



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

**INSTITUTO HISPANO LUSO DE INVESTIGACIONES AGRARIAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA**

**CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO DEL SISTEMA DE LIPASAS DE
*Trichoderma harzianum***

Maria de Lurdes Antunes Jorge

Salamanca, 2015



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

**INSTITUTO HISPANO LUSO DE INVESTIGACIONES AGRARIAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA**

**CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO DEL SISTEMA DE LIPASAS DE
*Trichoderma harzianum***

Maria de Lurdes Antunes Jorge

Salamanca, 2015



VNiVERSiDAD D SALAMANCA

**INSTITUTO HISPANO LUSO DE INVESTIGACIONES AGRARIAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA**

**CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO DEL SISTEMA DE LIPASAS DE
*Trichoderma harzianum***

Memoria presentada por Maria de Lurdes Antunes Jorge para optar al grado
de Doctor por la Universidad de Salamanca

Salamanca, 4 de diciembre 2015

Altino Branco Choupina, Profesor Adjunto del Instituto Politécnico de Bragança y,
Francisco Javier González Ramos, Doctor en Farmacia,

CERTIFICAMOS:

Que la memoria titulada “**Contribución al estudio del sistema de lipasas de *Trichoderma harzianum***”, presentada por Maria de Lurdes Antunes Jorge para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca y el Instituto Hispano Luso de Investigaciones Agrarias (CIALE).

Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente, firmamos este certificado en Salamanca a 27 de noviembre de 2015.

Fdo.: **Altino Branco Choupina**

Fdo.: **Francisco Javier González Ramos**

Enrique Monte Vázquez, Catedrático de Microbiología en el Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca,

CERTIFICA:

Que la memoria titulada “**Contribución al estudio del sistema de lipasas de *Trichoderma harzianum***”, presentada por Maria de Lurdes Antunes Jorge para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo la dirección de los Drs. **Altino Branco Choupina** y **Francisco Javier González Ramos**, en el Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca y el Instituto Hispano Luso de Investigaciones Agrarias (CIALE).

Y como Tutor de esta tesis doctoral autorizo su presentación para que sea evaluada por el tribunal correspondiente.

En Salamanca a 30 de noviembre de 2015.

Fdo.: **Enrique Monte Vázquez**

Luiz R. Fernández Lago, Catedrático Acreditado de Microbiología, y Director del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca,

CERTIFICA:

Que la memoria titulada “**Contribución al estudio del sistema de lipasas de *Trichoderma harzianum***”, presentada por Maria de Lurdes Antunes Jorge para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo la dirección de los Drs. **Altino Branco Choupina** y **Francisco Javier González Ramos**, en el Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca y el Instituto Hispano Luso de Investigaciones Agrarias (CIALE).

Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente, firmamos este certificado en Salamanca a 4 de diciembre de 2015.

Fdo.: **Luiz R. Fernández Lago**

A João, Ana y Ricardo

A mi madre

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Enrique Monte, por permitirme participar en su grupo de investigación, por sus consejos y críticas, pero sobre todo, por su dedicación en la asesoría y revisión de este trabajo, y por siempre haber tenido tiempo para recibirme.

A los Drs. Altino Choupina y Francisco González por la dirección de esta tesis doctoral, y por su disponibilidad. También quería agradecer al Dr. Altino Choupina por haber financiado los costos de esta investigación con sus proyectos.

En USAL, a Isabel Grondona, Isabel Chamorro, Emma Keck y Luiz Sáenz, por su enseñanza y apoyo en la fase inicial de este proyecto. Al Dr. Ángel Domínguez, por recibirme algunas veces en su laboratorio, y a Laura Dúran y Carlos Cívicos, por su disponibilidad y ayuda en algunos ensayos realizados.

A todos los miembros de la Dirección de la Escola Superior Agrária de Bragança (ESAB) y a la Presidencia del Instituto Politécnico de Bragança (IPB), por todas las condiciones que han podido conceder para la realización de esta tesis.

A mis colegas Altino Choupina, Elsa Ramalhosa, José Alberto, Teresa Dias, Rui Abreu, Eugénia Gouveia, António Peres, Letícia Estevinho y Clementina Santos, por la permisión para utilizar sus equipos, reactivos, y/o por su enseñanza, consejos, ideas y críticas.

A Marisa Carvalho por me enseñar en la fase inicial de trabajo en laboratorio, y a Madalena Vaz, por el ánimo para continuar y por su amistad.

A Hélio Belo, do Instituto Português de Oncologia de Lisboa Francisco Gentil, por su ayuda con las RTs.

A Eric Pereira y a António por su empeño en ayudarme.

A Deolinda Mendes, Luís Ribeiro, Isaura Magalhães y Atilano Suarez, por su magnífico trabajo de impresión y encuadernación de este documento, y por su empeño y simpatía.

A mis amigos Elsa, Clementina y Amílcar, por el apoyo emocional y psicológico que me han dado durante estos años, y por su compañía y consejos, pero sobre todo gracias por la amistad.

A mis hijos, por toda su paciencia, cariño y comprensión a lo largo de estos años.

SIGLAS y ABREVIATURAS

%	Tanto por ciento
µg	Microgramo
µl	Microlitro
µmol	Micromoles
ADN	Acido desoxirribonucleico
ADNc	Acido desoxirribonucleico complementario
AG	Acidos gordos
AGE	Acidos gordos esenciales
AGI	Acidos gordos insaturados
AGMI	Acidos gordos monoinsaturados
AGPI	Acidos gordos poliinsaturados
AGS	Acidos gordos saturados
ARN	Acido ribonucleico
ATP	Adenosin trifosfato
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tools</i>
BrEt	Bromuro de etidio
BSA	Seroalbúmina bovina
°C	Grados centígrados
cADN	Acido desoxirribonucleico complementar
CAL-A	Lipasa de <i>Candida antarctica</i> A
CAL-B	Lipasa de <i>Candida antarctica</i> B
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
CWDEs	<i>Cell wall degrading enzymes</i>
DEPC	Dietil pirocarbonato
DAG	Diacilglicerol
DIG	Digoxigenina
DIG-AP	Complejo digoxigenina-fosfatasa alcalina
DNAsa.	Desoxirribonucleasa
dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfato
D.O.	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
dTTP	Desoxitimidina trifosfato
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético.
EST	<i>Expressed sequence tag</i>
ET	Etileno
g	Gramos
HE-TAIL PCR	<i>High-Efficiency Thermal Asymetric Interlaced PCR</i>
IPTG	Isopropil-β- D- tiogalactósido
Kb	Kilobase (1 Kb = 1000pb)
KDa	KiloDalton
l	Litro
ISR	Resistencia sistémica inducida
J	Julios
JA	Ácido jasmónico
LPP	Lipasa de páncreas porcino
M	Molar
MAG	Monoacilglicerol
MAMPs	Patrones moleculares asociados a microbios
min	Minuto
ml	Mililitro
mmol	Milimole
mM	Milimolar
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino) propano sulfónico
NCBI	<i>Nacional Center for Biotechnology Information</i>
nm	Nanómetros
nt	Nucleótidos
PAMPS	Patrones moleculares asociados a patógenos
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDA	Agar glucosado de patata

PMSF	Fenil-metil-sulfonil-fluoruro
PR	Relacionada con patogénesis
PVPP	Polivinilpirrolidona
p-NPB	p-nitrofenil butirato
p-NPP	p-nitrofenil palmitato
RNAasa	Ribonucleasa
rpm	Revoluciones por minuto
RSA	Resistencia sistémica adquirida
RT-PCR	PCR a tiempo real
s	Segundos
SA	Ácido salicílico
SAR	resistencia sistémica adquirida
SDS	Dodecil sulfato sódico
spp.	Especies
t	Tiempo
TAG	Triacilglicerol
TE	Tris-EDTA
TF	Factores de transcripción
U	Unidades (de anticuerpos o de actividad enzimática)
ufp	Unidades formadoras de placas de lisis
UTP	Uridina trifosfato
V	Vóltios
X-gal	5-bromo-4cloro-3indol-β-d-galactósido

AMINOÁCIDOS

A (Ala)	Alanina
C (Cys)	Cisteína
D (Asp)	Ácido aspártico
E (Glu)	Ácido glutámico
F (Phe)	Fenilalanina
G (Gly)	Glicina
H (His)	Histidina
I (Ile)	soleucina
K (Lys)	Lisina
L (Leu)	Leucina
M (Met)	Metionina
N (Asn)	Asparragina
P (Pro)	Prolina
Q (Gln)	Glutamina
R (Arg)	Arginina
S (Ser)	Serina
T (Thr)	Treonina
V (Val)	Valina
W (Trp)	Triptofano
Y (Tyr)	Tirosina

BASES NITROGENADAS

A	Adenina
C	Citosina
G	Guanina
T	Timina
U	Uracilo
R	G/A
Y	C/T
W	A/T
S	G/C
K	G/T
M	A/C
B	C/G/T, pero no A
D	A/G/T, pero no C
H	C/G/A, pero no G
V	C/G/A, pero no T
N	A/C/G/T

ÍNDICE

ÍNDICE.....	I
ÍNDICE DE FIGURAS.....	V
ÍNDICE DE TABLAS.....	IX
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 EL GÉNERO <i>Trichoderma</i>	1
1.1.1 Morfología y taxonomía.....	1
1.1.2 Ecología y interacción con otros microorganismos	2
1.1.2.1 Producción de enzimas líticas	3
1.1.2.2 Producción de metabolitos secundarios.....	4
1.1.3 Interacción con plantas.....	4
1.1.4 Aplicaciones del género <i>Trichoderma</i>	8
1.2 LIPASAS Y SUS SUSTRATOS	8
1.2.1 Definición y algunas características estructurales.....	8
1.2.2 Sustratos lipídicos.....	20
1.2.3 Proceso catalítico	26
1.2.4 Especificidad frente a sustratos.....	28
1.2.5 Microorganismos productores de lipasas	33
1.2.6 Aplicaciones industriales y biotecnológicas de las lipasas	39
1.2.6.1 En síntesis orgánica	39
1.2.6.2 En la industria alimentaria	41
1.2.6.3 En la industria de detergentes.....	43
1.2.6.4 En el procesamiento de pieles y cuero.....	43
1.2.6.5 En la industria textil	44
1.2.6.6 En la industria de productos cosméticos.....	44
1.2.6.7 En la producción de biodiesel.....	44
1.2.6.8 En bioremediación.....	45
1.2.6.9 En la industria de papel.....	46
2. OBJETIVOS.....	47
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	49
3.1 ESTs UTILIZADAS	49
3.2 MICROORGANISMOS UTILIZADOS.....	49
3.2.1 <i>Trichoderma harzianum</i>	49
3.2.2 <i>Escherichia coli</i>	49
3.2.3 <i>Pichia pastoris</i>	50

3.3 MEDIOS DE CULTIVO.....	50
3.3.1 Medios de cultivo para <i>T. harzianum</i>	51
3.3.2 Medios de cultivo para <i>E. coli</i>	51
3.3.3 Medios de cultivo para <i>P. pastoris</i>	52
3.3.4 Medios para determinación de actividad lipásica.....	53
3.3.4.1 Medios sólidos	53
3.3.4.2 Medios líquidos	54
3.4 CONDICIONES DE CULTIVO Y MANTENIMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS	55
3.5 VECTORES DE CLONACIÓN DE ADN O DE EXPRESIÓN UTILIZADOS.....	55
3.5.1 Plásmidos de levaduras	55
3.5.2 Plásmidos bacterianos	56
3.5.3 Plásmidos víricos	58
3.6 TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	59
3.6.1 Obtención de ADN genómico de <i>T. harzianum</i>	59
3.6.2 Obtención de ADN genómico de <i>P. pastoris</i>	59
3.6.3 Aislamiento de ADN plasmídico de <i>E. coli</i>	60
3.6.4 Aislamiento de ADN del fago λ GEM-11	60
3.6.5 Obtención de ARN	60
3.6.5.1 En <i>T. harzianum</i>	60
3.6.5.2 En <i>P. pastoris</i>	61
3.6.6 Valoración de la concentración de ácidos nucleicos.....	62
3.6.7 Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa	62
3.6.7.1 Electroforesis de fragmentos de ADN	62
3.6.7.2 Electroforesis de fragmentos de ARN	62
3.6.8 Purificación de fragmentos de ADN	63
3.6.9 Digestión del ADN con enzimas de restricción	63
3.6.10 Tratamiento con fosfatasa alcalina	64
3.6.11 Construcción de plásmidos recombinantes	64
3.6.12 Secuenciación de ADN	64
3.6.13 Reacciones de amplificación.....	65
3.6.13.1 Oligonucleótidos utilizados.....	65
3.6.13.2 PCR estándar.....	65
3.6.13.3 PCR para marcaje de las sondas de ADN con digoxigenina.....	65
3.6.13.4 High-Efficiency Thermal Asymmetric Interlaced (HE-TAIL) PCR.....	69
3.6.13.5 PCR a tiempo real (RT- qPCR).....	71
3.6.14 Hibridación de ácidos nucleicos.....	72
3.6.14.1 Preparación de sondas marcadas con digoxigenina	72
3.6.14.2 Detección de secuencias de ADN específicas (Southern Blot).	73
3.7 MÉTODOS DE TRANSFORMACIÓN	77

3.7.1 Transformación de <i>E. coli</i> con plásmidos replicativos	77
3.7.2 Transformación de <i>P. pastoris</i> con plásmidos integrativos.	78
3.7.2.1 Preparación de células (obtención de células electrocompetentes)	78
3.7.2.2 Electroporación de células	79
3.8 ANÁLISIS DE PROTEÍNAS	80
3.8.1 Obtención de extractos celulares	80
3.8.2 Obtención de extractos proteicos en sobrenadante de cultivo	80
3.8.3 Valoración de proteínas.....	80
3.8.4 Separación de proteínas en geles de poliacrilamida	81
3.8.5 Tinción de proteínas	81
3.8.6 Valoración de la actividad enzimática por espectrofotometría	81
3.8.6.1 En <i>p</i> -nitrofenil butirato	81
3.8.6.2 En <i>p</i> -nitrofenil palmitato.....	82
3.9 MICROSCOPIA	83
3.10 ANÁLISIS MEDIANTE TRATAMIENTO INFORMÁTICO DE LOS DATOS	83
3.10.1 Análisis informática de las secuencias de ADN y proteína	83
4. RESULTADOS	85
4.1 ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS CONTENIDAS EN LAS ESTS	85
4.1.1 Secuencia nucleotídica de la EST-9632.....	85
4.1.2 Secuencia nucleotídica de la EST-1279.....	86
4.2 ESTRATEGIAS PARA COMPLETAR LAS SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS DE LOS GENES <i>LIP1</i> Y <i>LIP2</i>	91
4.2.1 Rastreo de una genoteca de ADNc.....	91
4.2.2 Ejecución de HE-TAIL PCR.....	92
4.2.2.1 Obtención de la secuencia del gen <i>lip1</i>	92
4.2.2.2 Obtención de la secuencia del gen <i>lip2</i>	98
4.3 CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA NUCLEOTIDICA DEL GEN <i>LIP1</i>	103
4.3.1 Estudio de la región 5' no codificante	104
4.3.2 Estudio de la región 3' no codificante	110
4.3.3 Estudio de la región codificante.....	111
4.4 "SOUTHERN BLOT" EN <i>TRICHODERMA</i> SPP.....	126
4.4.1 Marcación de la sonda de hibridación	126
4.4.2 Análisis por "Southern Blot"	126
4.5 EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE LA SECUENCIA NUCLEOTIDICA DEL GEN <i>LIP1</i>	130
4.5.1 Clonación en el vector pIB2.....	130
4.5.2 Integración en <i>P. pastoris</i> por electroporación y selección de clones pIB2- <i>lip1</i>	131

4.5.3 Valoración de actividad lipásica en placa frente a distintos sustratos.....	133
4.5.3.1 Usando tributirina como sustrato	134
4.5.3.1 Usando tributirina como sustrato	135
4.5.3.2 Usando distintos aceites como sustrato.....	136
4.5.4 Medición de actividades por espectrofotometría.....	137
4.5.4.1 En <i>p</i> -nitrofenil butirato	137
4.5.4.2 En <i>p</i> -nitrofenil palmitato	142
4.5.5 Gel de proteínas.....	142
4.6 EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE <i>LIP1</i> POR RT-QPCR	142
4.6.1 En <i>T. harzianum</i>	142
4.6.2 En <i>P. pastoris</i>	143
5. CONCLUSIONES	145
BIBLIOGRAFÍA	147

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Crecimiento de <i>T. harzianum</i> GJS 97-265 en PDA, tras 72h en oscuridad (Samuels et al., sd).....	2
Figura 2 – Conidióforo de <i>T. harzianum</i> (Samuels et al., sd).....	2
Figura 3 – Representación esquemática de las resistencias sistémicas adquirida y inducida (Pieterse et al., 2009).....	7
Figura 4 – Reacción de hidrólisis de triacilgliceroles catalizada por lipasas (1) y reacción reversa de síntesis (2).....	9
Figura 5 – Plegamiento de las α/β hidrolasas (Ollis et al., 1992).....	10
Figura 6 – Representación de la estructura de la lipasa DUF2319 de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv (Lazniewski et al., 2011).....	11
Figura 7 – Centro activo de la lipasa de <i>Burkholderia cepacia</i> (Jaeger et al., 1999).....	13
Figura 8 – Conformación abierta (A) y cerrada (B) de la lipasa de <i>Rhizomucor miehei</i> (Rehm et al., 2010).....	15
Figura 9 – Superposición de las estructuras de la conformación cerrada y abierta de las lipasas de <i>R. miehei</i> (A) y de <i>C. rugosa</i> (B) (Petersen et al., 2001).....	16
Figura 10 – Hidrólisis de triacetina por esterasa de hígado de caballo y por lipasa pancreática de cerdo. Relación entre la velocidad de hidrólisis y la concentración del sustrato expresada en múltiplo de saturación (Verger & Haas, 1973).....	17
Figura 11 – Vistas laterales y frontales de una hélice en la conformación helicoidal canónica α (izquierda) y en conformación canónica 3_{10} (derecha) (Vieira-Pires & Morais-Cabral, 2010).....	17
Figura 12 – Corte transversal de las diferentes estructuras que los fosfolípidos pueden tomar en una solución acuosa (https://es.wikipedia.org/).....	21
Figura 13 – Conformación extendida habitual del ácido esteárico, un AG en C18 (A) y del ácido oleico, un AGMI de C18, con 1 doble enlace en la forma <i>cis</i> (B) (Nelson & Cox, 2000).....	24
Figura 14 – Ácidos grasos en C18 con distintos grados de insaturación.....	25
Figura 15 – Mecanismo detallado de hidrólisis de las lipasas (Hernaíz, 2012).....	27
Figura 16 – Algunas reacciones catalizadas por lipasas (Zarevúcka & Wimmer, 2008). (a) Hidrólisis, (b) Esterificación, (c) Transesterificación por acidólisis, (d) Transesterificación por alcoholisis, (e) Interesterificación y (f) Transesterificación por aminólisis.....	28
Figura 17 – Morfología del sitio de unión al sustrato de algunas enzimas lipolíticas.....	32
Figura 18 – Morfología del sitio de unión al sustrato de <i>C. antarctica</i> A (Widmann et al., 2010).....	32

Figura 19 – Estructura del vector de expresión pIB2 y secuencia del sitio de clonación múltiple, indicando los sitios únicos de restricción (Sears et al., 1988).	57
Figura 20 – Estructura de los vectores de clonación bacterianos: pBluescript (A)(Agilent Technologies, 2010) y pGEM-T (B) (Promega, 2010).	58
Figura 21 – Mapa del vector λ gt11 (Promega, 2011).	58
Figura 22 – Ensamblaje de algunas secuencias relativas a la EST-9632.	86
Figura 23 – Secuencia nucleotídica de la EST-9632 (algunas bases de la fase de lectura abierta del gen <i>lip1</i>).....	87
Figura 24 – Secuencia nucleotídica de la EST-9632 (las letras mayúsculas corresponden a una ORF parcial, las minúsculas al inicio del terminador de <i>lip1</i>).....	88
Figura 25 – Secuencia nucleotídica de la EST-9632 (secuencia parcial del terminador de <i>lip1</i>).	89
Figura 26 – Secuencia nucleotídica de la EST-1279 (algunas bases de la fase de lectura abierta del gen <i>lip2</i> , e inicio del terminador)..	90
Figura 27 A – Impresión de una película de Rayos X, mostrando la localización de las señales emitidas por la sonda marcada. B – Correspondencia entre las señales escogidas y las placas de lisis del fago.	91
Figura 28 – Representación esquemática de la amplificación por HE-TAIL PCR del gen <i>lip1</i>	92
Figura 29 – Electroforesis de los productos de reacción de la HE-TAIL PCR usada en la elucidación de <i>lip1</i>	93
Figura 30 – Secuencia nucleotídica parcial de <i>lip1</i> . Localización de los oligos utilizados en la segunda etapa de HE-TAIL PCR.	95
Figura 31 – Electroforesis de los productos de reacción de la segunda HE-TAIL PCR usada en la elucidación de <i>lip1</i>	95
Figura 32 – Secuencia deducida de aminoácidos de la proteína codificada por el gen <i>lip1</i> (parte inicial).....	96
Figura 33 – Secuencia deducida de aminoácidos de la proteína codificada por el gen <i>lip1</i> (parte final).	97
Figura 34 – Localización de los oligos específicos diseñados para completar la ORF de <i>lip2</i> por HE-TAIL PCR.....	99
Figura 35 – Electroforesis de los productos de reacción de la HE-TAIL PCR usada en la elucidación de <i>lip2</i>	100
Figura 36 – Secuencia nucleotídica de <i>lip2</i> obtenida a través de HE-TAIL PCR	101
Figura 37 – Representación de la secuencia nucleotídica de <i>lip2</i>	101
Figura 38 – Secuencia deducida de aminoácidos de la proteína codificada por el gen <i>lip2</i> (parte inicial).....	102

Figura 39 – Secuencia deducida de aminoácidos de la proteína codificada por el gen <i>lip2</i> (parte final).....	103
Figura 40 – Elementos de un promotor (Butler & Kadonaga, 2002).....	106
Figura 41 – Elementos del promotor de <i>lip1</i> (-1 a -693).	107
Figura 42 – Modelos de reconocimiento de las proteínas en dedo de zinc.	107
Figura 43 – Elementos del terminador de <i>lip1</i>	111
Figura 44 – Composición aminoacídica de la proteína codificada por el gen <i>lip1</i>	113
Figura 45 – Secuencia deducida de aminoácidos de la proteína codificada por el gen <i>lip1</i>	114
Figura 46 – Predicción de posibles péptidos señal en la proteína <i>lip1</i>	116
Figura 47 – Predicción de posibles hélices transmembrana en la proteína <i>lip1</i> (Sonnhammer et al., 1998; Krogh et al., 2001).....	116
Figura 48 – Predicción de sitios de fosforilación en <i>lip1</i> (Blom et al., 1999).	117
Figura 49 – Predicción de la estructura secundaria de <i>lip1</i> de acuerdo con el "Hierarchical Neural Network" (Combet et al., 2000).	119
Figura 50 – Alineamiento de las estructuras primarias de las proteínas Q2TFW1 de <i>O.</i> <i>picea</i> y B0B099 de <i>T. harzianum</i> , de acuerdo con el algoritmo de Clustal (Larkin et al., 2007).....	120
Figura 51 – Representación gráfica de la predicción de la estructura tridimensional de <i>lip1</i>	121
Figura 52 – Representación predictiva de las estructuras tridimensionales de 4BE4 de <i>O.</i> <i>picea</i> (A) y de <i>lip1</i> de <i>T. harzianum</i> (B), y su superposición (C).....	122
Figura 53 – Pormenor de <i>lip1</i> evidenciando la tríada catalítica y el hueco oxianiónico.	123
Figura 54 – Tríada catalítica y hueco oxianiónico.	123
Figura 55 – <i>Lip1</i> con la localización de los residuos involucrados en la ligación al sustrato ("substrate binding pocket") (A), y posible posición de la tapadera ("lid" o "flap") (B)...	124
Figura 56 – Representación gráfica de las estructuras tridimensionales de 4be9 y 4be4 de la proteína Q2TFW1 de <i>O. picea</i>	127
Figura 57 – Presumibles conformaciones de la tapadera en <i>Lip1</i>	128
Figura 58 – Marcación de la sonda del gen <i>lip1</i> con digoxigenina.....	128
Figura 59 – Representación del fragmento de genómico conocido alrededor de la ORF de <i>lip1</i>	129
Figura 60 – Análisis por Southern blot del gen <i>lip1</i> en <i>T. harzianum</i>	130
Figura 61 – Southern blot del gen <i>lip1</i> en diferentes especies del género <i>Trichoderma</i>	130
Figura 62 – Electroforesis de los plásmidos pIB2 y pIB2- <i>lip1</i> antes (A) y después desfosforilación (B).	131
Figura 63 – El plásmido recombinante pIB2- <i>lip1</i>	132
Figura 64 – Confirmación de la integración de <i>lip1</i> en el vector pIB2 (parte final del ORF).	133

