkins, J.A. y T.L. Blundell. 1977. Homology among acid proteases: Comparison of cristal structures at 3° Å resolution of acid proteases from *Rhizopus chinensis* and *Endothia parasitica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74(2): 556-559.
99. Takahashi, S.; Ueda, M. y Tanaka A. 2001. Function of the prosequence for in Vitro holding and secretion of active *Rhizopus oryzae* lipase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 55(4):454-62.



100. Tilburn, J. et al. 1983. Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. *Gene*. 26(2-3):205-21.
101. Townner, P. 1991. Purification of DNA. En: Essential Molecular Biology A Practical Approach. Volume I. Ed. Brown, T.A. The Practical Approach Series Oxford University Press. UK. Pp 47-68.
102. Tunga, R., Banerjee, B.C. y B.C: Bhattacharya. 1999. Some studies on optimization of extraction process for protease production in SSF. *Bioprocess Eng.* 20:485-489.
103. Walstra, P. et al. 1999. Dairy technology. Principles of properties and processes. Marcel Dekker, INC. New York. Pp. 727.
104. Wang, H.L., Vespa, J.B. y C.W. Hesseltine. 1974. Acid protease production by fungi used in soybean food fermentation. *Appl. Microbiol.* 27(5):906-911.
105. Whitaker, J.R. (1990). New and future uses of enzymes in food processing. *Food Biotech.* 4: 669-697.
106. Yaver, D.S, et al. 2000. Using DNA-tagged mutagenesis to improve heterologous protein production in *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genet. Biol.* 29:28-37.
107. Yelton, M.M.; Hammer J.E. y Timberlake, W.E. 1984. Transformation of *Aspergillus nidulans* by using a trpC plasmid. *Proc Natl Acad Sci.* 81(5):1470-4.

# APÉNDICE 1

## Cepas y Medios de Cultivo

### *Rhizopus delemar*

**Cepa:** *Rhizopus delemar* CDBH313, cepa silvestre.

**Origen:** Colección de Cultivos del Departamento de Biotecnología del CINVESTAV del Instituto Politécnico Nacional.

**Cepa:** *Rhizopus delemar* M2, mutante derregulada al efecto negativo de glucosa, derivada de la cepa silvestre y seleccionada por resistencia a 2-deoxiglucosa.

**Origen:** Obtenida por Peralta (1994).

### Medio de crecimiento

Se crecieron ambas cepas en matraz de 250 ml con 50 ml de PDA (OXOID) por un período de 7 días a una temperatura de 29°C.

### Conservación

La cepa fue propagada en matraces Erlenmeyer de 250 ml con 50 ml de medio PDA por una semana a una temperatura de 29°C. Para su conservación se realizó una cosecha de esporas separando un poco de micelio aéreo utilizando un asa microbiológica, el micelio se colocó en un tubo Eppendorf con 0.5 ml de una solución estéril de leche descremada (Skim milk) al 5%. Se agitó en el vórtex hasta que las esporas se desprendieron del micelio y la leche adquirió un color oscuro, Se tomó entre 50 y 100 µl de la suspensión de esporas y colocó en viales de vidrio con sílica gel esterilizados y deshidratados, los viales se conservaron a 4°C.

## Preparación del inóculo

Se esterilizaron matraces de 250 ml con 50 ml de glicerol al 50%. En condiciones estériles, se tomó el micelio de los matraces y se colocó en el glicerol. Se agitó el matraz en el vórtex, se retiró el micelio, se tomó 1 ml de la suspensión de esporas y se adicionaron 3 ml de glicerol al 50%, se leyó la densidad óptica a 540 nm.

## Medio de cultivo

Se utilizó el Medio "D" para la fermentación en medio líquido propuesto por Celerin y Fergus (1973).

Compuesto	Cantidad (g/L)
Glucosa o dextrina amarilla	10
Casaminoácidos	10
KNO <sub>3</sub>	2
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.0
Solución de elementos traza	1.0 ml

### Solución de elementos traza

Compuesto	Cantidad (mg/L)
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	439.8
Fe (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	723.5
MnSO <sub>4</sub> 4H <sub>2</sub> O	203.0

El medio de cultivo se ajustó a pH de 7.0 antes de agregar los elementos traza.

## Cultivos en medio líquido

Se llevó a cabo la fermentación por la cepa silvestre de *R. delemar* y la mutante derregulada a glucosa M2 con dos diferentes fuentes de carbono en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio "D". Las fuentes de carbono empleadas fueron glucosa al

1 y 4% y dextrina amarilla al 1%. Se inoculó 1 mL de la suspensión de esporas ( $D.O_{540\text{ nm}} = 0.06$ ) de ambas cepas a cada matraz y se incubaron a 29°C con 100 rpm de agitación recíproca en una incubadora "New Brunswick Scientific". Para cada condición se retiraron dos matraces a las 24, 48, 72 y 96 horas de fermentación.

### ***Aspergillus nidulans***

**Cepa:** *Aspergillus nidulans* PW1. *biA1*, *argB2*, *metG1*, *veA1*

**Cepa:** *Aspergillus nidulans* RMS011 *pabaA1*; *yA2*;  $\Delta argB::trpC\Delta B$ , *veA1*; *trpC801*

**Origen:** Donaciones del Dr. Jesús Aguirre, Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

**Cepa:** *Aspergillus nidulans* CP309. *biA1*, *argB2*, *metG1*, *veA1*, mutante con actividad lipolítica reducida en las condiciones normales de crecimiento, obtenida a partir de la PW1.

**Origen:** Obtenida por Peña (1998).

### **Medio de crecimiento**

Las cepas fueron propagadas en medio mínimo "**A**" propuesto por Käfer (1977) con los requerimientos adecuados por un período de 5 días a una temperatura de 37°C.

<b>Compuesto</b>	<b>Cantidad por litro</b>
Solución de sales	50 ml
Elementos traza	1 ml
Glucosa	10.0 g
Agar	12.5 g

Se ajustó el pH a 6.5 y se esterilizó 15 minutos a 121°C. Se utilizó el mismo medio sin agar para las fermentaciones en medio líquido.