Figura 65 – Halos de actividad esterásica (A e B) y fluorescencia debidos a actividad lipásica) del clon pLJ4.....	134
Figura 66 – Halos de fluorescencia debidos a actividad lipásica de los clones pLJ17, pLJ4 y pLJ1, ocho días después la inoculación en medio ADL con aceite de maíz al 3%...	135
Figura 67 – Halos de fluorescencia debidos a actividad lipásica de los clones pLJ17, pLJ4 y pLJ1, veinte días después la inoculación en medio ADL con aceite de oliva (A), de maíz (B) y de soja (C) al 3% y glucose al 0,3%.....	136
Figura 68 – Valores de absorbancia obtenidos con extractos celulares del clon pLJ4 usando el <i>p</i> -nitrofenil butirato como sustrato.	139
Figura 69 – Valores de absorbancia obtenidos con extractos celulares de levadura GS115-pB2 usando el <i>p</i> -nitrofenil butirato como sustrato.....	139
Figura 70 – Valores de absorbancia obtenidos con sobrenadante de levadura pLJ4 usando el <i>p</i> -nitrofenil butirato como sustrato.....	140
Figura 71 – SDS-PAGE obtenido con extractos proteicos celulares de las levaduras GS115 y pLJ4 (crecimiento de 48h en YEPD).....	142
Figura 72 – ARN de <i>T. harzianum</i>	143
Figura 73 – Expresión de <i>lip1</i> en medio al 2% de aceite de soja.....	144

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 – Diferencias entre lipasas y carboxilesterasas.....	19
Tabla 2 – Clasificación de las enzimas lipolíticas usada en LED	19
Tabla 3 – Composición porcentual en ácidos gordos de algunos aceites y grasas	21
Tabla 4 – Clasificación de ácidos grasos saturados.....	22
Tabla 5 – Clasificación de ácidos grasos monoinsaturados.....	23
Tabla 6 – Clasificación de ácidos grasos poliinsaturados	24
Tabla 7 – Bacterias productores de lipasas.....	35
Tabla 8 – Hongos filamentosos productores de lipasas	37
Tabla 9 – Levaduras productoras de lipasas.....	39
Tabla 10 – Características de las cepas de <i>E. coli</i> utilizadas.....	49
Tabla 11 – Cepa de <i>P. pastoris</i> utilizada	50
Tabla 12 – Listado de las secuencias de oligonucleótidos usados en la caracterización de <i>lip1</i>	66
Tabla 13 – Listado de las secuencias de oligonucleótidos usados en la caracterización de <i>lip2</i>	67
Tabla 14 – Listado de las secuencias de los oligonucleótidos de uso común utilizados en el desarrollo de este trabajo.	67
Tabla 15 – Reacciones, ciclos y condiciones de HE-TAIL PCR usados en la elucidación de <i>lip1</i>	70
Tabla 16 – Reacciones, ciclos y condiciones de HE-TAIL PCR usados en la elucidación de <i>lip2</i>	70
Tabla 17 – Etapas y ciclos usados en la síntesis de ADNc.....	71
Tabla 18 – Etapas y ciclos usados en RT-qPCR.....	72
Tabla 19 – Intrón del gen <i>lip1</i>	104
Tabla 20 – Factores de transcripción predichos en el promotor de <i>lip1</i>	108
Tabla 21 – Número de veces de utilización de cada codón por aminoácido.....	112
Tabla 22 – Sitios con probabilidad de ocurrencia de sumoilación.....	118
Tabla 23 – Diámetro de los halos de degradación de lípidos y de las colonias (cm) en placas de Agar Tributirina	136

1. INTRODUCCIÓN

1.1 EL GÉNERO *Trichoderma*

1.1.1 Morfología y taxonomía

Los hongos del género *Trichoderma*, de los cuales se conoce el estado teleomorfo (sexual) pertenecen a la familia *Hypocreaceae*, orden *Hypocreales* y clase *Sordariomycetes* del filo *Ascomycota* (Samuels et al., sd). Se han descrito varias parejas anamorfo/teleomorfo, incluyendo algunas especies importantes como agentes de biocontrol, tales como *T. harzianum*/*Hypocrea lixii*, *T. viride*/*H. rufa*, *T. atroviride*/*H. atroviridis* y *T. virens*/*H. virens* (Chaverri et al., 2001; Chaverri & Samuels, 2002; Chaverri et al., 2003a,b; Dodd et al., 2003). Las especies sin fase sexual conocida son incluidas en una categoría artificial en el filo *Deuteromycota*, y en la clase de los *Hyphomycetes* (Gams et al., 1987).

De acuerdo con Samuels et al. (sd), para *T. harzianum* la temperatura óptima de crecimiento en PDA son los 30°C: en estas condiciones, y en oscuridad, hay abundante formación de conidios en la parte central de la placa, y a lo largo de ésta en anillos concéntricos. En muchas colonias las conidias tienen inicialmente una coloración amarilla, volviéndose amarillo-esverdeadas, incluso totalmente verdes (Figura 1). Muchas veces el pigmento amarillo acaba por difundirse en el medio. De acuerdo con estos autores, las primeras conidias de color verde se detectan para la mayoría de las estirpes de *T. harzianum* entre las 24 y las 40-48h tras la inoculación, cuando desarrolladas en PDA a 30°C y en oscuridad.

Los conidióforos son muy ramificados y tienen un aspecto piramidal. Los fiálidos se disponen en verticilos de 2-4, haciendo un ángulo de 90° con la hifa de donde emergen, o son solitarios; los verticilados tienen típicamente la forma de globo amplio en el medio (Figura 2), terminado en punta y constricto abajo esta. Los fiálidos terminales son más cilíndricos y mayores que los subterminales. No hay formación de fiálidos intercalares. Las conidias son subglobosas a ovóides, sin irregularidades y de color verde.

En determinadas condiciones de estrés, ya sea nutricional o por desecación, se forman sobre el micelio esporas asexuales de resistencia denominadas clamidosporas. Las clamidosporas son globosas a subglobosas y se sitúan en la posición terminal o intercalar de hifas. No son observables en la mayor parte de los cultivos.

Las ascas de *H. lixii* son cilíndricos y contienen 8 ascósporas dimórficas.

INTRODUCCIÓN

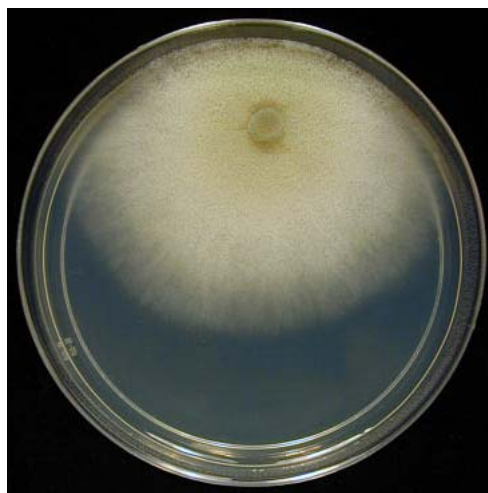


Figura 1 – Crecimiento de *T. harzianum* GJS 97-265 en PDA, tras 72h en oscuridad (Samuels et al., sd).

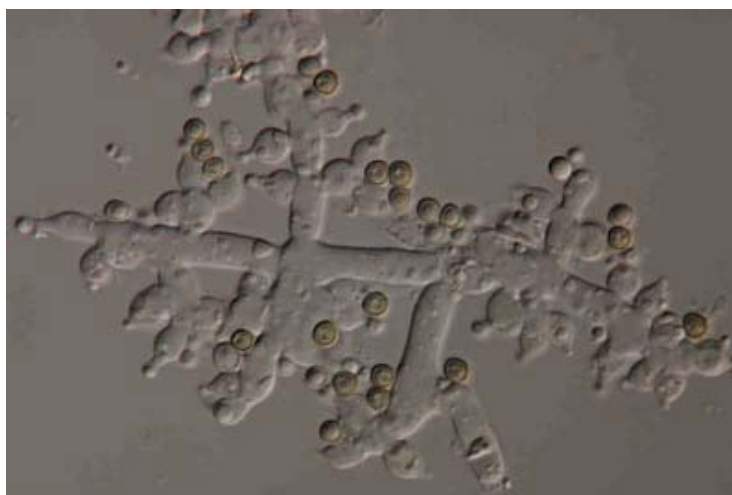


Figura 2 – Conidióforo de *T. harzianum* (Samuels et al., sd).

El número de cromosomas y el tamaño del genoma varían según la especie, entre 3 a 7 y de 31,7 Mb, en *T. longibrachiatum* SMF2 (Xie et al., 2014) a 40,9 Mb para *T. harzianum* CBS 226.95 (<http://genome.jgi-psf.org/>), respectivamente.

1.1.2 Ecología y interacción con otros microorganismos

Trichoderma está presente en casi todos los suelos y en hábitats diversos (creciendo en madera, corteza, sobre y dentro otros hongos y sustratos innumerables), y tienen una amplia distribución geográfica, demostrando su gran adaptabilidad a diversas condiciones ecológicas (Błaszczuk et al., 2014). Su crecimiento es muy rápido y producen abundantes esporas asexuales en distintas condiciones ambientales, incluyendo variaciones de pH y de nutrientes (Vinale et al., 2008a; Harman et al., 2012).

INTRODUCCIÓN

Por su adaptación a distintos entornos, los hongos del género *Trichoderma* pueden sobrevivir bajo un amplio rango de condiciones. Su interacción con otros microorganismos incluye competición por nutrientes y espacio, antibiosis e hiperparasitismo. En el proceso de hiperparasitismo, *Trichoderma* spp. reconocen a los fitopatógenos, atacándolos, y penetrando gradualmente sus células, provocándoles la muerte (Vinale, et al., 2008b; Brotman et al., 2010).

1.1.2.1 Producción de enzimas líticas

Las enzimas líticas producidas por *Trichoderma* spp. juegan un papel considerable en el proceso de hiperparasitismo: no solo son capaces de degradar las paredes celulares de los hongos fitopatógenos, constituidas por quitina y glucanos, sino también las de oomicetos, como *Phytophthora* spp. o *Pythium* spp., constituidas por celulosa y degradadas por β -1,3 y β -1,6-glucanasas.

De acuerdo con Strakowska et al. (2014) las enzimas líticas de *Trichoderma* incluyen celulasas, xilanasas, pectinasas, glucanasas, lipasas, amilasas, arabinasas y proteasas. Para Monte (2001), las enzimas quitinolíticas y glucanolíticas son las enzimas con mayor importancia en la degradación de las paredes celulares de fitopatógenos. Haran et al. (1996) describieron diversas enzimas quitinolíticas identificadas en *T. atroviride*, *T. asperellum* y *T. harzianum*, incluyendo endoquitinasas, β -N-acetilglucosamidases y quitobiosidasas. De acuerdo con Druzhinina et al. (2011), los genomas de *T. atroviride* y de *T. virens* codifican para el mayor número de enzimas quitinolíticas descritas en hongos. Además, según los mismos autores, la existencia de un elevado número de proteasas en *Trichoderma* indica la importancia de estas enzimas en el micoparasitismo. Las proteasas afectan a la actividad enzimática de hongos fitopatógenos como *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium culmorum*, y del nemátodo *Meloidogyne javanica* (Sharon et al., 2001), pero también ejercen un control sobre la actividad y estabilidad de las enzimas extracelulares de *Trichoderma*, y ejecutan modificaciones postraduccionales en sus celulasas (Viterbo et al., 2004). La capacidad de *Trichoderma* de producir celulasas le permite hiperparasitar oomicetos como *Phytophthora* spp. o *Pythium* spp.

Para Viterbo et al. (2002) además de producir enzimas hidrolíticas capaces de degradar las hifas de hongos fitopatógenos y parasitarlos (quitinasas, glucanasas, celulasas, proteasas y lacasas), *Trichoderma* spp. consigue colonizar y degradar numerosas estructuras de resistencia que permanecen en el suelo, constituyendo un foco de infección para las plantas, como los esclerocios de *Sclerotinia* spp., *Sclerotium rolfsii*, *B. cinerea* y *R. solani*. Por todo esto, se ha hecho popular su utilización como biofungicida (Mukherjee, 2012).

INTRODUCCIÓN

Aunque se han identificado numerosas enzimas líticas, poco o nada se ha publicado sobre la existencia de lipasas, y luego sobre su modo de acción, o su implicación en los procesos de interacción de *Trichoderma* con otros hongos y con las plantas.

1.1.2.2 Producción de metabolitos secundarios

La producción de más de 200 metabolitos secundarios diferentes, algunos de los cuales con actividad antibiótica (Reino et al., 2008), es otro aspecto relacionado con la capacidad de biocontrol de *Trichoderma* spp. Entre ellos cabe destacar los peptaiboles, las 6-pentil- α -pironas (6PP) y los terpenos. En comparación con otros hongos, *T. virens* tiene el mayor número de péptido sintetetasas no ribosomales, involucradas en la síntesis de metabolitos secundarios con actividad antifúngica (Błaszczuk et al., 2014).

Los peptaiboles son pequeños polipéptidos con efecto antibiótico, caracterizados por tener aminoácidos no proteínogénicos (Degenkolb et al., 2003). Incluyen diversos compuestos sintetizados por distintas especies del género *Trichoderma* (*T. viride*, *T. harzianum*, *T. longibrachiatum*, *T. koningii* y *T. atroviride*, entre otros), teniendo actividad frente a diversos hongos, bacterias Gram-positivas y algunos virus.

De acuerdo con Błaszczuk et al. (2014) las 6PPs son producidas por *T. harzianum*, *T. koningii* y *T. viride*, tienen efectos en el biocontrol de *B. cinerea*, *Fusarium oxysporum* y *R. solani*. Otros compuestos producidos por *Trichoderma* spp. presentan actividad bactericida y fungicida frente a distintos hongos y bacterias Gram positivas y Gram negativas (Reino et al., 2008).

Los terpenos poseen actividades antibacterianas, antifúngicas, antivíricas, antiparasitarias, antitumorales y antiinflamatorias (Savoia et al., 2004; Trombetta et al., 2005; Chinworrungsee et al., 2008).

En hongos del género *Trichoderma* hay frecuentemente una acción conjunta de actividades líticas y de antibióticos, originando un nivel de protección a enfermedades más elevado, comparado con el de cada uno de estos agentes actuando de forma individual (Monte, 2001).

1.1.3 Interacción con plantas

La producción de un elevado número de enzimas activas sobre compuestos hidrocarbonados, responsables de la digestión extracelular de materia orgánica muerta o en descomposición está relacionada con el comportamiento saprofito de *Trichoderma* (Kubicek et al., 2011). En contraste, los genomas de *Trichoderma* spp. codifican relativamente pocas enzimas que puedan descomponer pectina, el cemento de la pared

INTRODUCCIÓN

celular vegetal, lo que indica una relación especial con las plantas vivas (Hermosa et al., 2013). Se sabe que *T. harzianum*, al igual que *T. virens*, no sólo puede crecer en las raíces de las plantas, sino que además sus hifas pueden penetrar la epidermis de las raíces (endofitismo), con efectos indirectos en la mejora del crecimiento de plantas y en el sistema inmunológico. De acuerdo con Shores et al. (2010) y con Hermosa et al. (2012), *Trichoderma* spp. tienen los efectos beneficiosos de promover el crecimiento de las plantas y su capacidad de defensa contra el ataque de patógenos y el estrés ambiental, además de mejorar la productividad del suelo. Muchos de estos hongos producen ácidos (glucónico, cítrico o cumárico), originando la liberación de fósforo y de micronutrientes, que así se encuentran disponibles para las plantas (Harman et al., 2004). Algunas especies son capaces de producir compuestos que funcionan como fitohormonas del tipo auxínico, incrementando la biomasa vegetal y el desarrollo radicular (Contreras-Cornejo et al., 2009). Este es el caso de *T. virens* que, cuando se cultiva en condiciones axénicas, produce los compuestos del tipo auxínico ácido-3-indolacético, indol-3-acetaldehído y indol-3-etanol (Mukherjee, 2012).

Enzimas, toxinas y diversas moléculas de pequeño tamaño, muy conservadas entre microorganismos, ya sean patógenos o no, son reconocidas por receptores existentes en la membrana citoplasmática de las plantas (Faulkner & Robatzek, 2012), como es el caso de los denominados MAMPs/PAMPs (patrones moleculares asociados a microbios/patógenos). El reconocimiento recíproco origina una red de señalización mediada por fitohormonas, involucrando los ácidos salicílico (SA) y jasmónico (JA), y el etileno (ET). La producción de SA es una respuesta de la planta al ataque de fitopatógenos, según un mecanismo conocido como resistencia sistémica adquirida (SAR, en inglés).

La percepción de PAMPs provoca una rápida producción extracelular de peroxidasas de la pared celular en la planta (Daudi et al., 2012; O'Brien et al., 2012). Estas pueden funcionar a diferentes niveles: dañar el patógeno directamente, provocar la modificación de la pared celular vegetal (deposición de calosa, por ejemplo), servir como una molécula de señalización (Faulkner & Robatzek, 2012), o provocar la lisis de las células cercanas al patógeno (Díaz-Puentes, 2012).

JA y ET son moléculas de transducción de señales que están relacionadas con el reconocimiento de microorganismos beneficiosos para la planta, como las rizobacterias o el mismo *Trichoderma*. La interacción previa con microorganismos beneficiosos activa los mecanismos de defensa de la planta frente a patógenos, de acuerdo con el concepto de resistencia sistémica inducida (ISR, en inglés), similar al de una vacuna, aunque los mecanismos de defensa implicados sean completamente distintos, y el agente de control biológico pueda estar o no filogenéticamente próximo al patógeno. La ISR origina en la

INTRODUCCIÓN

planta la expresión de genes relacionados con la defensa y se traduce en la producción de β -1,3-glucanasas y fitoalexinas, de peroxidases relacionadas con el refuerzo de la pared celular vegetal, de calosa, glicoproteínas ricas en hidroxiprolina o relacionadas con la deposición de lignina, o de proteínas relacionadas con patogénesis (PR) vegetal (Díaz et al., 2005; Nawrocka & Malolepsza, 2013). La representación esquemática de las respuestas SAR e ISR se encuentra en la Figura 3.

De acuerdo con Hermosa et al. (2013), los distintos grupos de metabolitos y las enzimas líticas de *Trichoderma* spp. funcionan como inductores de resistencia en las plantas. En las cepas más eficientes en la colonización de raíces fueron identificadas numerosas proteínas (xilanasas, celulasas, cerato-plataninas y endopoligalacturonasas) y metabolitos secundarios, entre los cuales peptaiboles y 6PP (harzianolida y harzianopiridona), todos ellos funcionando como MAMPs (Brotman et al., 2008; Vinale et al., 2008; Hermosa et al., 2012). Estas cepas tienen de ser capaces de adherirse a la superficie radicular, de penetrar sus hifas en el apoplasto de las raíces y de resistir la acción de los metabolitos producidos por la planta como respuesta a la invasión (Hermosa et al., 2012). En *T. asperellum*, la adherencia puede ser mediada por hidrofobinas o por enzimas semejantes a expansinas, las primeras pudiendo desempeñar un efecto protector frente a los compuestos de defensa producidos por las plantas (Viterbo & Chet, 2006), las últimas reconocen a la celulosa de la pared vegetal y modifican su arquitectura, posibilitando la colonización de las raíces (Brotman et al., 2008). Morán-Diez et al. (2009), han descrito la participación de una enzima de degradación de las paredes vegetales, la endopoligalacturonasa ThPG1 de *T. harzianum*, en el proceso de colonización radicular.

En cuanto a la resistencia de cepas de *Trichoderma* frente a los metabolitos producidos por la planta como respuesta al proceso invasivo, se piensa que está relacionada con la capacidad de degradación de los compuestos fenólicos producidos y exudados por la planta (Chen et al., 2011), con la supresión de producción de fitoalexinas (Masunaka et al., 2011) o por inactivación de actividades enzimáticas dañinas para el hongo, como por ejemplo, las de la actividad quitinasa (Stergiopoulos & de Wit, 2009).

Se han obtenido plantas transgénicas, en las que se incluyeron genes de *Trichoderma* spp. con objetivos diversos, principalmente para conferir resistencia a enfermedades (Lorito et al., 1998; Brants & Erle, 2001; Liu et al., 2004; Dana et al., 2006; Gentile et al., 2007; Baranski et al., 2008; Shah et al., 2009). Otro aspecto menos conocido es la influencia del transgén en la tolerancia al estrés abiótico. Hermosa et al. (2011) refieren que la expresión del gen *Thkel1* de *T. harzianum* en *Arabidopsis* ha originado un incremento de tolerancia a la salinidad. Anteriormente se había expresado el gen *hsp70*, que codifica una “heat shock

INTRODUCCIÓN

protein” de *T. harzianum*, también en *Arabidopsis*, para inducir resistencia a temperaturas elevadas, salinidad y sequía (Montero-Barrientos et al., 2010).

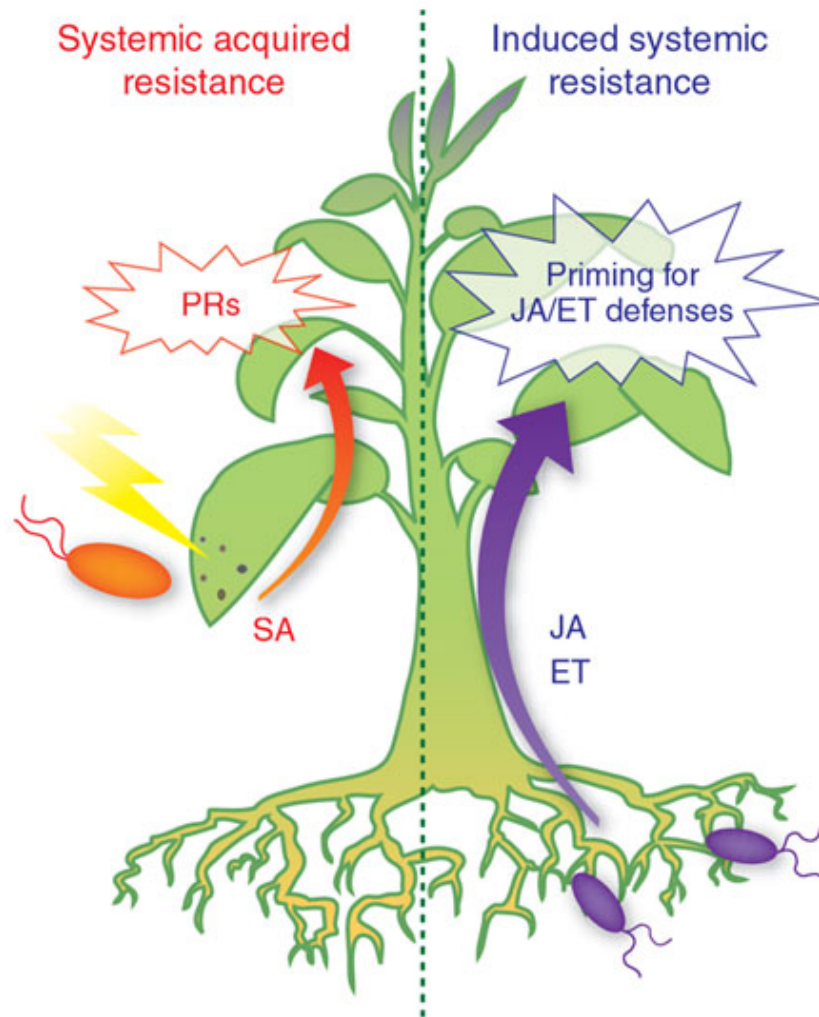


Figura 3 - Representación esquemática de las resistencias sistémicas adquirida y inducida (Pieterse et al., 2009).

La resistencia sistémica adquirida (**SAR**) es típicamente activa en los tejidos no afectados de plantas infectadas a nivel local. Tras la infección de patógenos, una señal móvil viaja a través del sistema vascular para activar las respuestas de defensa en los tejidos distales. El ácido salicílico (**SA**) es una molécula señalizadora esencial para el inicio de la SAR, ya que se requiere para la activación de un gran conjunto de genes que codifican proteínas con propiedades antimicrobianas, relacionadas con la patogénesis (**PR**). La resistencia sistémica inducida (**ISR**) se activa típicamente en la colonización de raíces de las plantas por microorganismos beneficiosos. Al igual que la SAR, una señal viaja a través del sistema vascular para activar la inmunidad sistémica en partes aéreas de la planta. La ISR es comúnmente regulada por vías de señalización dependientes de ácido jasmónico (**JA**) y etileno (**ET**), y por lo general no está asociada a la activación directa de genes PR. En cambio, las plantas que expresan ISR están preparadas para acelerar la expresión génica dependiente de JA y de ET tras el ataque del patógeno. Tanto la SAR como ISR son eficaces contra un amplio espectro de patógenos de plantas.

1.1.4 Aplicaciones del género *Trichoderma*

El género *Trichoderma* contiene especies de gran importancia económica por la producción de enzimas, y por su uso en agricultura y en bioremediación (Lorito et al., 2010). *Trichoderma reesei* secreta una panoplia de enzimas que están siendo explotadas comercialmente en áreas tan distintas como las de blanqueo de papel reciclado, de alimentación animal o de producción de biodiesel (Kubicek et al., 2009; Seidl et al., 2009; Rosgaard et al., 2007; Rahman et al., 2009).

Varias especies de *Trichoderma* presentan resistencia a algunos fungicidas comúnmente utilizados en agricultura, como los compuestos organoclorados de tipo endosulfano (Smith, 1995; Shaban & El-komy, 2001) y los bencimidazoles (Mukherjee et al., 2003). Este hecho, junto con su velocidad de crecimiento y su fácil adaptación a diversas condiciones climáticas y edáficas, da ventaja a *Trichoderma* sobre muchos otros hongos filamentosos, en la colonización de suelos, cuando forman parte de formulados utilizados en el control de fitopatógenos. Por su capacidad micotrófica, producción de enzimas hidrolíticas y distintos metabolitos, es usual su uso como agente de biocontrol, como componente principal en la formulación de distintos biofungicidas comerciales, de aplicación a semillas o al suelo, o para aplicación foliar. Muchas especies de *Trichoderma* (*T. asperellum*, *T. atroviride*, *T. gamsii*, *T. hamatum*, *T. harzianum*, *T. viride* o *T. virens*) son utilizadas en control biológico en agricultura. En algunos casos su utilización, combinada con la de pesticidas convencionales permite reducir la dosis de estos últimos, gracias al efecto sinérgico de la acción de ambos tipos de tratamiento (Monte, 2001; Harman et al., 2004; Jiménez-Díaz et al., 2010).

Algunas especies de *Trichoderma* se usan en la biorremediación de suelos contaminados con metales pesados, como el cadmio o níquel (Cao et al., 2008), o en contaminaciones ambientales como las causadas por el hidrocarburo fenantreno (Hadibarata et al., 2007).

1.2 LIPASAS Y SUS SUSTRATOS

1.2.1 Definición y algunas características estructurales

De acuerdo con la clasificación de la Comisión Enzimática (EC) de la IUBMB¹, las enzimas EC 3.1.1 hidrolizan ésteres de ácidos carboxílicos, incluyendo entre otras, las carboxilesterasas (EC.3.1.1.1), las triacilglicerol acilhidrolasas o triacilglicerol lipasas (EC.3.1.1.3), las esterol esterazas (EC.3.1.1.13) y las cutinasas (EC.3.1.1.74). Todas estas enzimas poseen actividad lipolítica. Mientras las carboxilesterasas preferentemente rompen

¹ International Union of Biochemistry and Molecular Biology (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/>).

INTRODUCCIÓN

enlaces éster de ácidos grasos de cadena corta, y suelen mostrar mayor actividad hacia el estado soluble de su sustrato, las triacilglicerol lipasas (también designadas como lipasas verdaderas) muestran una más amplia gama de sustratos y mayor actividad en el estado agregado de su sustrato (Fojan et al., 2000). Las cutinasas difieren de las lipasas clásicas ya que, además de degradar polímeros de cutina, muestran actividad hidrolítica para una amplia variedad de ésteres, desde ésteres solubles sintéticos de cadena corta (por ejemplo *p*-nitrofenil ésteres) hasta triglicéridos insolubles de cadena larga (Carvalho et al., 1998; Egmond & Vlieg, 2000), ejerciendo funciones intermedias entre las esterasas y las lipasas (Egmond & Vlieg, 2000; Kwon et al., 2009; Casas-Godoy, 2012). Cuanto a las esteroles esterasas (o colesterol esterasas), actúan en ésteres de esteroides y ácidos grasos de cadena larga (Barriuso et al., 2013).

Las triacilglicerol lipasas son enzimas ubicuas en la naturaleza, siendo producidas por animales, plantas y microorganismos procariotas y eucariotas (Savitha et al., 2007; Thakur, 2012; Gutiérrez-Fernández et al., 2014), al igual que las carboxilesterasas (Fojan et al., 2000) y esteroles esterasas (Barriuso et al., 2013). En presencia de agua actúan en las ligaciones éster carboxílicas de acilglicéridos, liberando ácidos grasos y glicerol, de acuerdo con la reacción esquematizada en la Figura 4.

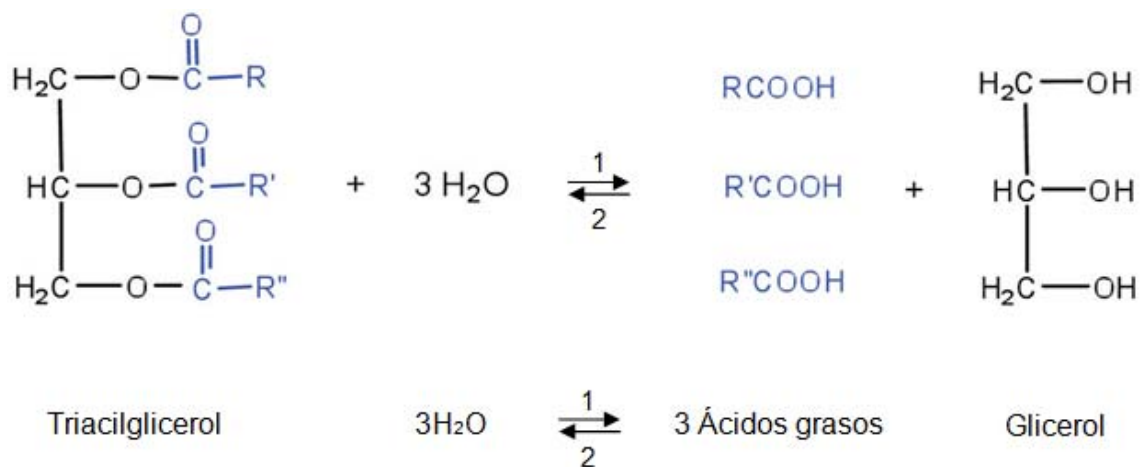


Figura 4 – Reacción de hidrólisis de triacilglicéridos catalizada por lipasas (1) y reacción reversa de síntesis (2).

Los sustratos característicos de las lipasas en las reacciones de hidrólisis son triacilglicéridos de cadena larga, es decir, los de cadena con un número de átomos de carbono igual o superior a diez, considerándose la trioleína como sustrato estándar (Jaeger et al., 1999; Gupta et al., 2004; Faber, 2011). Estos sustratos tienen baja solubilidad en agua, siendo las reacciones catalizadas en la interfase lípido-agua, lo que las distingue de las esterasas (Pandey et al., 1999), que actúan en sustratos solubles en agua (Fojan et al., 2000). Aunque los triacilglicéridos de cadena corta, con un número de átomos de carbono

INTRODUCCIÓN

inferior a diez, siendo la tributirina un sustrato estándar, sean considerados sustratos típicos de esterasas (Jensen, 1983), la verdad es que la mayoría de las lipasas consigue utilizarlos (Jaeger et al., 1999; Wong & Schotz, 2002; Gupta et al., 2004). De acuerdo con Svendsen (2000), muchas veces estas enzimas expresan actividades características de distintas esterasas, tales como: fosfolipasa, isofosfolipasa, colesterol esterasa y cutinasa, entre otras.

La estructura tridimensional de carboxilesterasas, triacilglicerol lipasas, esteroles esterasas y cutinasas, revela la existencia del plegamiento típico de las α/β -hidrolasas que, según Ollis et al. (1992) y Kazlauskas (1998) estaría formado por una estructura polipeptídica central de ocho láminas β ($\beta 1$ a $\beta 8$, ordenadas de acuerdo con la secuencia 12435678), en que la segunda ($\beta 2$) sería antiparalela. Las cadenas $\beta 3$ a $\beta 8$ estarían interconectadas y rodeadas por hélices α (αA a αF - Figura 5).

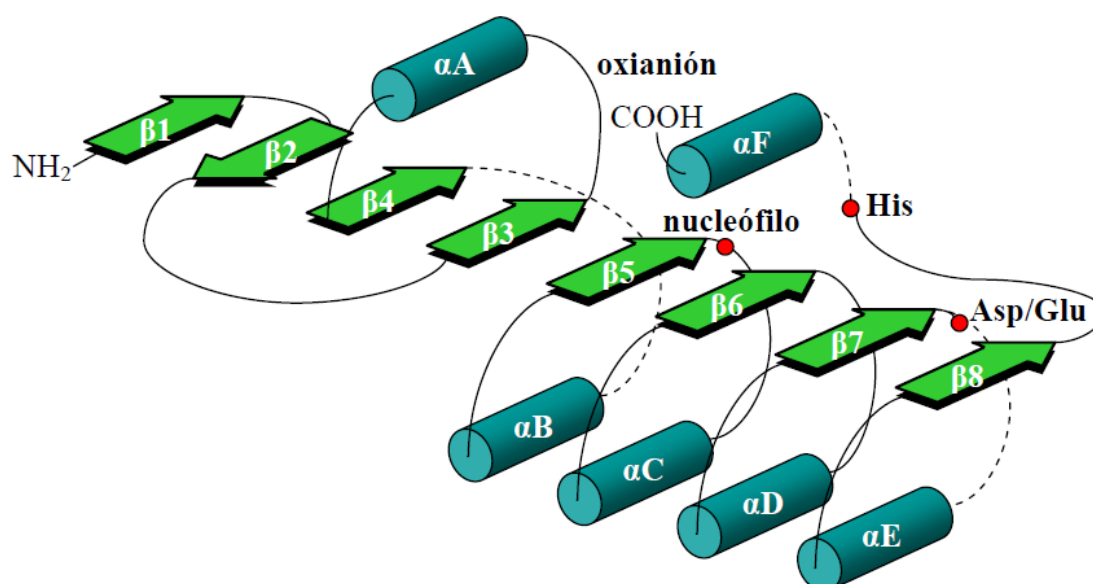


Figura 5 – Plegamiento de las α/β hidrolasas (Ollis et al., 1992). Las hélices α están representadas por cilindros y las láminas β por flechas. El posicionamiento de los residuos que forman el centro activo se representa con círculos. El nucleófilo (Ser) es el residuo situado tras $\beta 5$, el residuo Asp/Glu está tras la lámina 7, y el residuo de histidina se sitúa en el bucle entre $\beta 8$ y αF . Las líneas discontinuas señalan la localización de posibles inserciones. NH_2 y $COOH$: extremos amino-terminal y carboxilo-terminal, respectivamente.

Sin embargo Schrag & Cygler (1997) y Nardini et al. (2000) describieron la existencia de algunas variaciones en esta estructura en lipasas bacterianas, tales como la alteración del número de cadenas β , de la disposición de las mismas y del número de cadenas antiparalelas. La lipasa más pequeña conocida es la lipasa A de *B. subtilis*, que contiene seis láminas β y cinco hélices α (Pouderoyen et al., 2001), y no obedece al plegamiento

INTRODUCCIÓN

canónico de las α/β -hidrolasas. Otro ejemplo, descrito por Lazniewski et al. (2011) es la lipasa transmembranar DUF2319 de *Mycobacterium tuberculosis*, representada en la Figura 6.

En hongos, Uppenberg et al. (1994) refirieron la existencia de solamente siete láminas β en la lipasa B de *Candida antarctica*. También Egmond & Vlieg (2000) describieron en *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* la existencia de una cutinasa de solo cinco láminas β , paralelas entre si, y cuatro hélices α . Widmann et al. (2010) refieren la existencia de diez láminas β en la lipasa A de *C. antarctica*, así como la presencia de seis hélices situadas entre las láminas β_6 y β_7 , formando una estructura “cap”, inexistente en la mayoría de las

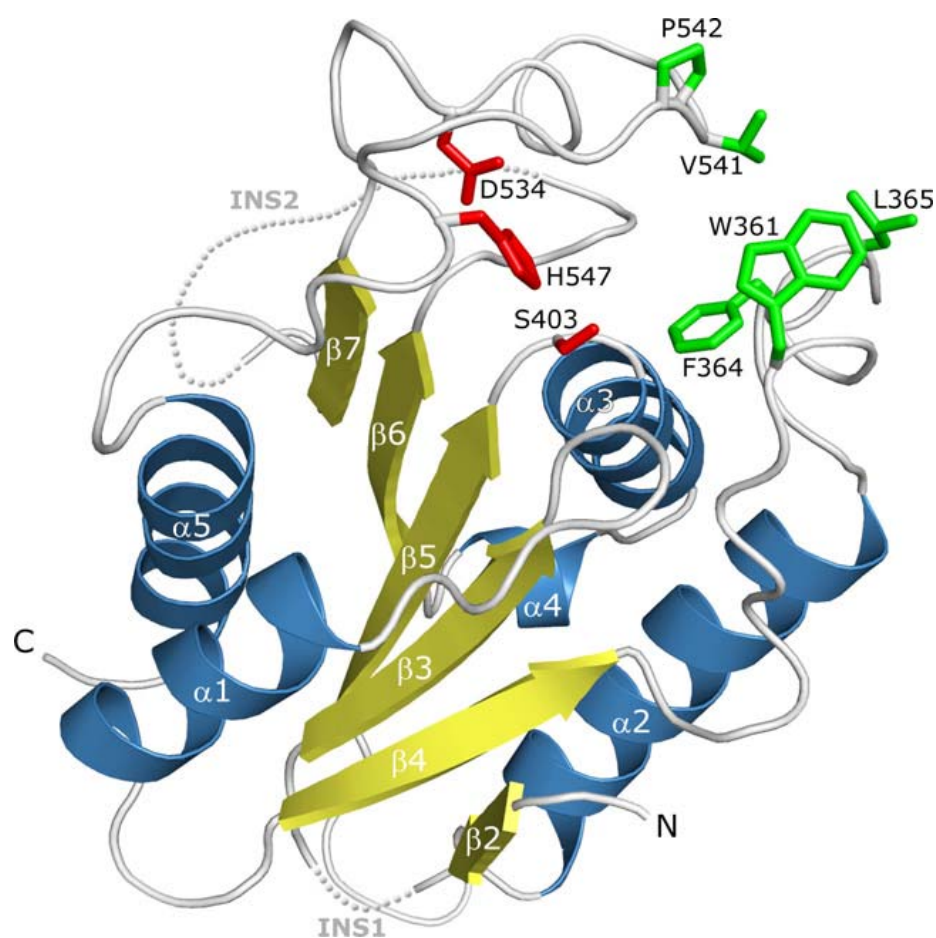


Figura 6 – Representación de la estructura de la lipasa DUF2319 de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (Lazniewski et al., 2011). Solo se observan seis láminas β y cinco hélices α . Los residuos de la tríada catalítica, S403, H547 y D534, se muestran en rojo, mientras los residuos hidrófobos conservados que forman el bolsillo responsable por la unión al sustrato, se resaltan en verde. La lámina β_1 del plegamiento canónico no existe. INS1 corresponde a la inserción entre β_2 y β_3 , mientras que INS2 representa la inserción mayor después β_6 , abarcando los aminoácidos responsables de la formación de la tapadera. Las letras N y C indican los extremos amino-terminal y carboxilo-terminal, respectivamente.

INTRODUCCIÓN

lipasas. Recientemente Gutiérrez-Fernández et al. (2014) han descrito una esteroles esterasa de *Ophiostoma picea*, que tampoco cumple el modelo propuesto por Ollis et al. (1992).

El centro activo de todas estas enzimas está formado por una tríada catalítica, constituida por una serina nucleofílica muy conservada insertada en un pentapéptido **Gli-Xaa-Ser-Xaa-Gli** (siendo **Xaa** cualquier aminoácido), un ácido aspártico o un ácido glutámico (**Asp** o **Glu**) ligado por puentes de hidrógeno al tercer aminoácido, una histidina (**His**). Estos residuos catalíticos se encuentran siempre por este orden en la secuencia de aminoácidos (Ollis et al., 1992; Pleiss et al., 2000), lo que las distingue de otras proteínas con tríada catalítica (Gilham & Lehner, 2005). El pentapéptido **Gli-Xaa-Ser-Xaa-Gli (GX SXG)** forma parte de una giro muy conservado entre la lámina $\beta 5$ y la siguiente hélice α (αC), y se conoce como codo nucleofílico (Pleiss et al., 2000); su función es estabilizar y orientar la serina nucleofílica.

Además, hay otras estructuras que intervienen en la estabilización de los compuestos intermedios producidos durante la catálisis, como el hueco oxianiónico, o que se encargan de acomodar el ácido graso a escindir, con ligaciones en las posiciones *sn*-1, *sn*-2 y *sn*-3 de los carboxilatos (Figura 7) Las diferencias de tamaño y de hidrofilia/hidrofobicidad de estas estructuras determinan la enantiopreferencia de una lipasa (Jaeger et al., 1999; Verma et al., 2008). De acuerdo con Pleiss et al. (2000) en algunas lipasas el hueco oxianiónico se forma a través de ligaciones entre dos amidas del esqueleto estructural de aminoácidos, una perteneciente a un residuo conservado de la región N-terminal de las lipasas (motivo **GX** o **GGGX**; con **G** situado entre la lámina $\beta 3$ y la αA hélice), la otra al residuo vecino de la serina nucleofílica en la posición C – terminal (**GX SXG**).

El tipo de hueco oxianiónico juega un papel importante en la especificidad de las lipasas hacia sus sustratos. De hecho, las lipasas con el tipo **GX** por lo general hidrolizan sustratos de cadena carbonada de media y larga longitud, mientras que el tipo **GGGX** se encuentra en lipasas específicas de sustratos de corta longitud y en carboxilesterasas (Pleiss et al., 2000). Las lipasas fúngicas tienen un hueco oxianiónico de tipo **GX**, donde **X** es o bien una serina o una treonina (**S/T**), y en la mayoría de los casos poseen un tercer aminoácido, ácido aspártico o asparagina (**D** o **N**), que también contribuye a su estabilización a través de un enlace de hidrógeno (Pleiss et al., 2000). En lipasas del tipo **GGGX**, el primer residuo **G** es estabilizado por interacción del dipéptido **GX** con la cadena lateral del segundo residuo oxianiónico, que es una alanina (**A**) conservada, vecina de la serina nucleofílica en posición C-terminal. En este caso el residuo **X** es hidrofóbico (Fischer & Pleiss, 2003; Fischer et al., 2006). De acuerdo con Rehm et al. (2010), la lipasa de *Candida rugosa* (**CRL**) pertenece a la clase **GGGX**, y las lipasas fúngicas de *Rhizomucor miehei* (**RML**) y de *Thermomyces lanuginosa* (**TLL**) pertenecen a la clase **GX**. Así, de acuerdo con Pleiss et al. (2000), lipasas específicas de sustratos de corta longitud y carboxilesterasas pueden ser identificadas

INTRODUCCIÓN

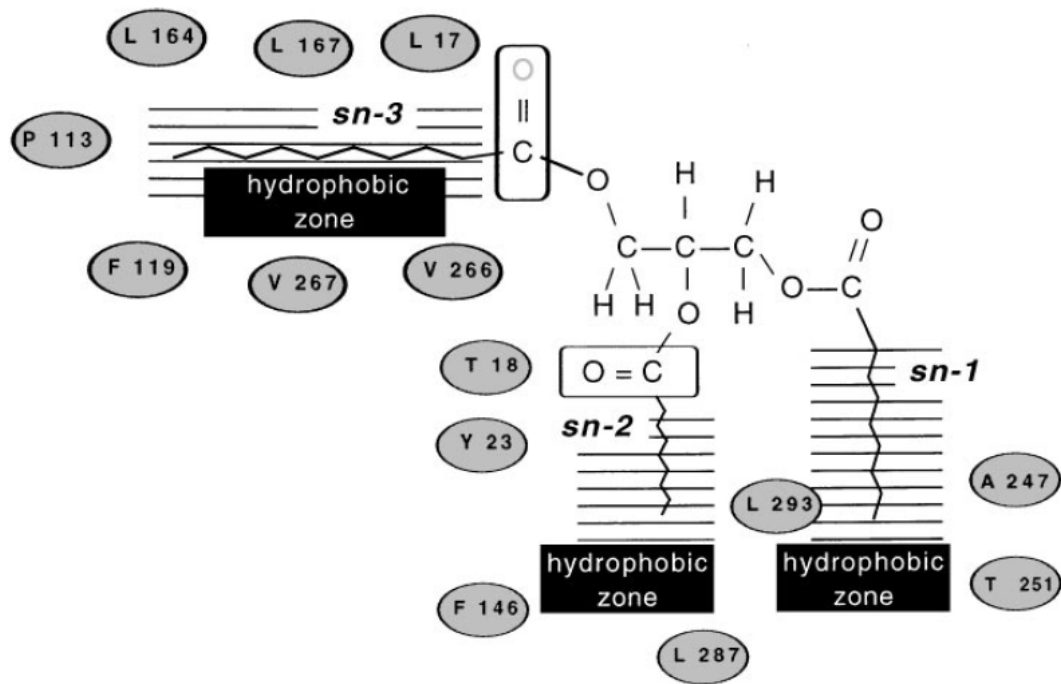


Figura 7 – Centro activo de la lipasa de *Burkholderia cepacia* (Jaeger et al., 1999). Los bolsillos de unión *sn-1*, *sn-2* y *sn-3* para el sustrato lipídico están indicados, así como los residuos que los rodean.

mediante la combinación de las firmas **GGGX** y **GxSAG**. Drabløs & Petersen (1997) propusieron la utilización de la secuencia conservada alrededor del residuo de serina del sitio activo como un indicador para la clasificación de una secuencia de aminoácidos como esterasa, ya que dicha secuencia conservada (**GESAG**) existe en la mayoría de enzimas con esta actividad. Sin embargo, el motivo **GESAG** también se encuentra en algunas lipasas, como en las lipasas de *C. rugosa*, *Geotrichum candidum* y *Yarrowia lipolytica* (Fojan et al., 2000), así como en la toxina exfoliativa B (Vath et al., 1999), una proteasa similar a la quimotripsina. En la base de datos PROSITE (Sigrist et al., 2002, 2012) se clasifican como lipasas (con el número de acceso PROSITE² PS00120) las proteínas con el motivo conservado **[LIV]-{KG}-[LIVFY]-[LIVMST]-G-[HYWV]-S-{YAG}-G-[GSTAC]** (Chapus et al., 1988) en torno al residuo de serina (**S**) del centro activo. A su vez, como carboxilesterasas (con el número de acceso PROSITE PS00122) se identifican las proteínas que contienen el motivo **F-[GR]-G-x(4)-[LIVM]-x-[LIV]-x-G-x-S-[STAG]-G** (Cygler et al., 1993), cerca de la serina nucleofílica, así como el motivo secundario conservado **[EDA]-[DG]-C-L-[YTF]-[LIVT]-[DNS]-[LIV]-[LIVFYW]-x-[PQR]** (con el número de acceso PROSITE PS00941), en que **C** identifica la cisteína involucrada en la formación de un puente disulfuro. En

² <http://prosite.expasy.org/>

INTRODUCCIÓN

cualquiera de estos casos no se señala la existencia de motivos relacionados con el hueco oxianiónico.