La soluciones de sales y elementos traza se prepararon como sigue:

Sales 20X

<b>Compuesto</b>	<b>Cantidad (g/L)</b>
NaNO <sub>3</sub>	120
KCl	10.4
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	10.4
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	30.4

Elementos traza (110 ml)

Compuesto	Cantidad (g)
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	2.2
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1.1
MnCl <sub>2</sub> 4 H <sub>2</sub> O	0.5
Fe SO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.5
CoCl <sub>2</sub> 5H <sub>2</sub> O	0.16
Cu SO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0.16
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> 4 H <sub>2</sub> O	0.11
Na <sub>4</sub> EDTA	5.0

La solución de elementos traza se preparó como sigue: se agregaron los disolvió el EDTA en 10 ml de agua destilada y se agregó lentamente a la solución anterior.

Los requerimientos de cada cepa se agregaron al medio de cultivo en las siguientes proporciones:

Compuesto	Solución Stock	Cantidad por L de medio
Arginina (Merck)	16.8%	5.0 ml
Biotina (Sigma)	0.05%	0.5 ml
Metionina (Merck)	0.6 mM	1.25 ml
PABA (Sigma)	0.17%	0.5 ml

La biotina se disolvió en etanol al 70%. compuestos en el orden presentado, a excepción del EDTA, en 80 ml de agua destilada disolviendo cada uno completamente antes de agregar el siguiente. Posteriormente se calentó la solución hasta ebullición. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se aforó a 100 ml con agua destilada. Se Todas las soluciones se almacenaron a 4°C.

La temperatura de incubación para todas las cepas empleadas fue de 37°C.

- **Medio de selección.** El medio de selección se prepara de la misma manera que el medio mínimo, pero la glucosa se adiciona al 0.1% y después de ajustar el pH, se agrega el agar, se calienta hasta disolver bien, se deja enfriar hasta 40°C aproximadamente y se agrega la tributirina al 1% (v/v). El medio se homogeniza en una licuadora (Osterizer) durante un minuto y posteriormente se esteriliza.

## **Conservación**

La cepa fue propagada en medio mínimo con los requerimientos adecuados por un periodo de 72 horas a una temperatura de 37°C. Para su conservación se realizó una cosecha de esporas de una caja Petri raspando las esporas con un asa microbiológica y agregándole una solución estéril de leche descremada (skim milk) al 5%. Posteriormente se colocaron 50 µl de la suspensión de esporas en viales de vidrio con sílica gel esterilizados y deshidratados, los viales se conservaron a 4°C.

## **Preparación del inóculo**

Para obtener el inóculo se creció el microorganismo a confluencia en placas de medio mínimo "A" con los suplementos adecuados. La cosecha se hizo agregando aproximadamente 10 ml de agua destilada estéril con Tween 80 (Canamex) al 0.01% directamente sobre la caja. Las esporas se rasparon con una asa micológica y se recuperaron en un tubo. Se centrifugó durante 10 minutos en el rotor JA20, centrífuga Beckman J2-MC, posteriormente las esporas se resuspenden en agua estéril y se repite la operación. La suspensión de esporas se almacenó a 4°C. La cuantificación de las mismas se realizó utilizando un hemocitómetro.

Para la conservación de las cepas se realizó una cosecha de esporas en una solución de leche descremada al 5%, se colocó aproximadamente 100µl de esta suspensión en viales con sílica gel estéril y se almacenan a 4°C.

## **Medio de cultivo**

Se utilizó también el medio mínimo para *Aspergillus* "A", preparado como se indica anteriormente excepto por la presencia de agar.

## **Cultivos en medio líquido**

Para la fermentación se colocaron 50 ml del medio anteriormente mencionado en matraces Erlenmeyer de 250 ml, se inocularon con  $1 \times 10^6$  esporas por mililitro de medio

de cultivo. Se mantuvieron con una agitación de 300 rpm y a una temperatura de 37°C en una incubadora “Lab-Line” con agitación orbital.

### ***Escherichia coli***

**Cepa:** *Escherichia coli* ATCC 68046

**Origen:** Tanto el plásmido pUC8-2.14 como la clona que lo contiene *E. coli* ATCC 68046, fueron donadas por el Dr. M. Haas.

**Cepa:** *Escherichia coli* DH10B

**Origen:** Donación del Dr. Luis Padilla, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

### **Medios de crecimiento**

#### **Medio LB**

<b>Compuesto</b>	<b>Cantidad (g/L)</b>
Triptona	10
Extracto de levadura	5
NaCl	10

#### **Medio SOC**

<b>Compuesto</b>	<b>Cantidad por L</b>
Triptona	2%
Extracto de levadura	0.5 %
NaCl	10 mM
KCl	2.5 mM
MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O *	10 mM
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O *	10 mM
Glucosa	10 mM

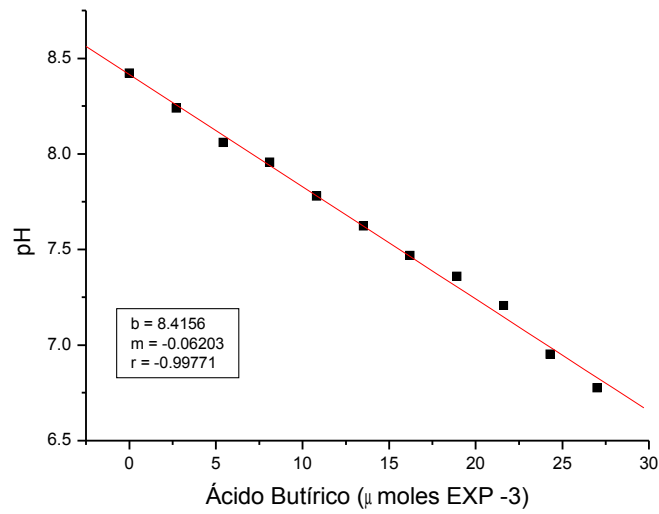
\* Se esterilizó por filtración las soluciones de cloruro y sulfato de magnesio.

Las cepas de *Escherichia coli* se conservaron en viales con glicerol a una concentración final de 20% y se almacenaron a -70°C.