Otro motivo conservado en la estructura del hueco oxianiónico ocurre en lipasas del tipo **Y** (Fischer et al., 2006), asociadas al clan de las lipasas de *C. antarctica*. Bassegoda et al. (2012) lo identifican por primera vez en LipR de *Rhodococcus* sp. CR-53, ya que no había sido descrito antes en bacterias. De acuerdo con Fischer et al. (2006), en las lipasas de la clase **Y** el hueco oxianiónico no está formado por amidas estructurales, sino por el grupo hidroxilo de la cadena lateral de una tirosina muy conservada. En la lipasa A de *C. antarctica* está formado por un par de aminoácidos, una tirosina y un ácido aspártico (**YD**), situado en un bucle cerca de la serina catalítica (Ericsson et al., 2008; Sandström et al., 2009; Widmann et al., 2010). En el caso de LipR, ambos residuos se incluyen en un motivo altamente conservado (**YDSL**), sugiriendo su importancia para la unión al sustrato (Bassegoda et al., 2012).

Aunque el motivo **GXSXG** sea común a la mayoría de las enzimas EC 3.1.1, no existe en las enzimas de la superfamilia **GDSL**³. Estas presentan cuatro residuos catalíticos: una serina, una glicina, una asparagina y una histidina, **SGNH**, distribuidos por esa orden en cuatro bloques de motivos conservados en la secuencia aminoacídica (con la serina nucleofílica insertada en el motivo **GDSL**, que se encuentra más cerca del extremo N-terminal, a diferencia de las lipasas donde el motivo **GXSXG** se localiza más en el centro de la secuencia). Como incluso no presentan codo nucleofílico, el hueco oxianiónico toma una estructura particular: la serina nucleofílica (**S**) sirve como donador de protones en el hueco oxianiónico, junto con una glicina (**G**) y una asparagina (**N**) altamente conservadas. Se propuso que estos tres residuos constituirían un hueco oxianiónico alternativo que compensaría la falta de enlace de hidrógeno del intermedio con la histidina catalítica (**H**) (Akoh et al., 2004). La estructura del hueco oxianiónico originó la designación de hidrolasas **SGNH** para esta superfamilia (Akoh et al., 2004), que incluye algunas de las esterasas bacterianas (Lenfant et al., 2013).

También las lipasas de *B. subtilis* y la B de *C. antarctica* constituyen excepciones al motivo **GXSXG**, una vez que la glicina en la primera posición se encuentra sustituida por una alanina en todas las lipasas y esterasas de *Bacillus* sp. (van Pouderoyen et al., 2001, Eggert et al., 2002), y por una treonina en la de *C. antarctica* (Uppenbergh et al., 1994). De acuerdo con Anobom et al. (2014), el pentapéptido tiene el consenso **Sm-X-Nu-X-Sm**, donde **Sm** es un residuo pequeño, por lo general una glicina, pero que en ocasiones puede estar sustituido por alanina, valina, serina o treonina; **X** representa cualquier residuo, y **Nu** el nucleófilo.

³ Descrita en <http://scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/scop/data/scop.b.d.ch.i.html>

INTRODUCCIÓN

En ausencia de sustrato, el sitio activo de muchas lipasas se encuentra cubierto por los elementos de la estructura secundaria que forman la tapadera (“lid o “flap”), que mantiene al enzima en conformación cerrada (Figura 8B). Estos elementos tienen que cambiar su disposición para permitir el acceso del sustrato al sitio activo en la conformación abierta (Figura 8A), jugando así un papel importante en la regulación de accesibilidad de los sustratos al túnel catalítico (Gilham & Lehner, 2005). Este desplazamiento puede ser considerable (Petersen et al., 2001). En la Figura 9 se encuentran representadas las superposiciones estructurales de dos enzimas, las lipasas fúngicas de *R. miehei* (A) y la de *C. rugosa* (B), poniendo en evidencia el desplazamiento de sus respectivas tapaderas entre las dos conformaciones de las enzimas.

De acuerdo con Pleiss et al. (2000), el hueco oxianiónico puede preexistir tanto en la conformación cerrada de la enzima como sólo formarse tras la apertura de la tapadera, en contacto con la interfase lípido-agua. En la lipasa de *Bacillus subtilis* el hueco oxianiónico se encuentra preformado, pero esta lipasa no tiene tapadera, por lo que la serina nucleofílica se encuentra expuesta al solvente (van Pouderoyen et al., 2001).

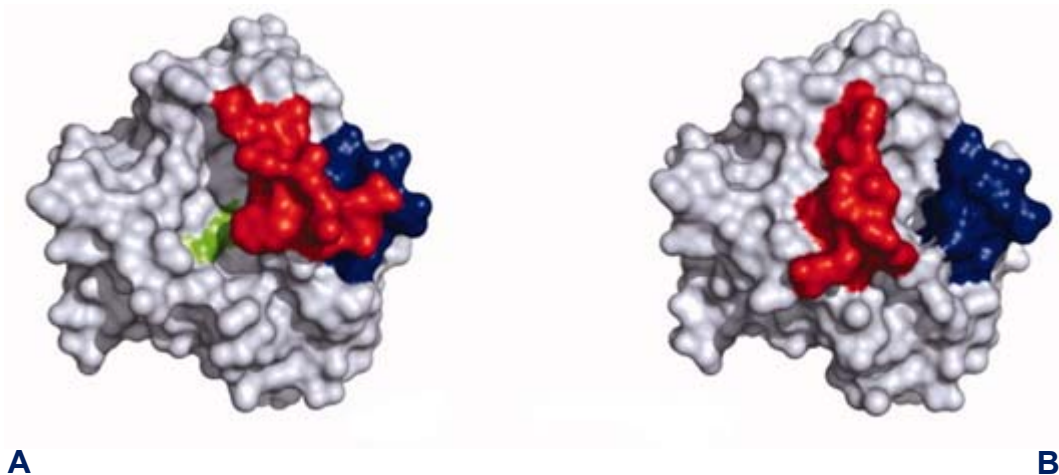


Figura 8 – Conformación abierta (A) y cerrada (B) de la lipasa de *Rhizomucor miehei*⁴ (Rehm et al., 2010). En verde se representan los aminoácidos del centro activo, en rojo los que forman la tapadera, en azul los del bucle flexible de RML.

En la mayoría de las lipasas la actividad hidrolítica aumenta notablemente en contacto con una interfase lípido-agua, fenómeno conocido como activación interfacial (Verger, 1997; Nardini & Dijkstra, 1999). El mecanismo de activación interfacial explica el comportamiento de la mayoría de las lipasas relativo a la ley de Michaelis–Menten: de hecho la actividad de las lipasas aumenta drásticamente cuando la concentración de sustrato es lo suficientemente alta para formar micelas y emulsiones (Fickers et al, 2008; Reis et al.,

⁴ Corresponde a la proteína P19515 de UniProt (<http://www.uniprot.org/uniprot/P19515>).

INTRODUCCIÓN

2009), y por lo tanto se originan curvas sigmoideas cuando la velocidad inicial de reacción se representa frente a la concentración de sustrato (Figura 10). Se considera esta propiedad vinculada a la existencia de una tapadera de naturaleza anfipática, cuyo desplazamiento permite el acceso del sustrato al centro catalítico de la enzima (Holmquist, 2000; Lotti & Alberghina, 2007; Carrasco-López et al., 2009), donde interactúa con los residuos hidrofóbicos que rodean el centro activo, usualmente valina, leucina e isoleucina (**V, L e I**). Estos residuos facilitan la ligación a las moléculas agregadas del sustrato, lo que origina reordenamientos estructurales que llevan a la apertura de la tapadera (Fojan et al., 2000; Fernández-Lorente et al., 2007). Todavía se conocen lipasas funcionales en las que no existe tapadera (Martínez et al., 1992; Hjort et al., 1993; Lesuisse et al., 1993; Chahinian et al., 2010; Andualema & Gessesse, 2012), como es el caso de la acetil xylan esterasa de *Penicillium purpurogenum* (Ghosh, et al., 1999), de la lipasa de *Streptomyces exfoliatus* (Pleiss et al., 2000), de la lipasa A de *B. subtilis* (van Pouderoyen et al., 2001), y de la cutinasa de *Fusarium solani* f. sp. *psii* (Lotti & Alberghina, 2007). Hay otras, tales como las lipasas de *Pseudomonas aeruginosa*, *C. antarctica B*, *Burkholderia glumae* y lip4 de *C. rugosa*, en las que la tapadera no responde a la activación interfacial (Verger, 1997; Tang et al., 2001; Reetz, 2002). Esta estructura puede estar formada por dos pequeñas α -hélices (Kim et al., 1997; Schrag et al., 1997), una hélice simple (Brzozowski et al., 1991; Derewenda et al., 1992; Faber, 2011), o por una región de bucles (Grochulski et al., 1994), que es principalmente hidrofóbica en el lado dirigido hacia el sitio activo, e hidrófila en su cara externa (Ruiz-Rueda, 2005). Gutiérrez-Fernández et al. (2014) describen en la esterol

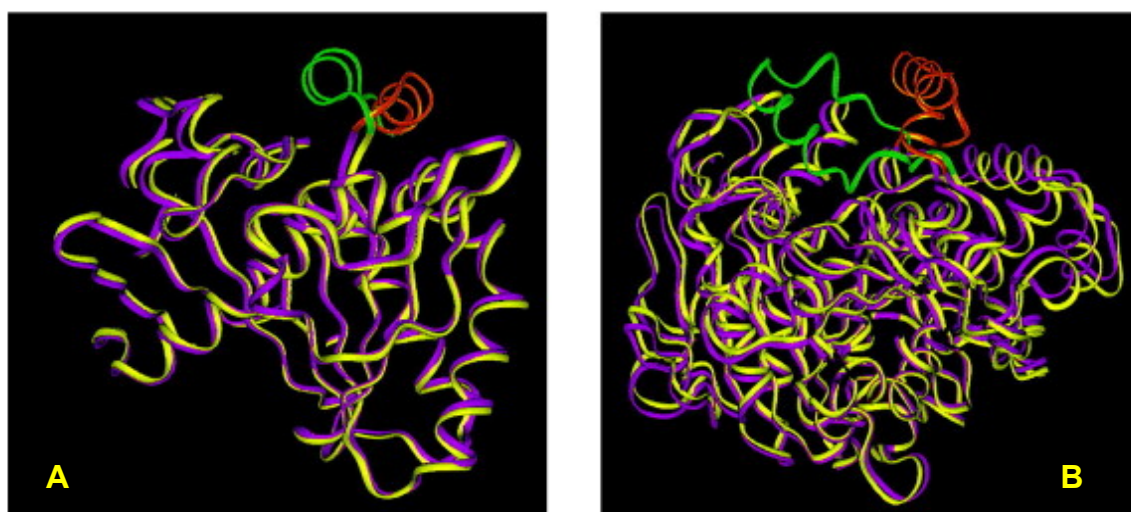


Figura 9- Superposición de las estructuras de la conformación cerrada y abierta de las lipasas de *R. miehei* (A) y de *C. rugosa* (B) (Petersen et al., 2001). Los residuos que pertenecen a la tapadera son de color verde en la conformación cerrada, y naranja en la abierta. Todos los demás residuos se representan de color amarillo (cerrada) y morado (abierta).

INTRODUCCIÓN

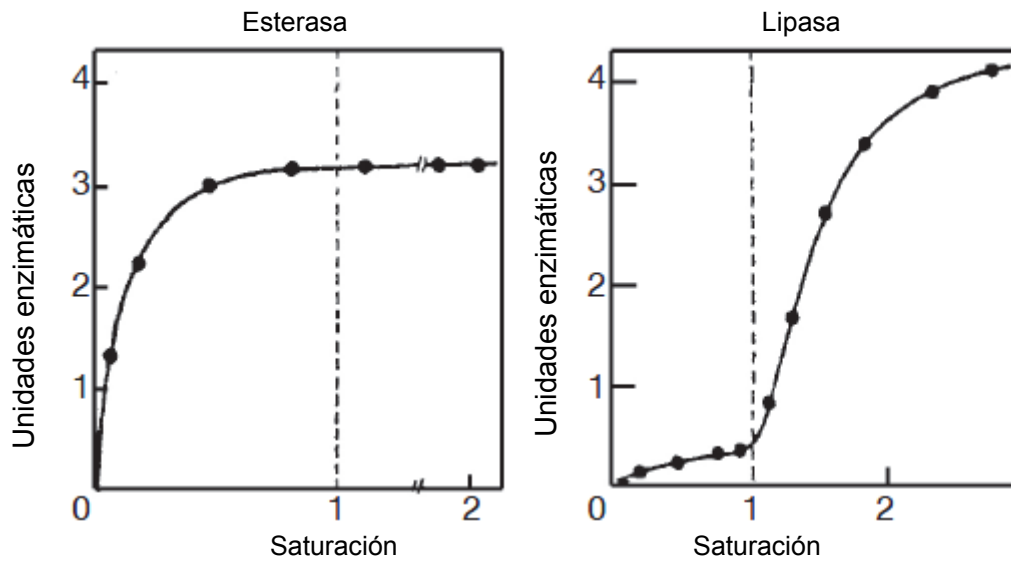


Figura 10- Hidrólisis de triacetina por esterasa de hígado de caballo y por lipasa pancreática de cerdo. Relación entre la velocidad de hidrólisis y la concentración del sustrato expresada en múltiplo de saturación (Verger & Haas, 1973).

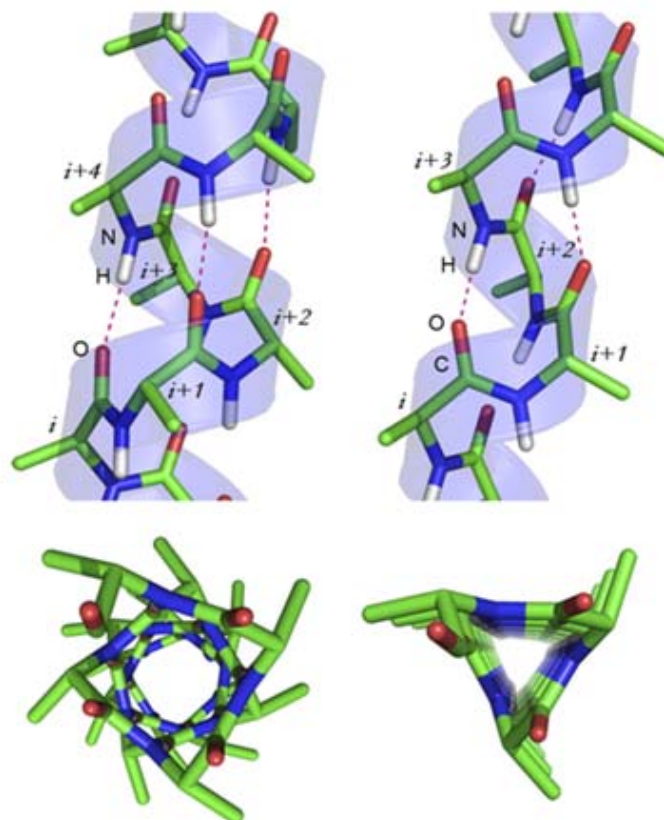


Figura 11 – Vistas laterales y frontales de una hélice en la conformación helicoidal canónica α (izquierda) y en conformación canónica 3_{10} (derecha) (Vieira-Pires & Morais-Cabral, 2010). Las líneas de puntos indican los enlaces de hidrógeno entre los átomos en la cadena principal del polipéptido

INTRODUCCIÓN

esterasa de *O. picea* la existencia de una tapadera constituida por una α -hélice y dos hélices 3_{10} (similares a las de la Figura 11), flanqueadas por dos bucles que terminan en un puente disulfuro. Sin embargo, Carrasco-López et al. (2009) describen la existencia de una tapadera doble en *Bacillus thermocatenuatus*, con varios aminoácidos involucrados, mientras Uppenberg et al. (1994) describieron en la lipasa B de *C. antarctica* la existencia de una tapadera muy corta, que no impide completamente el acceso al sustrato y del solvente al centro activo en la forma cerrada. A su vez, Widmann et al. (2010) identifican dos láminas β ejerciendo presumiblemente las funciones de tapadera en la lipasa A de *C. antarctica*, una vez que su movimiento permite el acceso del sustrato al centro activo de la enzima.

Por lo expuesto anteriormente resulta difícil definir los límites entre las características de una carboxilesterasa (EC 3.1.1.1) y las de una lipasa (EC 3.1.1.3), ya que muchas de ellas presentan elementos comunes, habiendo todavía muchas excepciones por ambas partes. En la Tabla 1 se resume algunas de estas características. Sin embargo parece que las lipasas actúan sobre sustratos insolubles en agua, con elevado K_m aparente, y triacilglicerol (TAGs) de cadena larga, mientras que las carboxilesterasas actúan sobre sustratos solubles, de bajo K_m aparente, y sobre TAGs de cadena corta.

En un intento de organizar toda esta diversidad, Pleiss et al. (2000) crearon “LED - The Lipase Engineering Database” (<http://www.led.uni-stuttgart.de/>), cuya versión actual 3.0 se propuso en diciembre de 2009. En ella se incluyeron distintas enzimas pertenecientes al plegamiento de las α/β -hidrolasas (lipasas en sentido amplio), con el motivo conservado **GXSXG**, compartiendo la misma maquinaria catalítica que consistía en la tríada serina-ácido aspártico o glutámico-histidina, y en la existencia de una cavidad oxianiónica, formada por las amidas estructurales de dos residuos conservados. En LED se encuentran descritas tres clases, de acuerdo con la secuencia de aminoácidos implicados en la formación del hueco oxianiónico: **GGGX**, **GX** o **Y** (Fischer & Pleiss, 2003; Widmann et al., 2010). En la Tabla 2 se recoge esta clasificación, y se describe el número de superfamilias, familias homólogas, de proteínas, y secuencias y estructuras conocidas que integran cada clase. En la clase **GGGX** se incluyen, entre otras, las superfamilias abH01 (carboxilesterasas de eucariotas), abH02 (semejantes a las lipasas de *Y. lipolytica*) y abH03 (semejantes a la lipasa de *C. rugosa*). En la clase **GX** se incluyen, entre otras, las superfamilias abH15 (lipasas de *Burkholderia* sp.), abH18 (lipasa de *Bacillus* sp.), abH23 (lipasas de hongos filamentosos), abH24 (semejantes a la lipasa de *Pseudomonas*), abH36 (cutinasas) y abH37 (semejantes a la lipasa B de *C. antarctica*). En la clase **Y** se incluyen, entre otras, las lipasas semejantes a la lipasa A de *C. antarctica* (abH38). En total están descritas 38 superfamilias con 18 585 proteínas y 1 117 estructuras proteicas, agrupadas por su semejanza funcional y estructural.

INTRODUCCIÓN

Tabla 1 - Diferencias entre lipasas y carboxilesterasas

Característica	Carboxilesterasas	Lipasas
Preferencia de sustrato	TAG de cadena corta	TAG de cadena larga
Preferencia por el estado físico del sustrato	Más soluble	Insoluble y agregado
Hidrofobicidad del sustrato	Elevada a baja	Elevada
Sitio de unión de AG escindible	Corto	Largo
Activación interfacial y tapadera	No	Sí (con excepciones)
Aminoácidos expuestos a solventes y AA del sitio activo	Menos AA no polares	Más AA no polares
pH óptimo	5,5-7	Generalmente 8-9 (5-6 para algunas)
Gama de sustratos	Amplia a baja	Amplia
Regio- y estereoselectividad ⁵	Muy variable	En general grande
Actividad y estabilidad en solventes orgánicos	Grande a baja	Grande
Máxima actividad	Para concentraciones del sustrato inferiores a la concentración micelar crítica (bajo Km aparente)	Para concentraciones del sustrato superiores al límite de solubilidad crítica/emulsiones (elevado Km aparente)

AG: ácido graso; TAG: triacilgliceroles; AA: aminoácidos

Adaptado de Petersen et al. (2001), Chahinian et al. (2010) y de Dheeman (2011)

Tabla 2 – Clasificación de las enzimas lipolíticas usada en LED

	Clase GGGX	Clase GX	Clase Y
Superfamilias	6	27	5
Familias	22	82	8
Proteínas	5278	11402	1905
Secuencias	7325	14905	2553
Estructuras	282	610	225

Pleiss et al., 2000; Fischer & Pleiss, 2003; Widmann et al., 2010

⁵ Ver punto 1.2.4.

1.2.2 Sustratos lipídicos

Los lípidos son compuestos de origen biológico, como aceites, grasas y ceras, que son solubles en disolventes orgánicos tales como cloroformo, benceno, acetona, alcohol o éter, pero escasamente solubles en agua. Esta definición abarca una amplia gama de sustancias con características químicas heterogéneas, con grupos funcionales pertenecientes a hidrocarburos, alcoholes, aldehídos, ácidos, aminas y glúcidos. La mayoría forma moléculas tales como triglicéridos, fosfolípidos, glicolípidos y ceras, aunque otras sustancias tales como las vitaminas liposolubles (A, D, E y K), coenzimas (ubiquinonas), pigmentos (carotenoides), terpenos y esteroides también son consideradas como lípidos, ya que se extraen con disolventes orgánicos (<http://www.cyberlipid.org/>). En su estructura molecular los lípidos tienen una cadena de al menos 10 átomos de carbono. Están formados principalmente por carbono y hidrógeno, elementos que confieren un comportamiento no polar o hidrofóbico, pero también pueden contener oxígeno, fósforo, nitrógeno y azufre, que forman parte de grupos polares o con carga eléctrica (-OH, -COOH, -PO₄³⁻,...). Por contener en su molécula regiones hidrófobas e hidrófilas se dice que tienen un carácter anfipático o anfifílico, lo que lleva a una reorganización espacial de la molécula en presencia de agua, originando la formación de micelas, de bicapas lipídicas o de liposomas (Figura 12). Los grupos químicos funcionales más comunes presentes en lípidos son enlaces carbono-carbono simples o dobles, ésteres de carboxilato, ésteres de fosfato y amidas (Boyer, 2000).

Debido a su gran heterogeneidad química, llevan a cabo una amplia gama de funciones en los seres vivos, estando involucrados en la formación biológica de membranas, almacenamiento de energía, aislamiento térmico o hídrico, producción de calor y señalización intracelular o intercelular. Por otra parte actúan como hormonas, pigmentos, vitaminas, cofactores enzimáticos, transportadores de electrones y detergentes (Boyer, 2000).

Su heterogeneidad química lleva a la existencia de clasificaciones distintas, pero se pueden clasificar los lípidos en simples, complejos y isoprenoides⁶.

Los **lípidos simples** son ésteres de ácidos grasos con un alcohol, comprenden glicéridos y ceras. Las ceras son ésteres de mono-alcoholes de alto peso molecular, como las ceras de abeja o de carnauba. Los glicéridos son ésteres de glicerol y ácidos grasos, denominados acilglicéridos (mono, di o triacilglicéridos, de acuerdo con el número de ligaciones éster en la molécula de glicerol) o grasas neutras. Pueden ser glicéridos simples u homoglicéridos cuando las reacciones de esterificación ocurren siempre con el mismo ácido graso, o glicéridos mixtos o heteroglicéridos, cuando en las reacciones de esterificación intervienen

⁶ http://www.biorom.uma.es/contenido/UIB/Jmoldesarrollo/lipidosjmol/index_jmol.html

INTRODUCCIÓN

dos o tres ácidos grasos distintos. Se refieren comúnmente como aceites o grasas, conforme estén en estado líquido o sólido a temperatura ambiente. En la Tabla 3 se encuentra representada la composición en ácidos grasos de algunos de los principales aceites y grasas de origen animal y vegetal, usados en consumo humano.

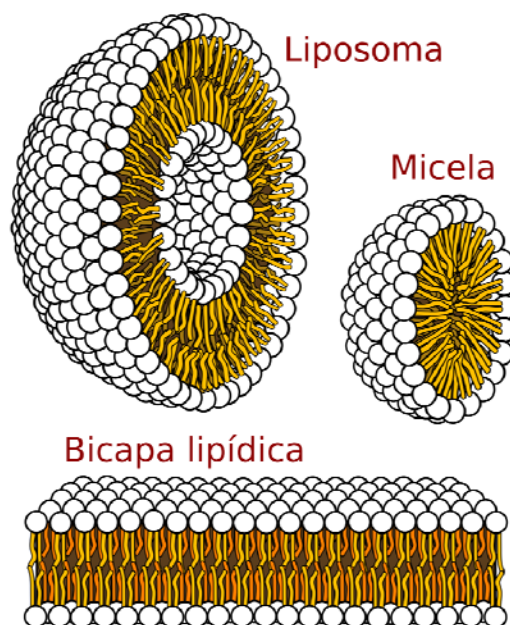


Figura 12 - Corte transversal de las diferentes estructuras que los fosfolípidos pueden tomar en una solución acuosa (<https://es.wikipedia.org/>). Los círculos representan las cabezas hidrofílicas y las líneas onduladas representan las cadenas laterales de ácidos grasos.

Tabla 3 – Composición porcentual en ácidos gordos de algunos aceites y grasas

Aceite o Grasa	Saturados		Insaturados		
	Palmítico C16:0	Estéarico C18:0	Oleico C 18:1	Linoleico C 18:2	Otros
	<u>De origen animal</u>				
Mantequilla	29	9	27	4	31
Manteca de cerdo	30	18	41	6	5
Carne de vaca	32	25	38	3	2
	<u>De origen vegetal</u>				
Aceite de maíz	10	4	34	48	4
Aceite de soja	7	3	25	56	9
Aceite de maní	7	5	60	21	7
Aceite de oliva	6	4	83	7	-

Adaptado de http://chemwiki.ucdavis.edu/Biological_Chemistry/Lipids/Glycerides/Triglycerides

INTRODUCCIÓN

Los ácidos grasos son ácidos monocarboxílicos, de fórmula general **R-COOH**, donde R es una cadena carbonada de estructura muy variada (linealizada, ramificada o alicíclica) y que puede presentar dobles enlaces. Según el número de dobles enlaces los ácidos grasos se clasifican en ácidos grasos saturados (**AGS**, solo con enlaces simples entre átomos de carbono, de acuerdo con la fórmula $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$), monoinsaturados (**AGMI**, con un doble enlace) y poliinsaturados (**AGPI**, con dos o más dobles enlaces).

De acuerdo con la longitud de la cadena, los AG son llamados de cadena corta (<C₆), de cadena media (C₇ a C₁₂), de cadena larga (C₁₃ a C₂₂) y de cadena muy larga (>C₂₂)⁷. Tienen por lo general un número par de átomos de carbono debido a que son sintetizados a partir de unidades de ácido acético (C₂) (Mathews et al., 2000).

El punto de fusión de los ácidos grasos aumenta con el número de carbonos de la cadena del AG, como se verifica en las Tablas 4, 5 y 6, donde se encuentran listados los AG más comunes. Por lo general, los AGI tienen puntos de fusión más bajos que los AGS con el mismo número de átomos de carbono. La razón de este fenómeno se puede encontrar por análisis de geometrías moleculares (Figura 13). Los ángulos del enlace tetraédrico en el átomo de carbono originan para los AGS una geometría molecular relativamente lineal, aunque con "zigzags". Esta estructura molecular permite que muchas moléculas de AG se puedan "apilar", originando interacciones intermoleculares cerradas, y puntos de fusión relativamente altos. Por otro lado, la introducción de uno o más enlaces dobles en la cadena de hidrocarburos en los AGI resulta en una o más "curvas" en la molécula. La geometría del

Tabla 4 – Clasificación de ácidos grasos saturados

Nombre común	Fórmula estructural	Nombre sistemático	Punto de fusión (°C)
Butírico	C4:0	Butanoico	-5,3
Valérico	C5:0	Pentanoico	
Caproico	C6:0	Hexanoico	-3,2
Caprílico	C8:0	Octanoico	16,5
Cáprico	C10:0	Decanoico	31,6
Láurico	C12:0	Dodecanoico	44,8
Mirístico	C14:0	Tetradecanoico	54,4
Palmítico	C16:0	Hexadecanoico	62,9
Estéarico	C18:0	Octadecanoico	70,1
Araquídico	C20:0	Eicosanoico	76,1
Behénico	C22:0	Docosanoico	80,0
Lignocérico	C24:0	Tetracosanoico	84,2

Adaptado de <http://www.intechopen.com/books/lipid-metabolism/overview-about-lipid-structure>

⁷ <http://www.ebi.ac.uk/chebi>

INTRODUCCIÓN

Tabla 5 – Clasificación de ácidos grasos monoinsaturados

Nombre común	Fórmula estructural	Nombre sistemático	Punto de fusión (°C)
Palmitoleico	C16:1 ⁹ ; ω7	<i>cis</i> -9-hexadecanoico	0,0
Oleico	C18:1 ⁹ ; ω9	<i>cis</i> -9-octadecanoico	16,3
Elaídico	C18:1 ⁹ ; ω9	<i>trans</i> -9-octadecanoico	
Vacénico	C18:1 ¹¹ ; ω7	<i>trans</i> -11-octadecanoico	39,5
Erúcido	C22:1 ¹³ ; ω9	<i>cis</i> -13-docosenoico	
Nervónico	C24:1 ¹⁵ ; ω9	<i>cis</i> -15-tetracosenoico	

Adaptado de <http://www.intechopen.com/books/lipid-metabolism/overview-about-lipid-structure>

doble enlace lleva a que estas moléculas no se "apilen" muy bien (Figura 13). Las interacciones intermoleculares son mucho más débiles que las de las moléculas saturadas. Como resultado, los puntos de fusión son mucho más bajos para los AGIs⁸.

La existencia de dobles enlaces origina dos conformaciones, *cis* y *trans* (de acuerdo con el hecho de los radicales R1 y R2 de la cadena alifática se sitúan en el mismo lado del doble enlace o en lados contrarios, respectivamente) y aumenta la reactividad de las moléculas, que pueden ser alteradas por hidrogenación, oxidación o halogenación (Boyer, 2000).

En los sistemas de clasificación de AG se suele especificar:

- El número de átomos de carbono de la cadena hidrocarbonada del AG.
- El número de insaturaciones.
- La configuración estereo-isomérica de las insaturaciones (la distinción entre las formas *cis* y *trans* es importante, una vez que tienen distintas implicaciones para la salud humana).
- La posición del primer doble enlace relativamente al grupo carboxilo (α -carbono, sistema n), o relativamente al último grupo metilo de la cadena hidrocarbonada (ω -carbono, sistema ω).

De acuerdo con Davidson & Cantrill (1985), el sistema ω , por numerar los átomos a partir del extremo metilo, permite una más eficiente comparación entre propiedades de AG con distinto número de átomos de carbono, pero con características semejantes, o incluso entre AG con el mismo número de átomos de carbono (Figura 14).

El organismo humano es capaz de producir todos los AG que necesita con la excepción del ácido linoleico (un AG omega 6 o n-6) y del ácido α -linolénico (un AG omega 3 o n-3). Estos deben ser consumidos en la dieta y por lo tanto se denominan "ácidos grasos esenciales" (**AGE**). Ambos AG son esenciales para el crecimiento y la reparación del organismo, y

⁸ http://chemwiki.ucdavis.edu/Biological_Chemistry/Lipids/Fatty_Acids

INTRODUCCIÓN

Tabla 6 – Clasificación de ácidos grasos poliinsaturados

Nombre común	Fórmula estructural	Nombre sistemático	Punto de fusión (°C)
Linoleico	C18:2 ^{9,12} ; ω6	<i>cis</i> -9,12-octadecadienoico	-5,0
α-Linolénico	C18:3 ^{9,12,15} ; ω3	<i>cis,cis,cis</i> -9,12,15-octadecatrienoico	-11
γ-Linolénico	C18:3 ^{6,9,12} ; ω6	<i>cis,cis,cis</i> -6,9,12-octadecatrienoico	
Araquidónico	C20:4 ^{5,8,11,14} ; ω6	<i>cis,cis,cis,cis</i> -5,8,11,14-eicosatetraenoico	-50
Timnódico	C20:5 ^{5,8,11,14,17} ; ω3	<i>cis,cis,cis,cis,cis</i> -5,8,11,14,17-eicosapentenoico	
Clupanodónico	C22:5 ^{7,10,13,16,19} ; ω3	<i>cis,cis,cis,cis,cis</i> -7,10,13,16,19-docosapentenoico	
Cervónico	C22:6 ^{4,7,10,13,16,19} ; ω3	<i>cis,cis,cis,cis,cis,cis</i> -4,7,10,13,16,19-docosahexenoico	

Adaptado de <https://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/VirtTxtJml/lipids.htm>

también son utilizados para la producción de otros ácidos grasos (como por ejemplo el ácido araquidónico, obtenido a partir del linoleico)⁹. Sin embargo, puesto que la conversión de los AG omega 3 es limitada, se recomienda que los ácidos grasos poliinsaturados eicosapentenoico (EPA) y docosahexenoico (DHA), descritos en la Tabla 6 también se incluyan en la dieta.

Contrariamente a los lípidos simples, los **lípidos complejos** contienen en su molécula sustancias distintas de los AG y del alcohol estructural, tales como fosfato, bases nitrogenadas, azúcares, etc. Los más importantes son los glicerofosfolípidos, los esfingolípidos y los glicolípidos.

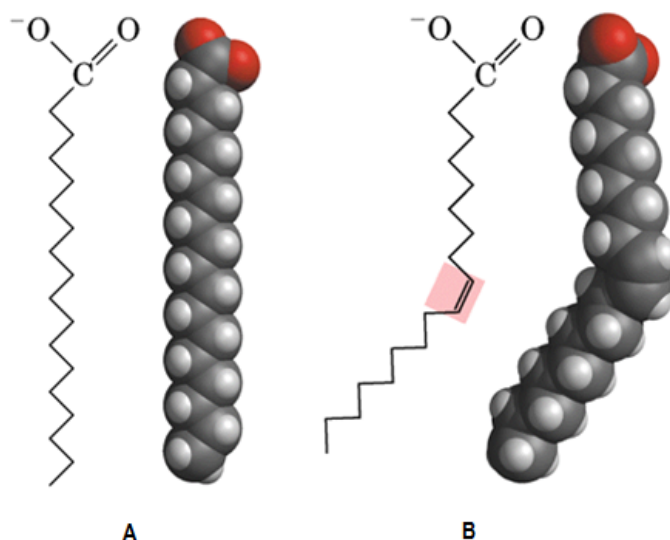


Figura 13 – Conformación extendida habitual del ácido esteárico, un AG en C18 (A) y del ácido oleico, un AGMI de C18, con 1 doble enlace en la forma *cis* (B) (Nelson & Cox, 2000). El doble enlace introduce una curva rígida en la cola de hidrocarburos

⁹⁹ <http://www.eufic.org/article/pt/nutricao/gorduras/artid/importancia-dos-acido-gordos-omega-3-e-omega-6/>

INTRODUCCIÓN

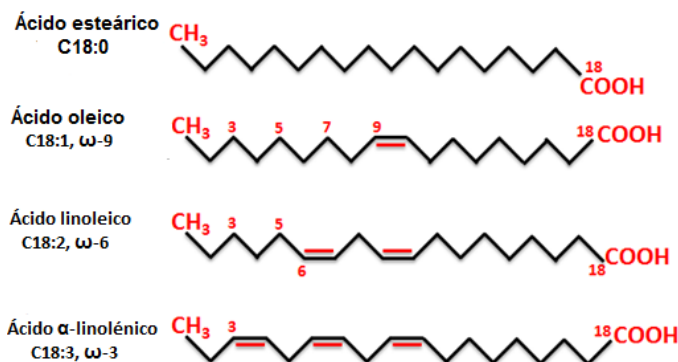


Figura 14- Ácidos grasos en C18 con distintos grados de insaturación. Se usa la numeración ómega, a partir del término de la cadena alifática.

Los glicerofosfolípidos (comúnmente conocidos como fosfolípidos) también son ésteres del glicerol, pero en los que sólo dos radicales de alcohol están esterificados por ácidos grasos; el tercer (siempre un alcohol primario) se encuentra esterificado al ácido fosfórico. Además, siempre tienen una base nitrogenada o un alcohol esterificado a un oxidrilo del ácido fosfórico. Los fosfolípidos son componentes de la bicapa lipídica de las membranas celulares. Las cadenas alifáticas de los ácidos grasos son hidrófobas, mientras que el ácido fosfórico es el polo hidrófilo (Figura 12).

A su vez, los glucolípidos son lípidos que presentan carbohidratos en su estructura, y están formados por unión de carbohidratos al C1 de la ceramida. Comprenden los cerebrósidos (en los que el glúcido unido a ceramida es un monosacárido, glucosa o galactosa), gangliósidos (en que la ceramida se encuentra unida a un oligosacárido complejo) y sulfátidos (ésteres sulfúricos de los cerebrósidos, en los que el sulfato esterifica el C3 de la hexosa)¹⁰.

A su vez, los glucolípidos son lípidos que presentan carbohidratos en su estructura, y están formados por unión de carbohidratos al C1 de la ceramida. Comprenden los cerebrósidos (en los que el glúcido unido a ceramida es un monosacárido, glucosa o galactosa), gangliósidos (en que la ceramida se encuentra unida a un oligosacárido complejo) y sulfátidos (ésteres sulfúricos de los cerebrósidos, en los que el sulfato esterifica el C3 de la hexosa)¹⁰.

Los **lípidos isoprenóides** se caracterizan por ser derivados del isopreno (C5). Por condensación de varias unidades de isopreno activo (fosforilado) se sintetizan los diferentes lípidos isoprenoides. Cada dos unidades de isopreno originan un terpeno, de manera que hay mono, sesqui, diterpenos, etc. según contengan, respectivamente, dos, tres, cuatro, etc. isoprenos. Entre ellos, además, los hay acíclicos, ramificados y cíclicos, que pueden

¹⁰ http://www.biorom.uma.es/contenido/UIB/Jmoldesarrollo/lipidosjmol/index_jmol.html

INTRODUCCIÓN

contener otros grupos funcionales (cetona, alcohol). Son lípidos isoprenóides las vitaminas liposolubles A, E y K, los compuestos carotenoides (β -caroteno, licopeno y xantofilas) y los esteróides (ergosterol, colesterol, estradiol, progesterona, testosterona y el cortisol).

1.2.3 Proceso catalítico

De acuerdo con Hernaíz (2012), el mecanismo catalítico de las lipasas, representado en la Figura 15, implica a los aminoácidos que conforman la triada catalítica, con las siguientes etapas:

1. El sustrato (R_1COOR_2) accede al centro activo de la enzima (complejo enzima-sustrato), situándose de forma que el carbono carbonílico es atacado por la serina catalítica, a través de su grupo hidroxilo activado. Esta activación se produce por la colocación especial de los tres aminoácidos catalíticos, que provoca una disminución del valor de pK del grupo hidroxilo de la serina: el protón del grupo $-OH$ de la serina es captado por el nitrógeno $N\epsilon$ del anillo imidazólico de la histidina del centro activo, cuya carga positiva es estabilizada por el aspartato (o glutamato) que forma parte de la triada. Se forma así, el primer intermedio tetraédrico (I). La carga negativa, en principio situada en el oxígeno O_y de la serina, sufre una translocación hacia el oxígeno del grupo carbonilo, originándose un oxianión, el cual es estabilizado a través de la formación de uno o varios puentes de hidrógeno con los aminoácidos que constituyen el "hueco oxianiónico".
2. El intermedio tetraédrico se rompe al transferirse al oxígeno del alcohol saliente, el protón previamente cedido a la histidina, liberándose el alcohol y formándose el complejo acil-enzima.
3. Se produce un segundo ataque nucleofílico por parte del segundo sustrato R_3OH (H_2O en sistemas biológicos), previa activación similar a la descrita en el apartado 1, sobre el carbono carbonílico del complejo acil-enzima, formándose un nuevo intermedio tetraédrico (II).
4. El intermedio tetraédrico II colapsa tras la cesión al oxígeno de la serina del H captado por la histidina a partir del nucleófilo atacante, liberándose el producto (un AG como producto natural) y regenerándose la serina catalítica.

Si el nucleófilo R_3OH es agua, la lipasa llevará a cabo la hidrólisis del éster sustrato, pero en un entorno con baja actividad de agua otros nucleófilos pueden competir con el agua en el ataque al intermedio acil-enzima, dando lugar a diferentes productos.

En condiciones micro-acuosas las lipasas catalizan la reacción reversa de esterificación, pero también las de interesterificación, transesterificación (por alcoholisis, por acidólisis o

INTRODUCCIÓN

por aminólisis) (Houde et al., 2004; Joseph et al., 2008; Ferreira-Dias et al., 2013), como descrito en la Figura 16. En estos casos, el nucleófilo natural (agua) es sustituido por un

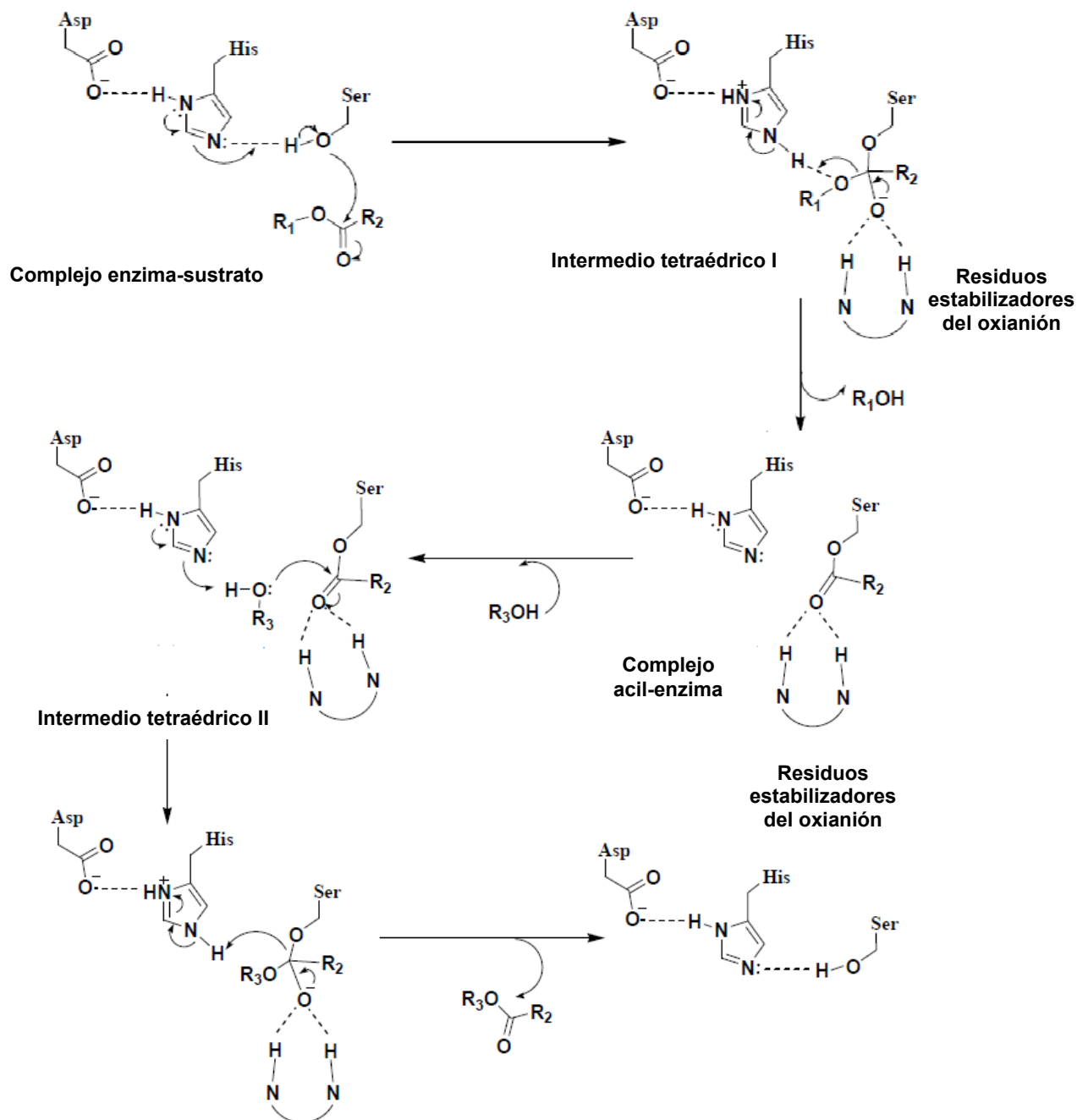


Figura 15 – Mecanismo detallado de hidrólisis de las lipasas (Hernaiz, 2012).

[1] Ligación al lípido, activación por la histidina del residuo nucleofílico (serina) y ataque al átomo de carbono del sustrato por la Ser O⁻. [2] Compuesto intermedio, con O⁻ estabilizado por interacciones con dos grupos NH. La histidina cede un protón al componente alcohol del sustrato. [3] El componente ácido del sustrato es esterificado al residuo serina de la enzima. El ion OH⁻ hace un ataque nucleofílico al átomo de carbono del compuesto intermedio. [4] El residuo de histidina cede un protón al átomo de oxígeno del residuo activo de serina; la ligación éster entre la serina y lo componente acílico es rota, el producto acílico es liberado y la enzima regenerada.

INTRODUCCIÓN

alcohol o una amina (Naik et al., 2010; Casas-Godoy et al., 2012). Está descrita su participación en procesos químicos tales como amonolisis (Alfonso & Gotor, 2004), hidrazinólisis (Gotor et al., 1990) y en la formación de perácidos (Björling et al., 1991), de acuerdo con las reacciones descritas en la Figura 16.

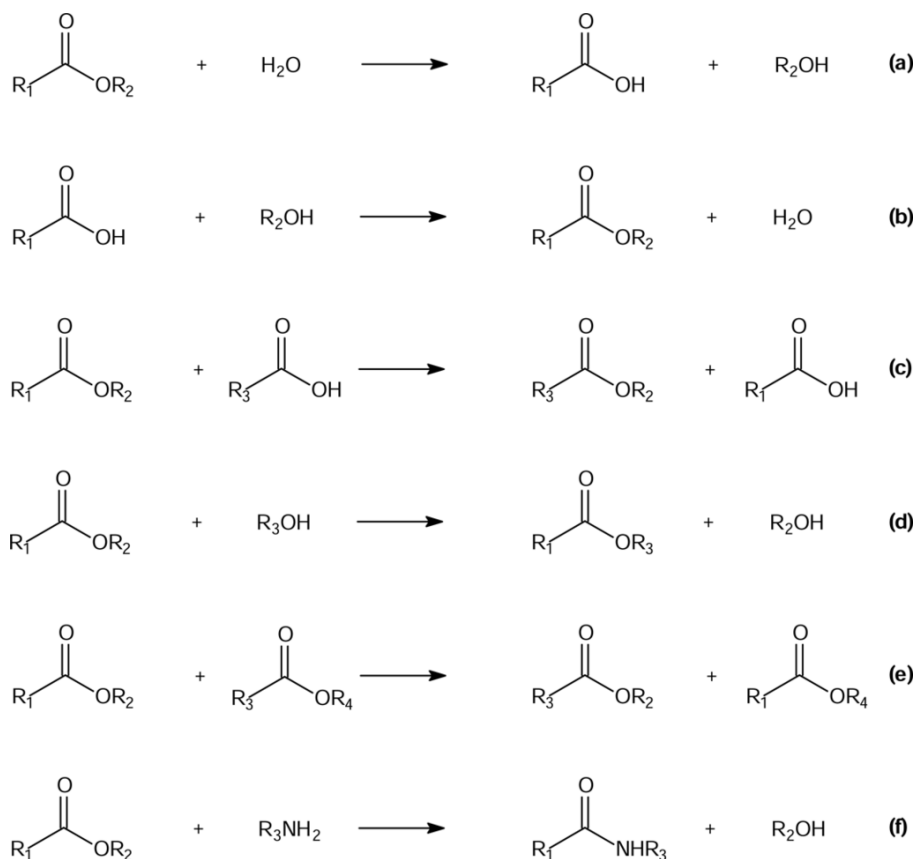


Figura 16 – Algunas reacciones catalizadas por lipasas (Zarevúcka & Wimmer, 2008).