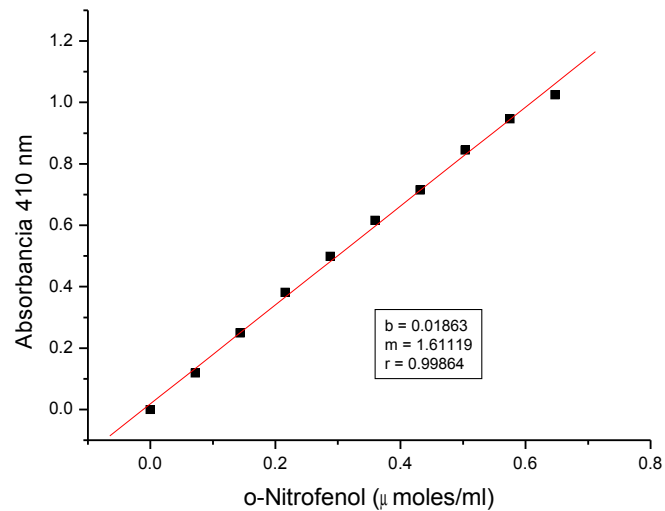
# APÉNDICE 2

## Determinación de Actividad Lipolítica

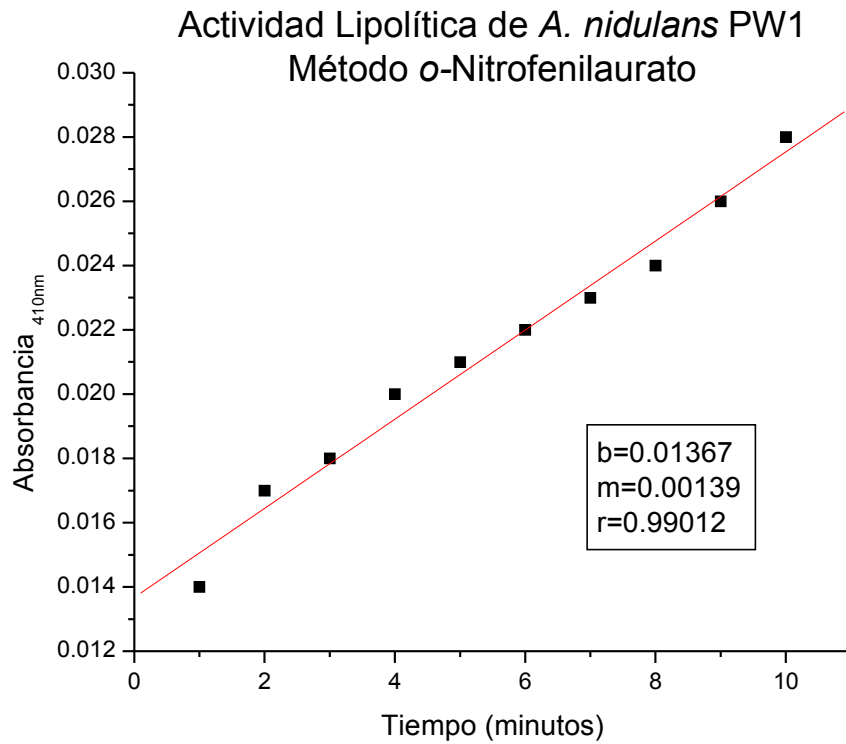
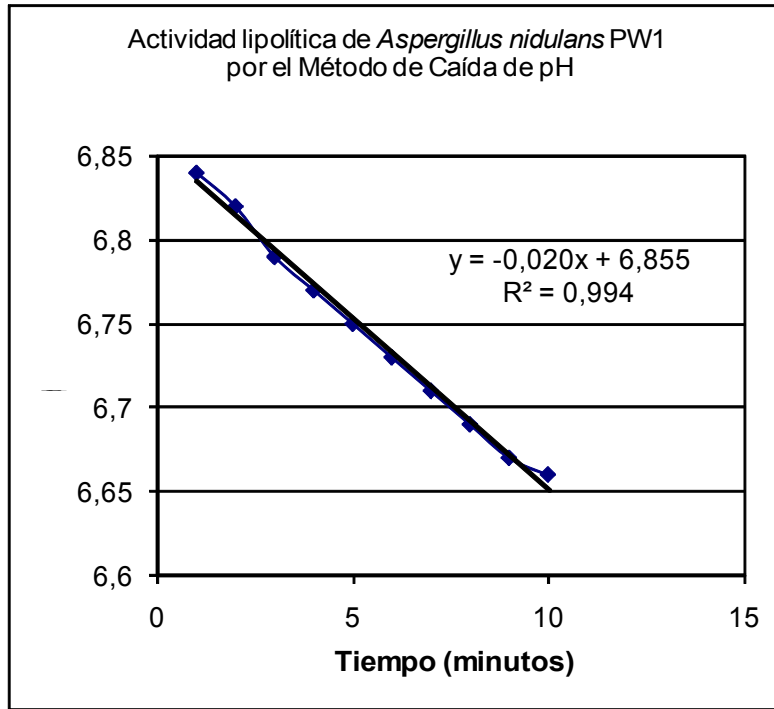
### Curva Patrón de Ácido Butírico



### Curva Patrón de o-Nitrofenol

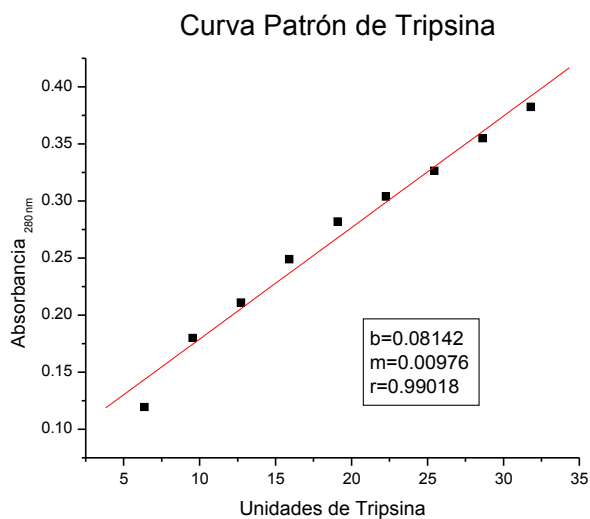




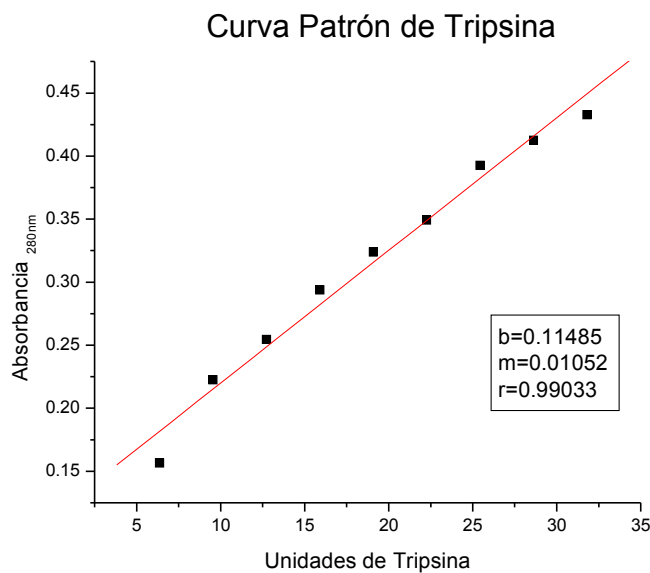


# APÉNDICE 3

## Determinación de Actividad Proteolítica



Determinación de actividad proteolítica a 30°C durante 2 horas, con caseína al 1% como sustrato en buffer de fosfatos 100 mM pH 7.



Determinación de actividad proteolítica a 37°C durante 2 horas, con caseína al 1% como sustrato en buffer de fosfatos 100 mM pH 7.

# APÉNDICE 4

## Protocolos de Transformación Genética

### Transformación genética de *Aspergillus nidulans*

Para llevar a cabo la transformación genética de *Aspergillus nidulans* se prepararon protoplastos según el siguiente protocolo propuesto por el Dr. Jesús Aguirre de IFC, UNAM (comunicación personal).

1. Se inocularon 400 ml de medio de cultivo mínimo con los suplementos adecuados con 109 esporas/ml y se incubaron a 30°C con agitación de 300 rpm durante 14 horas.
2. Se cosechó el micelio por filtración a través de un embudo con un filtro (Miracloth), posteriormente se lavó con una solución fría de MgSO<sub>4</sub> 0.6M y se colocó en un tubo Falcon estéril. Se tomó aproximadamente 1 gramo de micelio y se mantuvo en hielo.
3. Se resuspendió el micelio en 5 ml de medio osmótico (1.2M MgSO<sub>4</sub>, 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 5.8), se transfirió a un matraz de 250 ml y se agregaron 500(l de una solución de enzimas líticas de *Thichoderma harzianum* (Sigma) de 5mg/500µl. Se mezcló y se incubó en hielo 5 minutos y se agregaron 500µl de una solución de albúmina de bovino (Sigma) de 12 mg/ml.
4. Se incubó a 30°C con agitación de 80 rpm durante la incubación se tomaron muestras para verificar la formación de protoplastos y detener la acción de las enzimas líticas.
5. Se transfirieron los protoplastos a un tubo Corex con tapa de rosca y se incubaron en hielo. Se adicionó suavemente 10 ml de buffer de atrapamiento frío (Sorbitol 0.6M; Tris-HCl 0.1M, pH7.0).
6. Se centrifugó a 5,000 rpm durante 12 minutos con un rotor Sorvall HS-4, a 4°C. e recuperaron de la interfase con la ayuda de una pipeta Pasteur estéril en un tubo Falcon de 15 ml. Se retiró el buffer y se resuspendió el botón en medio osmótico (6 ml). Se repitió el procedimiento agregando 10 ml de amortiguador de atrapamiento y se centrifugó de nuevo, para recuperar los protoplastos que hayan quedado en el botón.

7. Se diluyeron los protoplastos en un volumen de STC (Sorbitol 1.2M; CaCl<sub>2</sub> 10 mM; Tris-HCl 10 mM, pH 7.5) y se centrifuga a 5,000 rpm durante 10 minutos en el rotor HS-4.
8. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió el botón en 10 ml de STC. Se centrifugó como en el paso anterior.
9. Se resuspendieron los protoplastos en 1 ml de STC y se incubaron en hielo.
10. Se diluyó una muestra 1:100 en STC y se contaron los protoplastos en la cámara de Newbauer.

### **Transformación de protoplastos de *Aspergillus***

1. Se utilizaron 5-10 µg de DNA y se diluyeron con un volumen de STC. Se colocaron en un tubo Falcon de 15 ml.
2. Se agregaron 100µl de protoplastos y se incubaron 25 minutos a temperatura ambiente.
3. Se agregaron 350µl de PEG (PEG 4,000 al 60%; CaCl<sub>2</sub> 10mM; Tris-HCl 10mM, pH 7.5 disueltos e STC) y se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente. Se agregaron otras dos veces 350µl de PEG, incubando después de cada adición 5 y 15 minutos respectivamente.
4. Se centrifugó a 5,000 rpm durante 12 minutos a 4°C en el rotor HS-4 para recuperar los protoplastos. Puede agregarse un mililitro de STC, mezclar y plaquear los protoplastos en vez de centrifugarlos.
5. Se secaron los tubos por inversión para eliminar cualquier resto de PEG.
6. Se resuspendieron bien en un ml de STC.
7. Los protoplastos se paquearon en medio mínimo con sorbitol 1.2M y los suplementos necesarios para seleccionar transformantes.

#### Controles

1. Se plaquearon protoplastos sin agregar DNA en el mismo medio anterior. Esto detecta posibles revertantes o contaminantes.
2. Se plaquearon protoplastos sin PEG en medio con todos los suplementos y sorbitol 1.2M para determinar viabilidad.
3. Se plaquearon protoplastos sin transformar pero después de adicionar el PEG en el mismo medio anterior para determinar la viabilidad después de agregar el PEG.