(a) Hidrólisis, (b) Esterificación, (c) Transesterificación por acidólisis, (d) Transesterificación por alcoholólisis, (e) Interesterificación y (f) Transesterificación por aminólisis.

1.2.4 Especificidad frente a sustratos

De acuerdo con Jensen et al. (1983), en enzimas lipolíticas se pueden describir diferentes tipos de especificidad relativa:

- **Sustrato utilizado o quimioselectividad**, en que la misma enzima puede presentar diferentes tasas de catalisis de triacilglicerol (TAG), de diacilglicerol (DAG), y de monoacilglicerol (MAG), como por ejemplo la lipasa pancreática porcina (LPP), con una pauta TAG>DAG>MAG. Otro ejemplo es la reacción exclusiva con un grupo funcional de dos o más grupos funcionales distintos - por ejemplo poder realizar selectivamente aminólisis o acilación de una molécula bifuncional.

INTRODUCCIÓN

- **Posición del AG catalizado o regioselectividad:** algunas enzimas lipolíticas hidrolizan cualquiera de los enlaces éster en triglicéridos, independientemente de la posición del AG en la cadena de glicerol (*sn-1*, *sn-2* y *sn-3*), siendo no específicas. Otras solo hidrolizan ésteres primarios (*sn-1* y/o *sn-3*) o secundarios (*sn-2*).
- **Preferencia por el tamaño de la cadena hidrocarbonada del AG catalizado:** algunas enzimas solo utilizan AG de cadena corta, de cadena media o de cadena larga.
- **Preferencia por determinado grado de saturación de la cadena hidrocarbonada del AG catalizado:** algunas enzimas solo utilizan AG saturados, insaturados o poliinsaturados; algunas prefieren AG *trans* o *cis*, o con la ligación doble en determinada posición de la cadena del AG – es el caso de la lipasa de *G. candidum* que reconoce sustratos insaturados *cis-Δ*⁹ (Jensen et al., 1983).
- **Estereoselectividad¹¹ o enantioselectividad:** designa la preferencia por el enantiómero utilizado en la reacción (S o R), permitiendo hacer síntesis selectivas o asimétricas con sustratos quirales. Por ejemplo, la lipasa B de *C. antarctica* (CAL-B) muestra una gran enantioselectividad para R-enantiómeros de alcoholes secundarios (Kazlauskas et al., 1991).
- **Distintas combinaciones de los anteriores**

Algunos autores definen quimioselectividad como la capacidad para discriminar entre distintos grupos funcionales que pueden funcionar como sustrato y coexistir en la misma molécula. Así, la lipasa A de *C. antarctica* (CAL-A) demuestra gran quimioselectividad para la *N*-acilación de amino ésteres, en condiciones experimentales en las que otras hidrolasas darían lugar a una competencia entre la *N*-acilación en el grupo amino y la transesterificación en el grupo éster (De María et al., 2005). Esta capacidad la hace un catalizador útil en la producción de aminoácidos enantiopuros y moléculas relacionadas (Gyarmati et al., 2003, 2004).

La mayoría de las lipasas conocidas son *sn-1,3* regioespecíficas con actividad en las posiciones primarias del alcohol, originando la formación de 2-acil-monoglicéridos (2-MAG) y de 1,2 y 2,3-diacil-glicéridos (1,2 y 2,3-DAGs), mientras que unas pocas son capaces de reconocer también la posición *sn-2*, permitiendo la hidrólisis completa de los triglicéridos a AG libres (De María et al., 2005; Lotti & Alberghina, 2007) – es el caso de CAL-A, con alguna actividad en la posición *sn-2*, pero reconociendo también las otras posiciones de los triglicéridos, por lo que es considerada inespecífica (De María et al., 2005). Lipasas con una

¹¹ O estereoespecificidad.

INTRODUCCIÓN

preferencia *sn*-2, como sucede en la lipasa C de *Geotrichum* sp. FO401B (Ota et al., 2000) son raras en la naturaleza (Houde, 2004; Mhetras et al., 2009). La lipasa de *R. miehei*, la lipasa pancreática humana y Lipolase®¹² son ejemplos de lipasas *sn*-1,3 regioespecíficas (Godtfredsen, 1993).

Cuanto a la selectividad, las lipasas son capaces de convertir ésteres de ácidos grasos de cadena corta a larga (C4 a C18, raramente hasta C22), pero con diferentes eficiencias. De acuerdo con Lotti & Alberghina (2007), incluso isoformas de la misma enzima pueden diferir en esta propiedad, como sucede en la lipasa de *C. rugosa* donde la isoforma 1 actúa principalmente en los sustratos de cadena media (C8 -C10), las isoformas 2 y 4 actúan en moléculas de cadena larga (C16-C18), y la isoforma 3 en sustratos solubles de cadena corta.

Algunas lipasas muestran preferencias inusuales hacia AGI. Dignas de mención en este sentido es una isoforma de la lipasa de *G. candidum*, selectiva para sustratos insaturados *cis*- Δ^9 (Jensen et al., 1983), la lipasa pancreática porcina y algunas lipasas microbianas activas sobre sustratos poliinsaturados de cadena larga (AGPI) (Lotti & Alberghina, 2007).


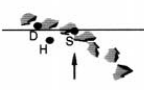
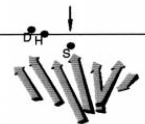
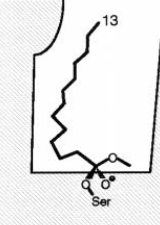
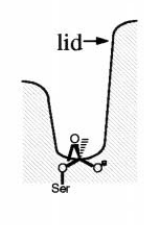
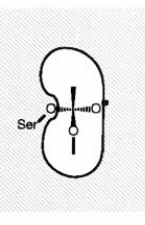


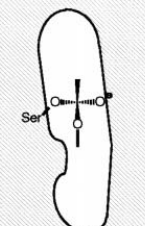
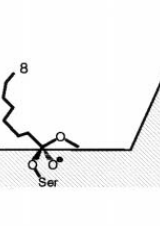
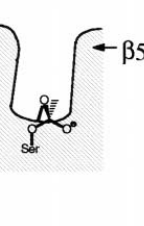
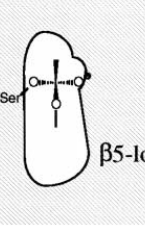
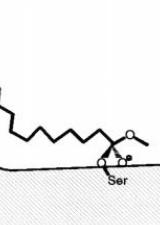
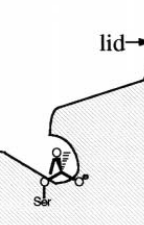
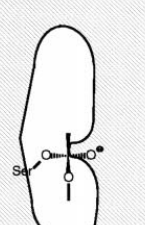
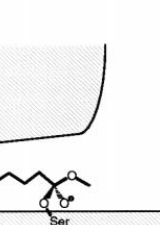

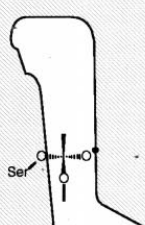
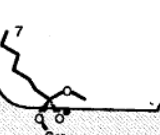
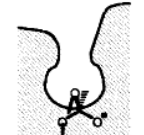
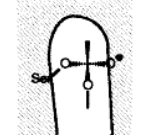
La forma, el tamaño y la hidrofobicidad del sitio de unión al sustrato se pueden correlacionar con la preferencia de una lipasa por AG de determinada longitud. Pleiss (1998) agrupó las lipasas en tres categorías según la geometría y dimensiones del sitio de unión al sustrato (Figura 17):

- 1) en forma de embudo, como en la lipasa B de *C. antarctica*, la lipasa de *Pseudomonas cepacia*, del páncreas porcino, y en la cutinasa de *Fusarium solanum* (Figura 17b, c, d y g, respectivamente);
- 2) en forma de hendidura, próxima de la superficie de la proteína, como en las lipasas de *Rhizomucor miehei* (Figura 17e) y de *Rhizopus* sp.;
- 3) en forma de túnel, en la lipasa de *C. rugosa* (Figura 17f), o la lipasa A de *C. antarctica* (Figura 18).

Estas diferencias en la anatomía del sitio de unión a los AG escindibles podría explicar la distinta especificidad de sustrato diversa que se encuentra en las enzimas lipolíticas. Por ejemplo, una lipasa con un sitio de unión en forma de túnel es más probable que acepte sustratos con AG de cadena larga que sustratos voluminosos. Debe aplicarse lo contrario a las lipasas con sitios de unión en forma de embudo (Pleiss et al., 1998).

¹² Lipolase fue la primera enzima comercial, producida por técnicas de ADN recombinante. Es de origen fúngico.

INTRODUCCIÓN

Enzima	 <p>vista lateral</p>	 <p>vista frontal</p>	 <p>vista superior</p>
<p>a</p> <p><i>C. antarctica</i> B</p>	 <p>13</p> <p>5 Å</p> <p>Ser</p>	 <p>lid</p> <p>Ser</p>	 <p>Ser</p>
<p>c</p> <p><i>Pseudomonas cepacia</i></p>	 <p>14</p> <p>Ser</p>	 <p>lid</p> <p>Ser</p>	 <p>Ser</p>
<p>d</p> <p>Pancreática humana</p>	 <p>8</p> <p>Ser</p>	 <p>lid</p> <p>Ser</p> <p>β5-loop</p>	 <p>Ser</p> <p>β5-loop</p>
<p>e</p> <p><i>Rhizomucor miehei</i></p>	 <p>18</p> <p>Ser</p>	 <p>lid</p> <p>Ser</p>	 <p>Ser</p>
<p>f</p> <p><i>Candida rugosa</i></p>	 <p>17</p> <p>Ser</p>	 <p>Ser</p>	 <p>lid</p> <p>Ser</p>
<p>g</p> <p><i>Fusarium solanum</i> cutinasa</p>	 <p>7</p> <p>Ser</p>	 <p>Ser</p>	 <p>Ser</p>

INTRODUCCIÓN

Figura 17- Morfología del sitio de unión al sustrato de algunas enzimas lipolíticas (Adaptado de Pleiss et al., 1998). **a** - Orientación de las secciones transversales que son planos perpendiculares al plano del papel, indicadas por una línea recta. La dirección de la vista es indicada por una flecha. El ejemplo (**a**) es relativo a *C. antarctica* B. De **b** a **g**: forma de los sitios de unión en vista lateral, frontal y superior. En esto caso sólo se muestra un modelo del ácido graso, se omite la restante cadena de los ésteres para mayor claridad. Los números indica la mayor longitud del ácido graso que se puede unir completamente en el interior del bolsillo de unión.

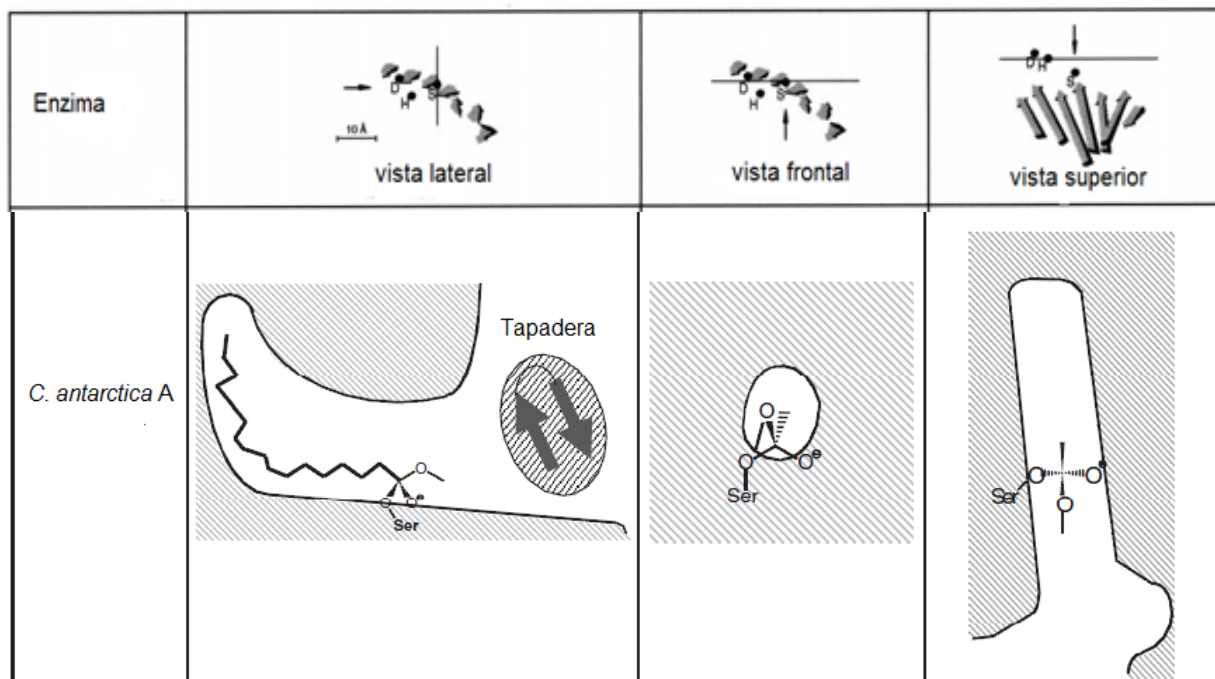


Figura 18- Morfología del sitio de unión al sustrato de *C. antarctica* A (Widmann et al., 2010).

Se piensa que las características únicas de CAL-A están relacionadas con la geometría y dimensiones del sitio de unión al sustrato.

Por teneren la capacidad de llevar a cabo diferentes transformaciones químicas sobre un amplio rango de sustratos naturales o no (Bornscheuer & Kazlauskas, 2004; Hernaíz, 2012) las lipasas son consideradas los biocatalizadores más versátiles (Pandey et al., 1999).

Estas reacciones transcurren generalmente con características de gran quimioselectividad, regioselectividad y enantioselectividad, volviendo estas enzimas fundamentales en procesos de transformación industrial (Jaeger et al., 1994; Beisson et al., 2000; Saxena et al., 2003a; Barros et al., 2010; Luković et al., 2011), tanto más que son enzimáticamente activas en solventes orgánicos más hidrofóbicos (Schmid & Verger, 1998; Barba et al., 2011; Morinaga et al., 2011), y estables (Jaeger & Eggert, 2002; Gotor-Fernández et al., 2006; Ferreira-Dias et al., 2013), lo que las hace ideales como herramientas en distintos procesos industriales, tales como procesamiento de alimentos, detergentes, aceites y grasas, cosméticos, productos farmacéuticos, agroquímicos, energía, textiles, papel, degreasamiento de pieles,

producción de polímeros biodegradables y de biodiesel, síntesis de aditivos alimentarios (Calero-Rueda et al., 2002; Luković et al., 2011; Morinaga et al., 2011). En las áreas de salud, pueden ser usadas en aplicaciones médicas y como herramientas de diagnóstico en análisis clínicos (Hasan et al., 2006; Verma et al., 2012). En el área ambiental se pueden usar en el tratamiento de basuras (Singh & Mukhopadhyay, 2012), de desechos de aceites (Masse et al., 2001), de poliuretano (Takamoto et al., 2001), en bioremediación y en la remoción de biofilme en sistemas de refrigeración por agua (Sharma et al., 2011).

Además de sus características de gran quimio, regio y enantioselectividad, su amplia gama de sustratos [se puede hablar en “promiscuidad” (Loughlin, 2000; Bornscheuer & Kazlauskas, 2004; O' Brien, 2006), una vez que su actividad no queda restringida a los sustratos naturales] y extenso abanico de reacciones (algunas de las cuales no sería posible obtener a través de procesos de síntesis química), la utilización de estos biocatalizadores presenta una serie de ventajas frente a los catalizadores químicos en procesos de síntesis, actuando en condiciones de presión atmosférica, temperatura suaves (20-40°C) y valores de pH próximos de la neutralidad (Päiviö, 2014). La mayoría de las lipasas no requiere cofactores (Bornscheuer et al., 2002; Sangeetha, 2009; Baldessari, 2012) y no origina reacciones laterales (Jaeger & Eggert, 2002; Gotor-Fernández et al., 2006), minimizando la ocurrencia de reacciones no deseadas de epimerización, racemización e isomerización. No requieren equipo muy especializado ni elevados costos energéticos [Gunstone, 1999; Lotti & Alberghina, 2007; Andualema & Gessesse (2012)] y pueden ser sobreexpresadas, haciendo los procesos biotecnológicos económicamente eficientes. El hecho de poder ser inmovilizadas permite su recuperación y su reutilización; las enzimas se obtienen a partir de recursos renovables, son biodegradables y sus reacciones no son agresivas con el medio ambiente, cumpliendo uno de los grandes retos de la industria farmacéutica y de química fina que es mejorar el costo y el perfil ambiental de sus productos y procesos químicos (Baldessari, 2012).

1.2.5 Microorganismos productores de lipasas

A pesar de la amplia distribución de las lipasas en los organismos vivos, se prefieren lipasas microbianas en aplicaciones industriales por su gran diversidad en cuanto a sustratos utilizados y condiciones de reacción, facilidad de obtención y de manipulación, bajo costo de producción y estabilidad (Lawson et al., 1994; Patil et al., 2011; Andualema & Gessesse, 2012), haciendo su producción, comercialización y aplicación a escala comercial más fáciles que las de origen animal o vegetal (Akoh et al., 2007; Antozak et al., 2009).

Se encuentran microorganismos productores de lipasas en varios habitats, incluyendo los suelos contaminados con aceites, en desechos de procesamiento de aceites vegetales y de

INTRODUCCIÓN

productos lácteos, basuras industriales, semillas y alimentos deteriorados (Sharma et al., 2001; Ko et al., 2005).

Los hongos con importancia en la producción de lipasas incluyen los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* y *Candida*, entre otros (Singh & Mukhopadhyay, 2012), pero también *Geotrichum*, *Mucor*, *Yarrowia* y *Humicola* (Lotti & Alberghina, 2007) y *Rhizomucor* (Mhetras et al., 2009). En las bacterias, las principales productoras son las especies pertenecientes a los géneros *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Chromobacterium* y *Pseudomonas* (Lotti & Alberghina, 2007; Wang et al., 2011). En algunos microorganismos patógenos, tales como *Candida albicans*, *Staphylococcus* sp., *Pseudomonas* sp. y *Helicobacter pylori* pueden actuar como factor de virulencia (Lotti & Alberghina, 2007), así como en *Acinetobacter* spp. (Hawkey & Bergogne-Berezin, 2006) o en el hongo fitopatógeno *Fusarium graminearum* (Feng, 2007). La lista de especies microbianas conocidas que producen lipasas es bastante larga y sigue aumentando, por lo que no es fácil enumerarlas todas. En las Tablas 7 a 9 se describen algunos de los más importantes microorganismos productores de lipasas.

Aunque las lipasas microbianas puedan ser intracelulares o extracelulares, la mayoría se secreta al medio ambiente, y puede ser producida en fermentaciones líquidas sumergidas o inmovilizadas (Andualema & Gessesse, 2012). El proceso de fermentación por lo general es seguido por lo de purificación con el fin de aumentar el grado de pureza, mejorando de este modo la actividad catalítica de la enzima (Barberis et al., 2008), siendo esta etapa de más difícil ejecución (Saxena et al., 2003b) y más onerosa que la primera (Joseph et al., 2008). La utilización de enzimas inmovilizadas facilita la separación del producto final y mejora la estabilidad frente a solventes orgánicos. De acuerdo con Robles-Medina et al. (2009), la mayor parte de las lipasas inmovilizadas comerciales son extracelulares, siendo las siguientes las más utilizadas: Novozyme 435® (isoenzima B de *C. antarctica* - CAL-B), Lipozyme RM IM® (de *Rhizomucor miehei*, anteriormente designado *Mucor miehei*) y Lipozyme TL IM® (de *Thermomyces lanuginosus*, anteriormente designado *Humicola lanuginosa*).