## **Transformación de *Escherichia coli***

La preparación de células competentes de *E. coli* para su transformación posterior con los plásmidos anteriormente mencionados se realizó por los siguientes métodos:

### **Preparación de células competentes por RbCl**

Se usaron células bacterianas DH10B

1. Estriar *E. coli* para colonias aisladas. Estriar en placa de LB sin antibiótico.
2. Crecer una de las colonias aisladas en medio líquido (5 ml) de LB sin antibiótico. Crecer a saturación a 37°C y 250 rpm
3. Transferir 1 ml de cultivo saturado a 50 ml de medio fresco de LB sin antibiótico en un matraz de 500 ml. Adicionar MgSO<sub>4</sub> a una concentración final de 20 mM. Incubar a 37°C y 250 rpm Aproximadamente a las 2 horas leer D.O.<sub>600nm</sub> y detener el cultivo entre 0.5 –0.6 de D.O. (cada 50 ml de cultivo podría producir 2 ml de células competentes).
4. Centrifugar las células a 2,500 rpm durante 10 minutos a 4°C. Resuspender las células en 20 ml de Tfb I frío por cada 5° ml de cultivo inicial. Resuspender suavemente. Mantener en hielo por 2 horas, durante la incubación agitar suavemente.
5. Centrifugar las células a 2,500 rpm por 10 minutos a 4°C. Resuspender las células a 2 ml de Tfb II por cada 50 ml de cultivo inicial. Mantener en hielo por 1 hora. Agitar suavemente.
6. Hacer alícuotas de 110 µl en tubos Eppendorfs de 1.5 ml. Previamente incubadas en frío. Una vez hecha la alícuota congelar inmediatamente utilizando un baño de hielo seco – etanol. Almacenar a –70°C.
7. Probar la calidad de las células por transformación, utilizando un plásmido conocido. Es recomendable descongelar las células competentes lentamente sobre hielo antes de usarse. La porción no utilizada puede volverse a congelarse y usarse de nuevo, pero con el riesgo de pérdida de competencia.

### Solución Tfb I

	Para 45 ml	Concentración final
Acetato de potasio 1M	1.35 ml	30 mM
Cloruro de manganeso 1M	2.25 ml	50 mM
Cloruro de Rubidio 1M	4.50 ml	100 mM
Cloruro de calcio 1M	0.45 ml	10 mM
Glicerol	5.40 ml	12 %
Agua destilada	31.00 ml	

Mezclar las sales, incluyendo el glicerol y ajustar el pH a 5.8 con 0.1 M de ácido acético (40 o 50  $\mu$ l). Descartar la solución si sobrepasa este pH, un precipitado podría formarse y el buffer no funcionaría.

Para ajustar el pH a 5.8 se necesita aproximadamente 4.5  $\mu$ l de ácido acético glacial para los 45 ml.

### Solución Tfb II

	Para 5 ml	Concentración final
MOPS pH 7.0 1M	50 $\mu$ l	10 mM
Cloruro de calcio 1M0	375 $\mu$ l	75 mM
Cloruro de rubidio 1M	50 $\mu$ l	10mM
Glicerol	600 $\mu$ l	12 %
Agua destilada	3,925 $\mu$ l	

### Transformación por Heat-Shock de células competentes por RbCl

Comunicación personal Dr. Luis Padilla

0. Descongelar las células sobre hielo.
1. En un tubo Falcon de 6 ml, mezclar 50  $\mu$ l de células competentes DH10B por RbCl, con 20ng del DNA que se desea transformar. Se recomienda mantener el volumen de células al menos cinco veces en exceso con respecto al volumen de DNA.
2. Incubar la mezcla sobre hielo por 30 minutos. Agitar suavemente durante la incubación.
3. Colocar las células 2 minutos a 42°C.
4. Incubar en hielo y adicionar 950  $\mu$ l de SOC preincubado a 37°C. Resuspender suavemente e incubar durante 1 hora a 37°C en agitación de 225 rpm.

5. Platear las células haciendo diluciones seriales en placas de LB+Ampicilina 100µg/µl. Incubar toda la noche a 37°C.

### **Preparación de células competentes para electroporación**

#### **Competent cell preparation kit-electroporation by SIGMA**

1. Descongelar la cepa DH10B almacenada a -70°C e inocular una placa de LB para obtener colonias aisladas.
2. Crecer una colonia aislada de *E. coli* DH10B a saturación toda la noche en 5.0 ml de LB a 37°C con agitación de 250 rpm.
3. Inocular 3 ml del cultivo saturado en 250 ml de LB en un matraz de un litro.
4. Crecer las células a 37°C con una agitación de 250 rpm hasta alcanzar una DO<sub>600nm</sub> de 0.5 a 0.6, el tiempo aproximado son 2.5 horas. Monitorear el crecimiento celular removiendo asépticamente 1 ml de muestra cada 30 minutos y medir la DO<sub>600nm</sub> usando el medio como blanco. Descartar la muestra después de que la medición ha sido tomada.
5. Colocar las células en hielo por 10 minutos.
6. Cosechar las células por centrifugación a 5,105.7 rpm por 15 minutos a 4°C, en el rotor JA-14, usando frascos de 250 ml estériles enfriados previamente.
7. Decantar el sobrenadante y descartar. Resuspender el pellet celular en 250 ml de HEPES 1mM pH 7.0 frío.
8. Centrifugar las células a 5,105.7 rpm por 15 minutos a 4°C en el rotor JA-14.
9. Decantar el sobrenadante y descartar. Resuspender el pellet celular en 125 ml de HEPES 1 mM pH 7.0 frío.
10. Centrifugar las células a 5,105.7 rpm por 15 minutos a 4°C en el rotor JA-14.
11. Decantar el sobrenadante y descartar. Resuspender el pellet celular en 5 ml de glicerol al 10% enfriado previamente en hielo, mezclar bien y cuidadosamente transferir a un tubo de centrifuga de 35 ml estéril y enfriado previamente.
12. Centrifugar a 5,750.5 rpm a 4°C por 15 minutos en el rotor JA-20.
13. Decantar el sobrenadante y descartar. Resuspender el pellet celular en 1 ml del volumen de glicerol al 10%.

14. Hacer alícuotas de 45  $\mu\text{l}$  de la suspensión celular en tubos Eppendorfs de 1.5 ml estériles y preenfriados, congelar en un baño de etanol y hielo seco (o equivalente) y almacenar a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

### **Transformación por electroporación**

1. Descongelar las células colocándolas sobre hielo.
2. En un tubo Eppendorf de 1.5ml frío colocar 40  $\mu\text{l}$  de células competentes y lo equivalente a 5ng de DNA de la reacción de ligación agua. Mezclar perfectamente y mantener la suspensión celular en hielo por 1 minuto.
3. Colocar las celdas de electroporación en hielo, incluso antes de iniciar este protocolo.
4. Transferir la mezcla celular a una celda de electroporación preenfriada de 0.2 cm, con cuidado colocar la muestra en el fondo de la misma.
5. Aplicar un pulso a la mezcla celular a 25  $\mu\text{F}$  (de capacitancia), 1.5 KV y 200  $\Omega$ .
6. Colocar 1000  $\mu\text{l}$  de medio SOC preincubado a  $37^{\circ}\text{C}$  inmediatamente a la celda y rápidamente resuspender las células con una pipeta Pasteur.
7. Transferir la suspensión celular a un tubo de polipropileno de 17 x 100 mm (Falcon 2059).
8. Incubar las células a  $37^{\circ}\text{C}$  con agitación suave (250 rpm) durante 1 hora.
9. Diluir la reacción experimental si es necesario y platear 100  $\mu\text{l}$  en placas de LB conteniendo el antibiótico apropiado.
10. Incubar las placas toda la noche a  $37^{\circ}\text{C}$ .
11. Resembrar las colonias de las placas y proceder el análisis.



# APÉNDICE 5

## Clasificación de las lipasas

### Browse classification for GX class

Superfamilies	11
Homologous families	22
Proteins	376
Sequences	600
Structures	124
Links	<a href="#">Structure table</a>

Superfamily	Homologous family	Links
<b>Bacillus lipases</b> Proteins 6 Sequences 9 Structures 2	<a href="#">Bacillus lipases</a>	<a href="#">Alignment</a> <a href="#">Tree</a>
<b>Burkholderia lipases</b> Proteins 41 Sequences 68 Structures 15 <a href="#">Alignment</a> <a href="#">Tree</a>	<a href="#">Burkholderia lipases</a>  <a href="#">Staphylococcus lipases</a>	<a href="#">Alignment</a> <a href="#">Tree</a>  <a href="#">Alignment</a> <a href="#">Tree</a>
<b>Candida antarctica lipase</b> Proteins 1 Sequences 8 Structures 7	<a href="#">Candida antarctica lipase B</a>	<a href="#">Alignment</a> <a href="#">Tree</a>
<b>Cutinases</b> Proteins 21 Sequences 71 Structures 44 <a href="#">Alignment</a> <a href="#">Tree</a>	<a href="#">Botryotinia cutinases</a> <a href="#">Colletotrichum cutinases</a> <a href="#">Fusarium cutinases</a> <a href="#">Mycobacterium cutinases</a>	<a href="#">Alignment</a> <a href="#">Tree</a> <a href="#">Alignment</a> <a href="#">Tree</a> <a href="#">Alignment</a> <a href="#">Tree</a> <a href="#">Alignment</a> <a href="#">Tree</a>
<b>Filamentous fungi lipases</b> Proteins 36 Sequences 70 Structures 29 <a href="#">Alignment</a> <a href="#">Tree</a>	<a href="#">Rhizomucor lipases</a>  <a href="#">Saccharomyces lipases</a>	<a href="#">Alignment</a> <a href="#">Tree</a>  <a href="#">Alignment</a> <a href="#">Tree</a>
<b>Gastric lipases</b> Proteins 73 Sequences 107 Structures 4 <a href="#">Alignment</a> <a href="#">Tree</a>	<a href="#">Gastric lipases</a>  <a href="#">Lysosomal acid lipases</a>	<a href="#">Alignment</a> <a href="#">Tree</a>  <a href="#">Alignment</a> <a href="#">Tree</a>
<b>Lipoprotein lipases</b> Proteins 92 Sequences 134 Structures 9 <a href="#">Alignment</a> <a href="#">Tree</a>	<a href="#">Hepatic lipases</a> <a href="#">Lipoprotein lipases</a>  <a href="#">Pancreatic lipases</a>	<a href="#">Alignment</a> <a href="#">Tree</a> <a href="#">Alignment</a> <a href="#">Tree</a>  <a href="#">Alignment</a> <a href="#">Tree</a>
<b>Moraxella lipases</b> Proteins 6 Sequences 8 Structures 2	<a href="#">Moraxella lipase 1</a>	<a href="#">Alignment</a> <a href="#">Tree</a>

<b>Non-heme peroxidases</b>	<a href="#">Haemophilus lipases</a>	<a href="#">Alignment</a> <a href="#">Tree</a>
Proteins 84	<a href="#">Moraxella lipase 3</a>	<a href="#">Alignment</a> <a href="#">Tree</a>
Sequences 107	<a href="#">Mycoplasma lipases</a>	<a href="#">Alignment</a> <a href="#">Tree</a>
Structures 12	<a href="#">Non-heme peroxidases</a>	<a href="#">Alignment</a> <a href="#">Tree</a>
<a href="#">Alignment</a> <a href="#">Tree</a>		
<b>Pseudomonas lipases</b>		
Proteins 14	<a href="#">Pseudomonas lipases</a>	<a href="#">Alignment</a> <a href="#">Tree</a>
Sequences 15		
Structures 0		
<b>Saccharomyces lipases</b>		
Proteins 2	<a href="#">Saccharomyces lipases</a>	<a href="#">Alignment</a> <a href="#">Tree</a>
Sequences 3		
Structures 0		

### Browse classification for GGGX class

Superfamilies	5
Homologous families	17
Proteins	430
Sequences	767
Structures	73
Links	<a href="#">Structure table</a>