INTRODUCCIÓN

Tabla 7- Bacterias productores de lipasas

Espécies	Referências
Bacterias	
<i>Achromobacter</i> sp.	Mitsuda et al., 1988; Houde, 2004; Sangeetha, 2011
<i>A. calcoaceticus</i>	Sztajer & Zboinska, 1982; Jaeger et al., 1999;
<i>A. lipolyticum</i>	Sztajer & Zboinska, 1982; Brune & Gotz, 1992; Davranov, 1994
<i>Acinetobacter</i> sp.	Wakelin & Forster, 1997; Barbaro et al., 2001; Snellman et al., 2002
<i>A. johnsonii</i> LP28	Wang et al, 2011
<i>A. radioresistens</i>	Liu & Tsai, 2003
<i>Alcaligenes</i> sp.	Mitsuda et al., 1988; Houde, 2004
<i>A. denitrificans</i>	Odera et al., 1986
<i>Arthrobacter</i> sp.	Mitsuda et al., 1988; Pandey et al., 1999
<i>Archaeglobus fulgidus</i>	Jaeger et al., 1999
<i>Bacillus</i> sp.	Sidhu et al., 1998a, 1998b; Pandey et al., 1999; Nawani & Kaur, 2000; Sharma et al., 2002
<i>B. alcalophilus</i>	Ghanem et al., 2000
<i>B. atropheus</i>	Bradoo et al, 1999
<i>B. cereus</i>	Tahoun et al., 1985
<i>B. megaterium</i>	Hirohara et al., 1985
<i>B. laterosporus</i>	Toyo-Jozo, 1988
<i>B. pumilus</i>	Jaeger et al., 1999
<i>B. sphaericus</i>	Toyo-Jozo, 1988
<i>B. stearothermophilus</i>	Bradoo et al., 1999; Jaeger et al. 1999
<i>B. subtilis</i>	Lesuisse et al., 1993; Jaeger et al., 1999; Eggert et al., 2003; Ruiz et al., 2005
<i>B. thaiminolyticus</i>	Toyo-Jozo, 1988
<i>B. thermoleovorans</i>	Lee et al., 1999
<i>B. thermocatenuatus</i>	Jaeger et al., 1999; Pandey et al., 1999
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	Brune & Gotz, 1992
<i>Burkholderia cepacia</i>	Houde, 2004; Lund, 2001; Li & Yan, 2008; Andualema & Gessesse, 2012
<i>B. glumae</i>	Jaeger & Reetz, 1998
<i>Citrobacter</i>	Xu et al., 2009
<i>Chromobacterium violaceum</i>	Koritata et al., 1987
<i>C. viscosum</i>	Sugiura & Isobe, 1975; Mitsuda et al., 1988; Jaeger & Reetz, 1998; Jaeger et al., 1999
<i>Clostridium</i>	Xu et al., 2009
<i>Corynebacterium acnes</i>	Hassing, 1971; Sztajer & Zboinska, 1982; Brune & Gotz, 1992

INTRODUCCIÓN

Tabla 7 - Bacterias productoras de lipasas (continuación)

Espécies	Referencias
<i>Enterobacter</i>	Xu et al., 2009
<i>Enterococcus faecalis</i>	Kar et al., 1996
<i>Flavobacterium arborescens</i>	Hirohara et al., 1985
<i>Klebsiella</i> sp.	Xu et al., 2009
<i>Lactobacillus</i> sp.	Tahoun et al., 1985; Xu et al., 2009
<i>L. curvatus</i>	Brune & Gotz, 1992
<i>L. plantarum</i>	Lopes et al., 2002
<i>Micrococcus freudenreichii</i>	Lawrence et al., 1967
<i>Microthrix parvicella</i>	Wakelin & Forster, 1997
<i>Myxococcus xanthus</i>	Tahoun et al., 1985
<i>Moraxella</i> sp.	Jaeger et al., 1999
<i>Mycobacterium chelonae</i>	Pandey et al., 1999
<i>Pasteurella multocida</i>	Pratt et al., 2000
<i>Propionibacterium acnes</i>	Sztajer & Zboinska, 1982; Tahoun et al., 1985; Jaeger et al., 1999
<i>P. avidium</i>	Brune & Gotz, 1992
<i>P. granulosum</i>	Sztajer & Zboinska, 1982; Tahoun et al., 1985; Brune & Gotz, 1992
<i>Proteus</i> sp.	Tahoun et al., 1985
<i>Proteus vulgaris</i>	Jaeger et al., 1999
<i>Pseudomonas aureofaciens</i>	Koritata et al., 1987
<i>P. aeruginosa</i>	Sztajer & Zboinska, 1982; Chartrain et al., 1993
<i>P. alcaligenes</i>	Andualema & Gessesse, 2012
<i>P. fragi</i>	Jaeger et al., 1994; Schuepp et al., 1997; Ghanem et al., 2000; Lund, 2001
<i>P. fluorescens</i>	Sztajer & Zboinska, 1982; Mitsuda et al., 1988; Arpigny & Jaeger, 1999; Pandey et al., 1999; Lund, 2001; Houde, 2004; Hernaiz, 2012
<i>P. luteola</i>	Arpigny & Jaeger, 1999; Litthauer et al., 2002
<i>P. mendocina</i>	Jaeger et al., 1999; Surinenaite et al., 2002
<i>P. nitroreducens</i> var. <i>thermotolerans</i>	Ghanem et al., 2000
<i>P. pseudomallei</i>	Kanwar & Goswami, 2002; Houde, 2004
<i>P. stutzeri</i>	Houde, 2004
<i>P. wisconsinensis</i>	Arpigny & Jaeger, 1999
<i>Psychrobacter immobilis</i>	Jaeger et al., 1999
<i>Staphylococcus aureus</i>	Vadehra & Harmon, 1967; Sztajer & Zboinska, 1982; Simons et al., 1996; Jaeger et al., 1999

INTRODUCCIÓN

Tabla 7 - Bacterias productoras de lipasas (continuación)

Espécies	Referências
<i>S. epidermidis</i>	Simons et al., 1996; Jaeger et al., 1999
<i>S. haemolyticus</i>	Oh et al., 1999
<i>S. hyicus</i>	van Oort et al., 1989, Jaeger et al., 1999; van Kampen et al., 2001
<i>S. warneri</i>	Pandey et al., 1999; van Kampen et al., 2001
<i>S. xylosus</i>	Pandey et al., 1999; van Kampen et al., 2001; Mosbah et al., 2005
<i>Serratia marcescens</i>	Matsumae et al., 1993, 1994; Pandey et al., 1999; Abdou, 2003; Long et al., 2007; Hu et al., 2009; Hernaiz, 2012
<i>Streptococcus lactis</i>	Sztajer & Zboinska, 1982
<i>Streptomyces</i> sp.	Sztajer et al., 1988; Hou, 1994; Yoshinan, et al., 1994; Sommer et al., 1997
<i>Streptomyces exfoliatus</i>	Arpigny & Jaeger, 1999
<i>S. panayensis</i>	Hirohara et al., 1985
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	Jaeger et al., 1999
<i>Vibrio cholerae</i>	Jaeger et al., 1999

Tabla 8 - Hongos filamentosos productores de lipasas

Espécies	Referências
<i>Acremonium strictum</i>	Okeke & Okolo, 1990
<i>Alternaria brassicicola</i>	Berto et al., 1997
<i>Aspergillus awamori</i>	Satyanarayan & Johri, 1981; Yokozeki et al., 1982
<i>A. carneus</i>	Helisto & Korpela, 1998
<i>A. flavus</i>	Yokozeki et al., 1982; Long et al., 1996, 1998
<i>A. fumigatus</i>	Satyanarayan & Johri, 1981
<i>A. japonicus</i>	Satyanarayan & Johri, 1981
<i>A. nidulans</i>	Mayordoma et al., 2000
<i>A. niger</i>	Yokozeki et al., 1982; Macrae, 1986; Lesuisse et al., 1993; Chen et al., 1995; Namboodiri & Chattopadhyaya, 2000; Houde, 2004
<i>A. oryzae</i>	Yokozeki et al., 1982; Ohnishi et al., 1994a,b; Toida et al., 1998
<i>A. repens</i>	Kaminishi et al., 1999
<i>Botrytis cinerea</i>	Commenil et al., 1995
<i>Fusarium heterosporum</i>	Takahashi et al., 1998
<i>F. oxysporum</i>	Rapp, 1995
<i>F. solani</i>	Tahoun et al., 1985; Knight et al., 2000
<i>Humicola grisea</i>	Adam & Deploey, 1978
<i>H. insulens</i>	Adam & Deploey, 1978

INTRODUCCIÓN

Tabla 8 - Hongos filamentosos productores de lipasas (continuación)

Espécies	Referências
<i>Mucor</i> sp.	Nagoaka & Yamada, 1969
<i>M. circinelloides</i>	Balcão et al., 1998
<i>M. hiemalis</i>	Ghosh et al., 1996
<i>M. javanicus</i>	Ishihara et al., 1975; Goto et al., 1996; Houde, 2004
<i>M. lipolyticus</i>	Nagoaka & Yamada, 1973
<i>M. racemosus</i>	Ghosh et al., 1996
<i>Penicillium candidum</i>	Ortiz-Vazquez et al., 1993; Granados-Baeza & Riveramuñoz, 1997
<i>P. camembertii</i>	Ghosh et al., 1996; Ibrik et al., 1998; Houde, 2004
<i>P. citrinum</i>	Krieger et al., 1997; Sztajer & Maliszewska, 1989
<i>P. cyclopium</i>	Ibrik et al., 1998; Chahinian et al., 2000
<i>P. expansum</i>	Sztajer et al., 1993; Ibrik et al., 1998
<i>P. fusiculosum</i>	Hou, 1994
<i>P. roquefortii</i>	Petrovic et al., 1990; Houde, 2004
<i>P. simplicissimum</i>	Sztajer et al., 1992; Ibrik et al., 1998
<i>P. solitum</i>	Ibrik et al., 1998;
<i>P. urticae</i>	Kitamura et al., 1996
<i>P. wortmanii</i>	Costa & Peralta, 1999
<i>Rhizopus arrhizus</i>	Sztajer & Maliszewska, 1989; Elibol & Ozer, 2001
<i>R. chinensis</i>	Lesuisse et al., 1993; Ghosh et al., 1996
<i>R. delemar</i>	Nippon oils & Fats, 1986; Mitsuda et al., 1988; Lesuisse et al., 1993; Robles-Medina, 2009; Fernandez-Lafuente, 2010
<i>R. javanicus</i>	Patel et al., 1996
<i>R. japonicus</i>	Mitsuda et al., 1988; Nakashima et al., 1988
<i>R. microsporus</i>	Tahoun et al., 1985; Ghosh et al., 1996
<i>R. miehei</i>	Macrae, 1986; Rantakyla et al., 1996; Dellamora-Ortiz et al., 1997; Plou et al., 1998; Weber et al., 1999; Reis et al., 2009; Robles-Medina, 2009
<i>R. nigricans</i>	Ionita et al., 1996
<i>R. niveus</i>	Macrae, 1985; Kohno et al., 1994, 1999; Houde, 2004
<i>R. nodosus</i>	Tahoun et al., 1985; Nakashima et al., 1988
<i>R. oligosporus</i>	Beuchat, 1982
<i>R. oryzae</i>	Ngooi et al., 1990; Salleh et al., 1993; Zarevucka et al., 1993; Coenen et al., 1997; Beer et al. 1998; Essamri et al., 1998; Takahashi et al., 1998; Hiol et al., 2000; Houde, 2004
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Huge-Jensen & Gormsem, 1989; Lesuisse et al., 1993; Houde, 2004

INTRODUCCIÓN

Tabla 9 - Levaduras productoras de lipasas

Espécies	Referencias
<i>Candida antarctica</i>	Jensen et al., 1983; Buisman et al., 1998; Mitsuda et al., 1988; Robles-Medina, 2009;
<i>C. auricularia</i>	Mitsuda et al., 1988;
<i>C. cylindracea</i>	Macrae, 1986; Nippon oils & Fats, 1986; Buisman et al., 1998; Ngooi et al., 1990; Muralidhar et al., 2001; Houde, 2004;
<i>C. curvata</i>	Tahoun et al., 1985; Ghosh et al., 1996
<i>C. deformans</i>	Tahoun et al., 1985; Lacoïnte et al., 1996
<i>C. lipolytica</i>	Tahoun et al., 1985; Ngooi et al., 1990
<i>C. parapsilosis</i>	Lacoïnte et al., 1996
<i>C. rugosa</i>	Tahoun et al., 1985; Houde, 2004; Reis et al., 2009
<i>C. tropicalis</i>	Takahashi et al., 1988
<i>C. valida</i>	Ghosh et al., 1996
<i>Cryptococcus</i>	Ghosh et al., 1996
<i>Geotrichum candidum</i>	Lesuisse et al., 1993; Lotti & Alberghina, 2007; Sharma & Kanwar, 2013
<i>Pichia bispora</i>	Hou, 1994
<i>P. burtoni</i>	Sughiara et al., 1995
<i>P. maxicana</i>	Hou, 1994
<i>P. sivicola</i>	Sughiara et al., 1995
<i>P. xylosa</i>	Sughiara et al., 1995
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Papaparaskevas et al., 1992, Toyo-Jozo, 1988
<i>R. pilimornae</i>	Tahoun et al., 1985
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Tanisake, 1993
<i>S. crataeginensis</i>	Hou, 1994
<i>S. lipolytica</i>	Tahoun et al., 1985
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Hirohara et al., 1985
<i>Torula termophila</i>	Adam & Deploey, 1978
<i>Torulospora globora</i>	Hou, 1994
<i>Trichosporon asteroides</i>	Dharmsthiti & Ammaranond, 1997
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Lesuisse et al., 1993; Ghosh et al., 1996; Merek & Bednasski, 1996; De Felice et al., 1997; Pignede et al., 2000

1.2.6 Aplicaciones industriales y biotecnológicas de las lipasas

1.2.6.1 En síntesis orgánica

La síntesis de compuestos ópticamente activos, de gran interés en el área farmacéutica y en la industria de pesticidas emplea mayoritariamente lipasas en procesos de síntesis

INTRODUCCIÓN

estereoespecíficas, o en la resolución cinética de mezclas racémicas de alcoholes, ácidos, ésteres y aminas. La síntesis química convencional de compuestos farmacéuticos con un centro quiral genera normalmente mezclas a partes iguales de enantiómeros – mezclas racémicas. Muchos fármacos son producidos como mezclas racémicas porque los procesos químicos de síntesis orgánica no son estereoespecíficos. Desgraciadamente, muchas veces sólo uno de los enantiómeros es activo biológicamente porque la mayoría de las biomoléculas son estereoespecíficas. Siendo así, el contenido de un principio activo que es una mezcla racémica puede ser la mitad de activo, pudiendo además el isómero inactivo tener efectos adversos (González-Bacero et al., 2010). El caso más conocido es el la utilización de la talidomida, en que uno de los isómeros controlaba los mareos y vómitos asociados al primer trimestre del embarazo, mientras que el otro provocaba alteraciones fetales (Hein et al., 2013). El naproxeno, un antiinflamatorio no esteroideo es producido en síntesis química convencional bajo la forma de dos enantiómeros, siendo el (S) veintiocho veces más activo que el (R). Esta mezcla puede resolverse por esterificación catalizada por lipasas en solventes orgánicos (Cui et al., 1997; Kwon et al., 2009).

Las ariloxipropanolaminas constituyen un extenso e importante grupo de fármacos bloqueadores β -adrenérgicos o β -bloqueantes muy utilizados en el tratamiento de la hipertensión, las arritmias, algunas formas de angina y ciertos tipos de ansiedad, pero la actividad β -bloqueante sólo aparece en los enantiómeros (S) (Hernaiz, 2012). En su obtención se lleva a cabo una hidrólisis enantioselectiva a partir de un precursor utilizando la lipasa de páncreas porcino (**LPP**) (Elferink, 1995).

Durante los últimos años, muchos estudios realizados en compuestos farmacéuticos quirales evidenciaron que la actividad terapéutica deseada reside sobre todo en un de los enantiómeros, mientras que el otro es inocuo o perjudicial, y puede reducir la actividad del primero, provocar reacciones colaterales indeseadas, o simplemente aportar una contribución innecesaria a la dosis terapéutica con su presencia en la mezcla (Ariens, 1984). En la industria farmacéutica los procesos de interesterificación y de transesterificación enantioselectiva asumen gran importancia para obtener acilaciones y desacilaciones selectivas. De acuerdo con Gotor-Fernández et al. (2006), las lipasas se utilizan preferentemente en la resolución de alcoholes secundarios, por la elevada enantioselectividad que presentan frente a este tipo de sustratos. Estas características de las lipasas las volvieron importantes biocatalizadores en la industria farmacéutica, participando en el proceso de producción de varios inflamatorios no esteroideos (naproxeno, ibuprofeno, suprofen y ketoprofeno), todos ellos farmacológicamente activos en la forma de (S)-enantiómero (Hutt & Caldwell, 1984), de diltiazem (usado para controlar la presión arterial alta; Hulshof & Roskam, 1989), del agente antiviral lamivudina (usado contra el VIH),

de carbovir [agente que disminuye la carga viral de VIH, retarda o previene el daño al sistema inmunológico, reduciendo el riesgo de desarrollar SIDA (National Center for Biotechnology Information, 2015)], y de varios agentes antitumorales, de alcaloides, de antibióticos y de vitaminas (Houde et al., 2004).

En la industria de agroquímicos, al igual que en la farmacéutica, se utilizan las lipasas en la resolución de mezclas racémicas: un caso es el de la producción del enantiómero (S)-indanofano, un herbicida utilizado en los campos de arroz (Tanaka et al., 2002), cuyo (R)-enantiómero no posee actividad de control de las malas hierbas.

1.2.6.2 En la industria alimentaria

Las grasas y aceites son constituyentes importantes de los alimentos. El valor nutricional y sensorial de un lípido, así como sus propiedades físicas son influenciados por la longitud de la cadena de cada AG, su posición en la estructura carbonada del triacilglicerol, y por su grado de insaturación. Las lipasas permiten modificar las propiedades de los lípidos por modificación del grado de saturación de uno o varios AG, y/o por cambio de sus posiciones relativas en la cadena de glicerol, o substituyendo uno o más de esos AG por otros. Así, un lípido más barato y con características menos deseables puede ser transformado en otro de mayor valor (Coleman & Macrae, 1980; Pabai et al., 1995a,b).

Así, uno de los principales usos de las lipasas en la industria alimentaria es en la modificación y en la producción de nuevos aceites y grasas, para obtener alimentos más sanos (Hamam & Shahidi, 2005; Porsgaard et al., 2005; Villeneuve et al., 2007), de mayor valor nutricional, en la modificación de la textura o propiedades físicas, normalmente en la mejora del sabor y de la textura del pan y del queso; o en la síntesis de sustitutos de sabor (Gunasekaran & Das, 2005; Hasan et al., 2006; Aravindan et al., 2007). La utilización de lipasas en los procesos de elaboración de pan, de queso y de otros alimentos, solas o con otras enzimas, puede mejorar las propiedades reológicas y la vida útil de los productos, o producir aromas y emulgentes (Bárceñas et al., 2003; Mhetras et al., 2009). En la industria lechera se usan exhaustivamente lipasas microbianas en los procesos de lipólisis y mejora del sabor de la mantequilla, y en el proceso de madurez de los quesos (Akshatha et al., 2012). De acuerdo con Gupta et al. (2003) y Kilara (2011), la adición de lipasas que liberan AG de cadena corta (principalmente C4 y C6), conducen al desarrollo de un sabor fuerte y picante en quesos, mientras que la liberación de AG de cadena media (C12 a C14) tiende a conferir un sabor jabonoso al producto. En la elaboración de Roquefort se utilizan las lipasas del hongo filamentoso *Penicillium roqueforti*, responsables del aroma del queso “azul”.

Maruha (1996) desarrolló un método de preparación de triacilgliceroles con elevados niveles de AGPI a partir de monoacilgliceroles y/o diacilgliceroles con elevado contenido de AGI,

INTRODUCCIÓN

con recurso a una o más lipasas. De acuerdo con Pandey et al. (1999) este producto mejoraría las funciones de aprendizaje, activaría el sistema inmunitario y tendría actividad anti-aterosclerosis, antitumoral y anti-alérgica. Por sus efectos metabólicos, los AGPI son cada vez más utilizados como fármacos, nutracéuticos y aditivos alimentarios (Gill & Valivety, 1997a; Belarbi et al., 2000). Las lipasas microbianas son utilizadas para producir ácido- γ -linolénico y otros AGPI, esenciales para la normal síntesis de membranas y de prostaglandinas, a partir de lípidos de origen animal y vegetal. Estos ácidos, bien en su forma libre o bajo la forma de mono y diacilgliceroles, además de ser aditivos alimentarios, son usados en la producción de gran número de fármacos, principalmente anti-colesterémicos, anti-inflamatorios y trombolíticos (Gill & Valivety, 1997b; Belarbi et al., 2000).

Con el uso de lipasas en reacciones mixtas de hidrólisis y síntesis, se hace posible mejorar lípidos de características menos deseables. Es el caso de la utilización de la lipasa inmovilizada de *R. miehei*, en la reacción de transesterificación que substituye el ácido palmítico del aceite de palma por el esteárico, obteniéndose un sustituto de la manteca de cacao (el triglicérido esteárico-oleico-esteárico), para utilización en chocolatería (Coleman & Macrae, 1980; Undurraga et al., 2001). Pabai et al., 1995a describen un proceso de interesterificación usando mantequilla como sustrato, del cual se obtiene un derivado con menor grado de saturación y un aumento en el contenido de ácidos C18:0 y C18:1 en la posición *sn*-2 del triacilglicerol. Sharma et al. (2001) refieren su utilización en la modificación de aceites vegetales para obtención de sustitutos de la leche materna para bebés.

En la leche materna humana, el TAG presente en mayor cantidad es insaturado en las posiciones *sn*-1,3 y saturado en la posición *sn*-2. El ácido palmítico (C16:0) constituye unos 20-30% del total de AG, y cerca de 1/3 se encuentra en la posición *sn*-2 (Willis et al., 1998). Como en la digestión, la lipasa pancreática solo hidroliza AG en las posiciones *sn*-1,3 se origina un MAG con ácido palmítico en la posición *sn*-2, que se absorbe más fácilmente que el ácido palmítico libre, lo cual tiende a entrar en reacciones de saponificación con calcio, lo que reduce su absorción y causa estreñimiento (Houde, 2004). Como los aceites en los sustitutos de leche materna son de origen vegetal, usualmente con AGI en la posición *sn*-2 del TAG, la utilización de lipasas para aumentar la proporción de ácido palmítico en la posición *sn*-2 lleva a una mejor capacidad de absorción en los niños (Osborn & Akoh, 2002).

Las lipasas son todavía usadas en la obtención de colorantes y de aromas de uso alimentario, en las industrias de productos lácteos, de bebidas y panificación, y en biolipólisis, eliminando grasas en derivados de pescado y de carne (McGee, 1986; Zalacain et al., 1995; Kazlauskas & Bornscheuer, 1998; Ray, 2012).

1.2.6.3 En la industria de detergentes

Actualmente, muchos detergentes para ropa contienen cócteles de enzimas incluyendo proteasas, amilasas, celulasas y lipasas (Jeon et al., 2009). De acuerdo con Sharma et al. (2001), el uso de lipasas como compuestos funcionales en la formulación de detergentes es responsable de la venta de cerca de 1000 toneladas de lipasas cada año, alrededor 32% de las ventas totales de lipasas.

Las lipasas que forman parte de la composición de detergentes tienen que eliminar manchas de aceites y grasas en condiciones termofílicas y alcalinofílicas (pH entre 10,0 y 11,0 y temperaturas entre 30°C y 60°C), y ser capaces de funcionar en presencia de otros aditivos presentes en las formulaciones de los mismos (Macrae & Hammond, 1985; Jaeger et al., 1994; Quax, 2006; Salleh et al., 2006). La estabilidad y la actividad son factores cruciales de las enzimas usadas en la composición de detergentes. Grandes empresas como Unilever, Henkel y Procter & Gamble desarrollan proyectos de ADN recombinante para descubrir y perfeccionar lipasas. De acuerdo con Wiseman (1995), la más importante aplicación comercial de lipasas fúngicas es su utilización como aditivos en detergentes de lavanderías industriales y en detergentes domésticos.

Los requisitos para la aplicación de lipasas en las industrias de detergentes suelen incluir actividad en una amplia gama de sustratos y estabilidad a pH alcalino y temperaturas extremas, así como la compatibilidad con los diferentes componentes en un detergente, incluyendo iones metálicos, agentes tensioactivos, peróxido de hidrógeno, hipoclorito de sodio, antioxidantes y proteasas (Liu et al., 2009; Grbavčić et al., 2011; Guncheva y Zhiryakova, 2011; Horchani et al., 2012).

La utilización de lipasas puede reducir la carga ambiental de los productos detergentes, al permitir el ahorro de energía por la utilización de una menor temperatura de lavado (Vakhlu & Kour, 2006). A su vez, los detergentes que contienen enzimas en su composición se pueden formular con menos fosfatos, reduciendo en gran medida la liberación de este agente de eutrofización al medio ambiente (Gavrilescu & Chisti, 2005).

1.2.6.4 En el procesamiento de pieles y cuero

El procesamiento de pieles y cuero implica la remoción de grasa subcutánea y de pelos, y técnicas de alisamiento y de tinción. Normalmente esta preparación se hace en medio alcalino (pH 8 a 13) con recurso a mezclas enzimáticas de las cuales toman parte lipasas alcalinofílicas (Macrae & Hammond, 1985; Rohm, 1992). Muchas estirpes de *Bacillus* sp., que se desarrollan muy bien en condiciones de extrema alcalinidad son utilizadas en el procesamiento de pieles (Haalck et al., 1992). El tratamiento se inicia con la aplicación de proteasas, seguido del desgrasamiento con lipasas (Andualema & Gessesse, 2012).

1.2.6.5 En la industria textil

Después de evaluar enzimas lipolíticas de *P. cepacia*, *P. fluorescens*, *P. fragi* y *P. stutzeri*, Lund (2001) patentó un proceso combinado para el descolado y obtención de aspecto “stone-washed” de los vaqueros, usando la lipasa de *P. cepacia*.

Los textiles de tereftalato de polietileno son muy hidrófobos y por eso difíciles de teñir. Se usan las lipasas de *P. cepacia* y de *P. fluorescens* para mejorar la recuperación de humedad en ellos (Kim & Song, 2006), con el objetivo de mejorar su tinción.

1.2.6.6 En la industria de productos cosméticos

En la industria cosmética y en perfumería las lipasas se utilizan en la síntesis de fragancias y aromas, a través de reacciones de transesterificación, como en la obtención de 3,7-dimetil-4,7-octadieno-1-ol, el cual presenta aroma a rosas (Pandey et al., 1999), o por esterificación directa. De hecho, muchos ésteres de bajo peso molecular tales como acetato de etilo o acetato de isoamilo son constituyentes de fragancias y aromas. Se obtienen a partir de alcohol y del ácido correspondiente en sistema no acuoso en presencia de lipasas inmovilizadas de *C. antarctica* o de *R. miehei* (Gillies et al., 1987; Fonteyn et al., 1994; Razafindralambo et al., 1994). Garlapati & Banerjee (2013) refieren el metil butirato como un ester con un olor frutado a piña, manzana y fresa.