Superfamily	Homologous family	Links
<b>Carboxylesterases</b>	<a href="#">Acetylcholinesterases</a>	<a href="#">Alignment</a> <a href="#">Tree</a>
Proteins 324	<a href="#">Alpha esterases</a>	<a href="#">Alignment</a> <a href="#">Tree</a>
Sequences 613	<a href="#">Bacillus esterases</a>	<a href="#">Alignment</a> <a href="#">Tree</a>
Structures 58	<a href="#">Caenorhabditis elegans esterases I</a>	<a href="#">Alignment</a> <a href="#">Tree</a>
	<a href="#">Caenorhabditis elegans esterases II</a>	<a href="#">Alignment</a> <a href="#">Tree</a>
	<a href="#">Drosophila esterases</a>	<a href="#">Alignment</a> <a href="#">Tree</a>
	<a href="#">Drosophila glutactin</a>	<a href="#">Alignment</a> <a href="#">Tree</a>
	<a href="#">Juvenile hormone esterases</a>	<a href="#">Alignment</a> <a href="#">Tree</a>
	<a href="#">Mammalian bile salt activated lipases</a>	<a href="#">Alignment</a> <a href="#">Tree</a>
	<a href="#">Mammalian carboxylesterases</a>	<a href="#">Alignment</a> <a href="#">Tree</a>
	<a href="#">Miscellaneous</a>	<a href="#">Alignment</a> <a href="#">Tree</a>
<b>Acinetobacter esterases</b>		
Proteins 27	<a href="#">Acinetobacter esterases</a>	<a href="#">Alignment</a> <a href="#">Tree</a>
Sequences 34		
Structures 0		
<b>Candida rugosa lipases</b>		
Proteins 9	<a href="#">Candida rugosa lipases</a>	<a href="#">Alignment</a> <a href="#">Tree</a>
Sequences 38		
Structures 10		
<b>Hormone sensitive lipases</b>	<a href="#">Hormone sensitive lipases</a>	<a href="#">Alignment</a> <a href="#">Tree</a>
Proteins 68	<a href="#">Moraxella lipase 2</a>	<a href="#">Alignment</a> <a href="#">Tree</a>
Sequences 80		
Structures 5	<a href="#">N-deacetylases</a>	<a href="#">Alignment</a> <a href="#">Tree</a>
<a href="#">Alignment</a> <a href="#">Tree</a>		
<b>Yarrowia lipolytica lipases</b>		
Proteins 2	<a href="#">Yarrowia lipolytica lipases</a>	<a href="#">Alignment</a> <a href="#">Tree</a>
Sequences 2		
Structures 0		

### Homologous family *Rhizomucor* lipases

Superfamily Filamentous fungi lipases  
 Proteins 33  
 Sequences 67  
 Structures 29  
 Links [Alignment](#) [Tree](#)

Organism	Protein	DB	ACC	Description	LED/3D
<i>Arabidopsis thaliana</i>	lipase-like protein	UN	<a href="#">NP_197365</a>	<i>Arabidopsis thaliana</i> triacylglycerol lipase-like protein, predicted mRNA	
<i>Arabidopsis thaliana</i>	lipase-like protein	GB	<a href="#">AAL24204</a>	<i>Arabidopsis thaliana</i> triacylglycerol lipase-like protein, predicted mRNA	
<i>Aspergillus awamori</i>	lipase	DDBJ	<a href="#">BAA92937</a>		
<i>Aspergillus niger</i>	Ferulic acid esterase A	GB SP	<a href="#">AAK60631</a> <a href="#">O42807</a>	<i>Aspergillus niger</i> cinnamoyl esterase FAEA mRNA, complete cds. Feruloyl esterase A precursor (Ferulic acid esterase A) (FAE-III).	
<i>Aspergillus oryzae</i>	lipase	DDBJ	<a href="#">BAA12912</a>	mono- and diacylglycerol lipase gene (mdIB)	
<i>Aspergillus tubingensis</i>	Ferulic acid esterase A	SP	<a href="#">O42815</a>	Feruloyl esterase A precursor (Ferulic acid esterase A).	
<i>Caenorhabditis elegans</i>	B0035.13	PIR	<a href="#">T18660</a>	hypothetical protein B0035.13	
<i>Caenorhabditis elegans</i>	F28H7.3	PIR	<a href="#">T21525</a>	hypothetical protein F28H7.3	
<i>Caenorhabditis elegans</i>	F46G10.4	PIR	<a href="#">T22322</a>	hypothetical protein F46G10.4	
<i>Caenorhabditis elegans</i>	T10B5.7	PIR	<a href="#">T33232</a>	hypothetical protein T10B5.7	
<i>Caenorhabditis elegans</i>	T21H3.1	PIR	<a href="#">T31740</a>	hypothetical protein T21H3.1	
<i>Caenorhabditis elegans</i>	Y110A7A.7	GB	<a href="#">AAF60431</a>	Hypothetical protein Y110A7A.7	
<i>Caenorhabditis elegans</i>	Y49E10.16	PIR	<a href="#">T27042</a>	hypothetical protein Y49E10.16	
<i>Caenorhabditis elegans</i>	Y49E10.18	PIR	<a href="#">T27044</a>	hypothetical protein Y49E10.18	
<i>Caenorhabditis elegans</i>	Y49E10.25	PIR	<a href="#">T27056</a>	hypothetical protein Y49E10.25	
<i>Caenorhabditis elegans</i>	Y51H4A.5	EMBL	<a href="#">CAB61137</a>	predicted using Genefinder	
<i>Dictyostelium discoideum</i>	lipase	GB	<a href="#">AAM43784</a>		
<i>Fusarium heterosporum</i>	lipase	PIR	<a href="#">JX0343</a>	triacylglycerol lipase (EC 3.1.1.3) precursor - <i>Fusarium heterosporum</i>	
<i>Nectria haematococca</i>	lipase	EMBL	<a href="#">CAC19602</a>		
<i>Neurospora crassa</i>	lipase	EMBL	<a href="#">CAC28687</a>		
<i>Oryza sativa</i>	lipase	DDBJ	<a href="#">BAB64204</a>		
<i>Penicillium camemberti</i>	lipase	SP PDB PIR	<a href="#">P25234</a> <a href="#">1TIA</a> <a href="#">S32403</a>	Mono- and diacylglycerol lipase precursor (MDGL). Lipase (E.C.3.1.1.3) (Triacylglycerol Acylhydrolase) monoacylglycerol/diacylglycerol lipase - <i>Penicillium camembertii</i>	<a href="#">1TIA</a>
<i>Penicillium cyclopium</i>	lipase	GB	<a href="#">AAF82375</a>	<i>Penicillium cyclopium</i> alkaline lipase mRNA, complete cds.	
<i>Penicillium expansum</i>	lipase	GB	<a href="#">AAG22769</a>		
<i>Rhizomucor miehei</i>	lipase	SP	<a href="#">P19515</a>		<a href="#">1TGL</a>

			PIR	<a href="#">A34959</a>	triacylglycerol lipase (EC 3.1.1.3) precursor 1 - Rhizomucor miehei	
			PDB	<a href="#">3TGL</a>	Triacylglycerol Acylhydrolase (E.C.3.1.1.3)	<a href="#">3TGL</a>
			PDB	<a href="#">5TGL</a>	Lipase (E.C.3.1.1.3) (Triacylglycerol Hydrolase)	<a href="#">4TGL</a>
			PDB	<a href="#">4TGL</a>	Complexed With N-Hexylphosphonate Ethyl Ester	<a href="#">5TGL</a>
			PDB	<a href="#">1TGL</a>	Triacylglycerol Acylhydrolase (E.C.3.1.1.3) Complex With Diethylphosphophate	
					Triacylglycerol Acylhydrolase (E.C.3.1.1.3)	
<i>Rhizomucor miehei</i>	lipase 2		PIR	<a href="#">B34959</a>	triacylglycerol lipase (EC 3.1.1.3) precursor 2 - Rhizomucor miehei	
<i>Rhizopus arrhizus</i>	lipase		PDB	<a href="#">1TIC</a>	Lipase (E.C.3.1.1.3) (Triacylglycerol Acylhydrolase)	<a href="#">1TIC</a>
			GB	<a href="#">AAF32408</a>		
<i>Rhizopus javensis</i>	lipase		PIR	<a href="#">S32492</a>	lipase - Rhizopus javanicus	
					Lipase precursor (Triacylglycerol lipase).	
			SP	<a href="#">P21811</a>	Lipase Ii From Rhizopus Niveus	<a href="#">1LGYA</a>
			PDB	<a href="#">1LGY</a>		<a href="#">1LGYB</a>
<i>Rhizopus niveus</i>	lipase		DDBJ	<a href="#">BAA31548</a>		<a href="#">1LGYC</a>
			PIR	<a href="#">JT0604</a>	triacylglycerol lipase (EC 3.1.1.3) - Rhizopus niveus	
			PDB	<a href="#">1LGYA</a>		
			PDB	<a href="#">1LGYC</a>		
<i>Synechocystis sp.</i>	lipase		PIR	<a href="#">S76637</a>	hypothetical protein - Synechocystis sp. (strain PCC 6803)	
					Lipase precursor (Triacylglycerol lipase).	
					Lipase (E.C.3.1.1.3) (Triacylglycerol Acylhydrolase)	<a href="#">1DT3A</a>
			SP	<a href="#">O59952</a>	The Structural Origins Of Interfacial Activation In Thermomyces (Humicola) Lanuginosa Lipase	<a href="#">1DT3B</a>
			PDB	<a href="#">1TIB</a>	The Structural Origins Of Interfacial Activation In Thermomyces (Humicola) Lanuginosa Lipase	<a href="#">1DT5A</a>
			PDB	<a href="#">1DTE</a>	The Structural Origins Of Interfacial Activation In Thermomyces (Humicola) Lanuginosa Lipase	<a href="#">1DT5B</a>
			PDB	<a href="#">1DT5</a>	The Structural Origins Of Interfacial Activation In Thermomyces (Humicola) Lanuginosa Lipase	<a href="#">1DT5C</a>
			PDB	<a href="#">1DU4</a>	The Structural Origins Of Interfacial Activation In Thermomyces (Humicola) Lanuginosa Lipase	<a href="#">1DT5D</a>
			PDB	<a href="#">1DT3</a>	The Structural Origins Of Interfacial Activation In Thermomyces (Humicola) Lanuginosa Lipase	<a href="#">1DT5E</a>
			PDB	<a href="#">1EIN</a>	The Structural Origins Of Interfacial Activation In Thermomyces (Humicola) Lanuginosa Lipase	<a href="#">1DT5F</a>
			PDB	<a href="#">1DT3B</a>	The Structural Origins Of Interfacial Activation In Thermomyces (Humicola) Lanuginosa Lipase	<a href="#">1DT5G</a>
			PDB	<a href="#">1DT5D</a>	The Structural Origins Of Interfacial Activation In Thermomyces (Humicola) Lanuginosa Lipase	<a href="#">1DT5H</a>
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	lipase		PDB	<a href="#">1DT5A</a>	The Structural Origins Of Interfacial Activation In Thermomyces (Humicola) Lanuginosa Lipase	<a href="#">1DTEA</a>
			PDB	<a href="#">1DT5C</a>	The Structural Origins Of Interfacial Activation In Thermomyces (Humicola) Lanuginosa Lipase	<a href="#">1DTEB</a>
			PDB	<a href="#">1DT5B</a>	The Structural Origins Of Interfacial Activation In Thermomyces (Humicola) Lanuginosa Lipase	<a href="#">1DU4A</a>
			PDB	<a href="#">1DT5E</a>	The Structural Origins Of Interfacial Activation In Thermomyces (Humicola) Lanuginosa Lipase	<a href="#">1DU4B</a>
			PDB	<a href="#">1DT5H</a>	The Structural Origins Of Interfacial Activation In Thermomyces (Humicola) Lanuginosa Lipase	<a href="#">1DU4C</a>
			PDB	<a href="#">1DT5G</a>	The Structural Origins Of Interfacial Activation In Thermomyces (Humicola) Lanuginosa Lipase	<a href="#">1DU4D</a>
			PDB	<a href="#">1DTEB</a>	The Structural Origins Of Interfacial Activation In Thermomyces (Humicola) Lanuginosa Lipase	<a href="#">1EINA</a>
			PDB	<a href="#">1DU4A</a>	The Structural Origins Of Interfacial Activation In Thermomyces (Humicola) Lanuginosa Lipase	<a href="#">1EINB</a>
			PDB	<a href="#">1DU4C</a>	The Structural Origins Of Interfacial Activation In Thermomyces (Humicola) Lanuginosa Lipase	<a href="#">1EINC</a>
			PDB	<a href="#">1EINC</a>	The Structural Origins Of Interfacial Activation In Thermomyces (Humicola) Lanuginosa Lipase	<a href="#">1TIB</a>
			PDB	<a href="#">1EINB</a>	The Structural Origins Of Interfacial Activation In Thermomyces (Humicola) Lanuginosa Lipase	

<i>Triticum aestivum</i>	lipase	EMBL <a href="#">CAD32696</a>
<i>Triticum aestivum</i>	lipase	EMBL <a href="#">CAD32695</a>