Miristato y palmitato de isopropilo, así como el 2-etilhexil palmitato son compuestos usados como emolientes en productos de higiene personal y en bronceadores. Se pueden producir en reacciones enzimáticas a baja temperatura con lipasas como alternativa a la síntesis química convencional (Andualema & Gessesse, 2012). Es común la utilización de la lipasa de *R. miehei*. También la lipasa de *C. cylindracea* es utilizada para la obtención de ésteres de cera con usos similares por esterificación de AG y de alcoholes grasos.

Los retinóides (vitamina A y compuestos derivados) se utilizan en productos cosméticos y farmacéuticos. Sus derivados hidrosolubles se obtienen a través de reacciones catalizadas por lipasas inmovilizadas (Maugard et al., 2002). Ésteres de los ácidos cinámico, elálgico, ferúlico, etc. pueden ser usados como aromas/fragancias, cosméticos o protectores solares (Chandel et al., 2011). El ester del ácido ferúlico tiene máxima absorpsión de radiación UV a 322nm, o sea entre la región UVA y UVB. Por lo tanto se puede utilizar como una potencial sustancia absorbente de UV para la protección de la piel contra la luz solar (Kumar & Kanwar, 2011).

1.2.6.7 En la producción de biodiesel

La disponibilidad limitada de los recursos de combustibles fósiles, su rápida disminución, el aumento de precios del petróleo crudo, y las preocupaciones medioambientales han sido las

INTRODUCCIÓN

diversas razones para explorar el uso de aceites vegetales como combustibles alternativos (Shah et al., 2004). Los ésteres monoalquílicos de ácido grasos de cadena larga son llamados biodiesel. Se pueden obtener a partir de aceites vegetales por transesterificación de acilglicéridos con metanol o etanol, o por esterificación de AG (Marchetti et al., 2007; Verhé et al., 2011). De acuerdo con Iso et al. (2001), la obtención de biodiesel a partir de aceites vegetales no produce óxido de azufre y minimiza las partículas de hollín hasta un tercio en comparación con las producidas a partir del petróleo, por lo que el biodiesel se puede considerar como un sustituto para el combustible diesel convencional. Salis et al. (2008) y Al-Zuhair et al. (2007) señalan que, además de ser biodegradable, sus productos de combustión tienen bajos niveles de partículas, de óxidos de azufre, de carbono y de nitrógeno, por lo que su utilización reduce la contaminación significativamente.

La utilización de biocatalizadores en el proceso de obtención presenta ventajas frente a la de catalizadores químicos ácidos o alcalinos: la reacción es más eficiente y ocurre en condiciones suaves, disminuyendo los costos de producción, se minimiza la formación de jabones y se obtiene un producto más limpio (Luković et al., 2011). Por eso el empleo de enzimas permite la utilización de materiales con altos niveles de AG libres o con elevados contenidos de agua (aceites no edibles, de cocina o industriales usados), y es considerado el proceso más eficiente de obtención de biodiesel a partir de residuos de aceites (Luković et al., 2011). La posibilidad de utilizar aceites usados disminuye los costos de obtención, una de las barreras para su más amplia utilización (Zhang et al., 2003).

Uno de los imperativos para la utilización industrial de una lipasa en el proceso de obtención de biodiesel es que sea no-estereoespecífica, para que todos los tri-, di- y monoglicéridos puedan ser convertidos en ésteres alquílicos de AG. Otro es la capacidad de esterificar AG libres (Fjerbaek et al., 2009). Las lipasas de *T. lanuginosus* y la B de *C. antarctica* son de las más utilizadas por su eficiencia, facilidad de uso, estabilidad en metanol y amplia gama de sustratos.

1.2.6.8 En bioremediación

Una de las aplicaciones biotecnológicas más recientes de las lipasas es su uso en bioremediación (Verma et al., 2012). Los desperdicios lipídicos de origen industrial, principalmente de refinerías (derrames de aceite durante el refinado), de restaurantes, los suelos y arenas contaminados con aceites, y las mareas negras pueden ser tratados con lipasas de diferentes orígenes (Singh et al., 1995; Karigar & Rao, 2011).

Las grasas y los aceites son el mayor componente orgánico de aguas residuales municipales y industriales, particularmente los residuos generados a partir de la elaboración de mataderos, de industrias alimentarias, lácteas, de bebidas, panadería y en actividades de

INTRODUCCIÓN

cocina (Prasad & Manjanuth, 2011; Kumar et al., 2012). Los residuos de aceite de cocina son una de las principales preocupaciones de los ambientalistas porque son liberados en el alcantarillado y en cursos de agua sin tratamiento, de una forma continua. Los residuos de grasa son en sí mismo un gran problema medioambiental, una vez que por lo general provocan obstrucción de tuberías y desagües, y son perjudiciales a la fauna acuática (Cipinyte et al., 2009; Fadile et al. 2011). Se han probado numerosas lipasas de origen microbiano respecto a la degradación de residuos lipídicos, incluyendo bacterias de los géneros *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, y el hongo filamentoso *Penicillium chrysogenum* (Wakelin & Forster, 1997; Cipinyte et al., 2009; Matsuoka et al., 2009; Kumar et al. 2012; Facchin et al., 2013).

En suelos contaminados con petróleo crudo, se relaciona el incremento de la actividad lipolítica microbiana con el descenso drástico en el contenido de hidrocarburos totales, por lo que se puede considerar esta actividad como un parámetro indicador para evaluar la degradación de hidrocarburos en el suelo (Margesin et al., 1999; Karigar & Rao, 2011), una vez que una mayor concentración de contaminante origina un incremento en la actividad lipolítica extracelular microbiana (Margesin et al., 2000). Entre las bacterias que pueden degradar productos derivados del petróleo se encuentran las de los géneros *Acinetobacter*, *Aerobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Mycobacterium*, *Moraxella*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Sphingomonas*, *Streptomyces*, y las cianobacterias (Thapa et al., 2012; Ukaegbu-Obi & Mbakwem-Aniebo, 2014; Ogbolosingha et al., 2015).

Las lipasas también son utilizadas para degradar aguas residuales contaminadas, tales como las provenientes de almazaras. En este caso el tratamiento consiste en la colocación de estirpes microbianas productoras de lipasas en los efluentes (Sarada & Joseph, 1993; DeFelice et al., 1997).

1.2.6.9 En la industria de papel

Se usan lipasas producidas por *Aspergillus* sp., *C. rugosa* y *C. cylindracea* en la industria de papel y de pasta de papel. Las enzimas lipolíticas son usadas para retirar la fracción lipídica ("pitch") de la madera, nomeadamente TAG y ceras, que interfieren con la elaboración de pasta de papel (Farell et al., 1997; Gavrilesco & Chisti, 2005; Gutiérrez et al., 2009). También son usadas en la eliminación de manchas de tinta en el proceso de reciclaje de papel (Fukuda et al., 1990).

2. OBJECTIVOS

Este trabajo empezó asociado a un proyecto de genómica funcional del género *Trichoderma*, dirigido a la identificación de genes con valor biotecnológico en estos hongos, principalmente en *T. harzianum*. Aunque han sido identificadas en *T. harzianum* distintas enzimas involucradas en un extenso abanico de procesos relacionados con biocontrol, poco o nada se sabe acerca de su sistema de enzimas lipolíticas.

Lipasas, esterasas, esteroles esterasas y cutinasas, entre otras, son enzimas lipolíticas utilizadas en una amplia gama de procesos que implican reacciones de hidrólisis y de síntesis, siendo consideradas los catalizadores más versátiles y reconocidas como el más importante grupo de biocatalizadores en biotecnología. Cada proceso productivo distinto requiere el uso de enzimas con características muy específicas, de acuerdo con las transformaciones deseadas. La eficiencia de catalisis y la estabilidad, pero también el precio son determinantes para su aplicación biotecnológica. Se prefieren las enzimas microbianas por la posibilidad de rápido crecimiento de microorganismos en medios de bajo costo, suministro regular, facilidad de manipulación genética, gran variedad de actividades catalíticas disponibles y posibilidad de altos rendimientos, aunque también por su facilidad de obtención, estabilidad y seguridad. Este es el caso de muchas enzimas lipolíticas. Por lo expuesto anteriormente, hay un gran interés en el descubrimiento de nuevas enzimas cuya utilización pueda presentar ventajas en procesos productivos.

Las lipasas bacterianas y fúngicas son las más utilizadas por la industria, proyectándose un mercado próximo a \$ 590 millones en 2020, y una tasa de crecimiento anual del 6,5% hasta ese año, lo que justifica la demanda de nuevas enzimas que posibiliten la resolución de más procesos de forma más eficiente.

En este trabajo se ha pretendido detectar lipasas en *Trichoderma harzianum* y contribuir a su caracterización.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 ESTs UTILIZADAS

Las siete ESTs de *Trichoderma harzianum*, a partir de las cuales se puso en marcha este trabajo, designadas como EST-299.t3, EST-1279, EST-2104, EST-2126, EST-2957, EST-5482 y EST-9632, proceden del proyecto TRICHOEST, financiado por la UE, cuyo objetivo era el análisis funcional del genoma de *Trichoderma* spp. en condiciones de micoparasitismo, estrés nutricional y interacción con planta. Estas ESTs fueron cedidas por el Dr. Enrique Monte (Universidad de Salamanca).

3.2 MICROORGANISMOS UTILIZADOS

3.2.1 *Trichoderma harzianum*

Se utilizó la cepa CECT 2413 de *T. harzianum* Rifai, proveniente de la Colección Española de Cultivos Tipo, Burjassot, Valencia. A partir de este momento, esta cepa se referirá como *T. harzianum* T34.

3.2.2 *Escherichia coli*

Se utilizaron las cepas descritas en la Tabla 10.

Tabla 10 – Características de las cepas de *E. coli* utilizadas.

CEPA	GENOTIPO	PROCEDENCIA
DH5 α	<i>supE44, ΔlacU169, (f80lacZΔM15), hsd R17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1</i>	Fermentas
LE 392	<i>e14⁻(McrA⁻) hsdR514 supE44 supF58 lacY1 o Δ(lacIZY)6 galK2 galT22, metB1 trpR55</i>	Stratagene

De acuerdo con (Hanahan, 1983), DH5 α es un huésped para el rastreo de colonias azules/blancas que utiliza la actividad de la β -galactosidasa (α -complementación) en combinación con el uso de vectores pUC. Como esta cepa no tiene *lac*^f, IPTG no es básicamente necesario. Por lo tanto, DH5 α permite la selección fácil del ADN recombinante con X-Gal, al construir una genoteca o al subclonar plásmidos recombinantes. Las mutaciones *recA1* y *endA1* de DH5 α TM aumentan la estabilidad de los insertos y mejoran la

MATERIALES Y MÉTODOS

calidad de ADN plasmidico obtenido a partir de minipreps. Las células DH5 α ofrecen los beneficios siguientes:

- Aumento del rendimiento en la extracción de plásmido debido a la mutación endA1.
- Rastreo de colonias azules/blancas debido a lacZ M15.
- Aseguran la estabilidad del inserto debido a la mutación recA1.

LE392 es un huésped permisivo permitiendo el crecimiento de fagos recombinados o no. Se recomienda como huésped primario para la amplificación de fagos recombinantes y para el rastreo de genotecas de ADNc con sondas de ácidos nucleicos. Es compatible con el vector de clonación λ -gt11, usado en este trabajo.

3.2.3 *Pichia pastoris*

P. pastoris es una levadura metilotrófica, que usa metanol como fuente de carbono en ausencia de glucosa. El promotor del gen alcohol oxidasa *AOX1* controla la expresión de esta enzima, que cataliza el primero paso del metabolismo del metanol. Muchos vectores de expresión en *Pichia* se basan en las características del promotor de *AOX1*, un promotor fuerte e inducido en medios con metanol.

La cepa utilizada de esta levadura se describe en la Tabla 11. Es un auxotrófo que requiere histidina, por poseer una mutación en el gen histidinol deshidrogenase *his4*, que le impide sintetizar ese aminoácido.

Tabla 11 – Cepa de *P. pastoris* utilizada

CEPA	GENOTIPO	PROCEDENCIA
GS 115	<i>his4</i> , <i>AOX1</i> , <i>AOX2</i>	Invitrogen

3.3 MEDIOS DE CULTIVO

Los medios se prepararon en agua ultrafiltrada (milliQ), refiriéndose todos los porcentajes a una relación peso/volumen. Los medios sólidos se prepararon adicionando agar al 2% a los correspondientes medios líquidos. Todos los medios fueron autoclavados a 120°C durante 20 minutos.

Para la selección de clones por resistencia a antibióticos, antes del vertido en las placas, los medios se suplementaron con el antibiótico correspondiente a una concentración adecuada (ampicilina – 50 μ g/ml; kanamicina – 30 μ g/ml).

MATERIALES Y MÉTODOS

En los medios líquidos cuya composición contenía algún aceite, éste se adicionaba después de su esterilización, de forma independiente, y de su homogeneización con recurso a ultrasonidos. Si el medio era sólido, el aceite se añadía cuando éste se había enfriado hasta 55°C y se homogeneizaba en recipientes de vidrio hermético de 250ml de capacidad, mediante fuerte agitación manual durante 5 minutos, hasta que el medio tomaba un aspecto lechoso y opaco.

3.3.1 Medios de cultivo para *T. harzianum*

- **PDA** (Patata Dextrosa Agar)

Se utilizó el agar glucosado de patata Sigma al 3,9%.

- **PDB** (Caldo de Patata-Dextrosa)

Se utilizó caldo de patata-dextrosa Sigma al 2,4%.

3.3.2 Medios de cultivo para *E. coli*

- **LB**

Extracto de levadura al 0,5%

Bactotripton al 1%

NaCl al 1%

Ajustado el pH a 7,2-7,4

- **NZY bottom agar**

Extracto de levadura al 0,5%

NZamina al 1,0%

NaCl al 0,5%

MgSO₄·7H₂O al 0,2%

Agar al 1,5%

Ajustado el pH a 7,5

- **NZY top agar**

Se preparó como el anterior, pero substituyendo el agar por agarosa al 0,7%.

3.3.3 Medios de cultivo para *P. pastoris*

La preparación de los medios habituales de crecimiento se llevó a cabo según las siguientes fórmulas (p/v):

- **YEPD líquido** (“Yeast Extract Peptone Dextrose Medium”)

Extracto de levadura al 1%

Peptona al 2%

D-glucosa al 2%

- **YEPD sólido** (“Yeast Extract Peptone Dextrose Medium”)

Se preparó como el anterior, pero añadiendo el agar al 2,0%

- **RD líquido** (“Regeneration Dextrose Medium”)

Sorbitol 1M

D-glucosa al 2%

YNB, base nitrogenada de levadura, con sulfato del amonio y sin aminoácidos, al 1,34%

Biotina al 4×10^{-5} %

Solución con aminoácidos: ácido L-glutámico, L-metionina, L-lisina, L-leucina, y L-isoleucina, al 0,005%.

Este medio fue utilizado para los transformantes de *Pichia*, motivo por el cual no se incorporó la histidina, normalmente presente a una concentración de 0,004% para el crecimiento de las cepas *his4* de *P. pastoris*. Cada medio específico empleado en el análisis de auxotrofías se preparó suprimiendo la sustancia correspondiente a la auxotrofia a analizar.

- **RDH líquido** (“Regeneration Dextrose Medium + Histidine”)

Se prepara como el anterior, pero añadiendo histidina al 0,004%.

- **RDB sólido** (“Regeneration Dextrose Base”)

Se prepara como el RD líquido, pero añadiendo el agar al 2,0%.

- **RDHB sólido** (“Regeneration Dextrose Histidine Base”)

Se prepara como el anterior, pero añadiendo histidina al 0,004%.

- **MD** (“Minimal Dextrose Medium”)

D-glucosa al 2%

YNB, base nitrogenada de levadura, con sulfato de amonio y sin aminoácidos, al 1,34%

Biotina al 4×10^{-5} %

Este medio fue utilizado para el crecimiento de los transformantes de *Pichia*, anterior a la extracción de ADN genómico.

- **MDH** (“Minimal Dextrose Medium + Histidine”)

Se prepara como el anterior, pero añadiendo histidina al 0,004%.

Se utilizó con cepas de *Pichia* no transformadas, utilizadas como control negativo en el protocolo de transformación por electroporación.

3.3.4 Medios para determinación de actividad lipásica

3.3.4.1 Medios sólidos

- **Agar Tributirina**

Este medio se preparó como el YEPD, pero haciendo variar el porcentaje de glucosa (0; 0,3; 0,5; 1 y 2%). Se añadió tributirina al 1% y se autoclavó.

- **Agar para detección lipásica (ADL)**

Este medio se basó en el “Rhodamine B lipase agar” (Alken-Murray Corporation, 2001), muy apropiado por su alta sensibilidad para detectar la actividad en medio sólido de las lipasas bacterianas. Se hicieron las modificaciones necesarias para adaptarlo a levaduras. Fue preparado en dos etapas. Se preparó un medio base y una emulsión lipídica, que se mezclaron en una proporción de 10% de emulsión y 90% de medio base.

- **Medio base:**

Peptona al 0,5%

Extracto de levadura al 0,3%

Agar al 1,5%

MATERIALES Y MÉTODOS

Ajustado el pH a 6,0. Autoclavar.

Tras autoclavar, por 100 ml se añadieron 10 ml de 10X YNB y 0,2 ml de 500XB. La glucosa añadida varió de 0 a 10 ml de glucosa 10XD, según las modalidades ensayadas (0; 0,3; 0,5; 1 y 2% de glucosa).

- o **Emulsión lipídica** (para 100ml):

Lípido al 30%.

Goma arábica al 12% (1,2% en el medio final).

Los componentes se disolvieron en agua destilada, y el volumen total se llevó hasta 80ml.

Después de autoclavar, la emulsión lipídica fue sujeta a ultrasonidos durante 10 minutos a 60°C. La solución de rodamina B fue filtrada y se añadieron 20 ml de solución de rodamina B (1mg/ml) a los demás reactivos de la emulsión lipídica (rodamina B al 0,02% (p/v) de la totalidad del medio a preparar). En seguida, la emulsión lipídica fue añadida a lo medio base agitando bien. El medio fue plaqueado de inmediato.

3.3.4.2 Medios líquidos

Los medios de inducción en *T. harzianum* se basaron en el **medio mínimo (MM)** descrito por Penttilä et al. (1987), al cual se hicieron algunas modificaciones. En la preparación de MM fueron usados, para 100ml:

KH_2PO_4 – 1,5 g

Glucosa -2,0 g

Solución de metales traza – 0,1 ml

Tras ajustar el pH a 6,2, estos componentes fueron autoclavados y después de enfriados se les añadió los siguientes (esterilizados en autoclave, con excepción del CaCl_2 1M, esterilizado por filtración):

MgSO_4 1M – 0,24 ml

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,25 mg/ml) – 2,0 ml

CaCl_2 1M – 0,41 ml

La composición de la solución de metales traza fue la siguiente:

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 5 mg/ml

$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 1,6 mg/ml

MATERIALES Y MÉTODOS

ZnSO₄·7H₂O – 1,4 mg/ml

CoCl₂ – 2,0 mg/ml

Este medio fue usado como control en los experimentos de inducción con lípidos. En la preparación de los medios de inducción se usaron emulsiones lipídicas con una composición idéntica a la referida en la preparación de ADL, pero sin rodamina, y se mezclaron a los componentes de MM después de autoclavarlos, a la concentración deseada.

3.4 CONDICIONES DE CULTIVO Y MANTENIMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS

El crecimiento de los microorganismos se realizó en medio sólido (sobre placas Petri) o en medio líquido (en matraces Erlenmeyer). Las temperaturas rutinarias de incubación fueron de 28-30°C para *P. pastoris* y de 25°C para *T. harzianum*. En *E. coli* la temperatura de incubación fue de 37°C. Los cultivos en medio líquido se desarrollaron bajo condiciones de agitación a 150-200 rpm, controlándose el crecimiento mediante la determinación de la absorbancia a longitudes de onda de 600 nm para las levaduras y 550 nm para las bacterias. La concentración de esporas de las suspensiones de *T. harzianum* se determinó mediante recuento de células en cámara Neubauer. La inoculación de medios líquidos se efectuó con 1×10^5 esporas de *T. harzianum* T34/ml.

Las concentraciones celulares de levaduras y bacterias se determinaron por espectrofotometría. En *P. pastoris*, a una unidad de DO_{600nm} corresponden $\sim 5 \times 10^7$ células/ml.

El mantenimiento de los microorganismos se realizó mediante resiembras periódicas (de 10 a 30 días) en los medios sólidos adecuados, posterior incubación a la temperatura óptima correspondiente y, por último, conservación a 4°C (con excepción de *T. harzianum*, mantenido a 20-25°C). Adicionalmente, para mantener las cepas viables durante largos períodos de tiempo, los microorganismos se guardaron en glicerol al 15-30% bajo temperaturas de -70°C.

3.5 VECTORES DE CLONACIÓN DE ADN O DE EXPRESIÓN UTILIZADOS

3.5.1 Plásmidos de levaduras

Para la clonación en *Pichia pastoris* se usó el vector de expresión pIB2 (Sears et al., 1998), de 5546pb (Figura 19). Es un plásmido derivado de pUC19, al cual: (a) se insertó un gen

*HIS4*¹³ de *P. pastoris* modificado; y (b) se colocó la región del terminador de transcripción del gen *AOX1* inmediatamente después del sitio de clonación múltiple. Contiene aún el promotor de la gliceraldeído-3-fosfato deshidrogenasa [*GAP*; (Waterham et al., 1997)] inmediatamente antes del sitio de clonación múltiple. Un gen insertado en el sitio de clonación múltiple de este vector será expresado bajo control del promotor adyacente. El promotor *GAP* es un promotor constitutivo y fuerte. La presencia del terminador de la transcripción de *AOX1* asegura que los extremos 3'-extremos sean procesados correctamente (Koutz et al., 1989).

3.5.2 Plásmidos bacterianos

- **Bluescript KS⁺ y SK⁺** (Stratagene)

Se utilizó el plásmido Bluescript KS⁺ (Figura 20A), plásmido bacteriano autoreplicativo de 2958 pb, derivado de pUC19, en cuya secuencia se incluyen los siguientes elementos: el gen de resistencia a ampicilina, el origen de replicación relajado *colE1*, un fragmento del operón *lac* de *E. coli* que codifica el péptido α de la β -galactosidasa (*lac Z*), un fragmento oligonucleotídico de 108 pb con 21 sitios de reconocimiento para endonucleasas de restricción específicas, insertado en fase de lectura del péptido alfa sin alterarla (la única diferencia entre el KS y el SK es la orientación de este oligonucleótido), los promotores de las ARN polimerasas T3 y T7, que flanquean por ambos lados al fragmento de ADN portador de los sitios múltiples de clonación, permitiendo la síntesis "in vitro" de ARN, un fragmento de 454 pb de la región intergénica del fago f1 (relacionado con el bacteriófago M13), que codifica las funciones requeridas para replicación y empaquetamiento permitiendo la recuperación como ADN circular monocatenario una vez tratadas células portadoras de estos plásmidos con el fago modificado M13K07.

- **pGEM-T**

Para la clonación de productos de PCR se utilizó el plásmido pGEM-T (Figura 20B), un vector linearizado de 3,0 kb preparado por la casa comercial "Promega" mediante digestión con *EcoRV* del vector pGEM-5Zf(+) (semejante al pGEM-T, pero circular) y posterior adición de una timidina en posición 3' en cada uno de los extremos generados. La adición de estas dos timidinas en posición 3' aumenta la eficiencia de ligación del producto de PCR en el vector debido a que la Taq polimerasa deja dos deoxiadenosinas en los extremos 3' del fragmento de ADN sintetizado en la reacción de PCR. Los clones que contienen insertos en esta región (el inserto inactiva el péptido) se identifican directamente por la ausencia de color azul en

¹³ Histidinol deshidrogenasa

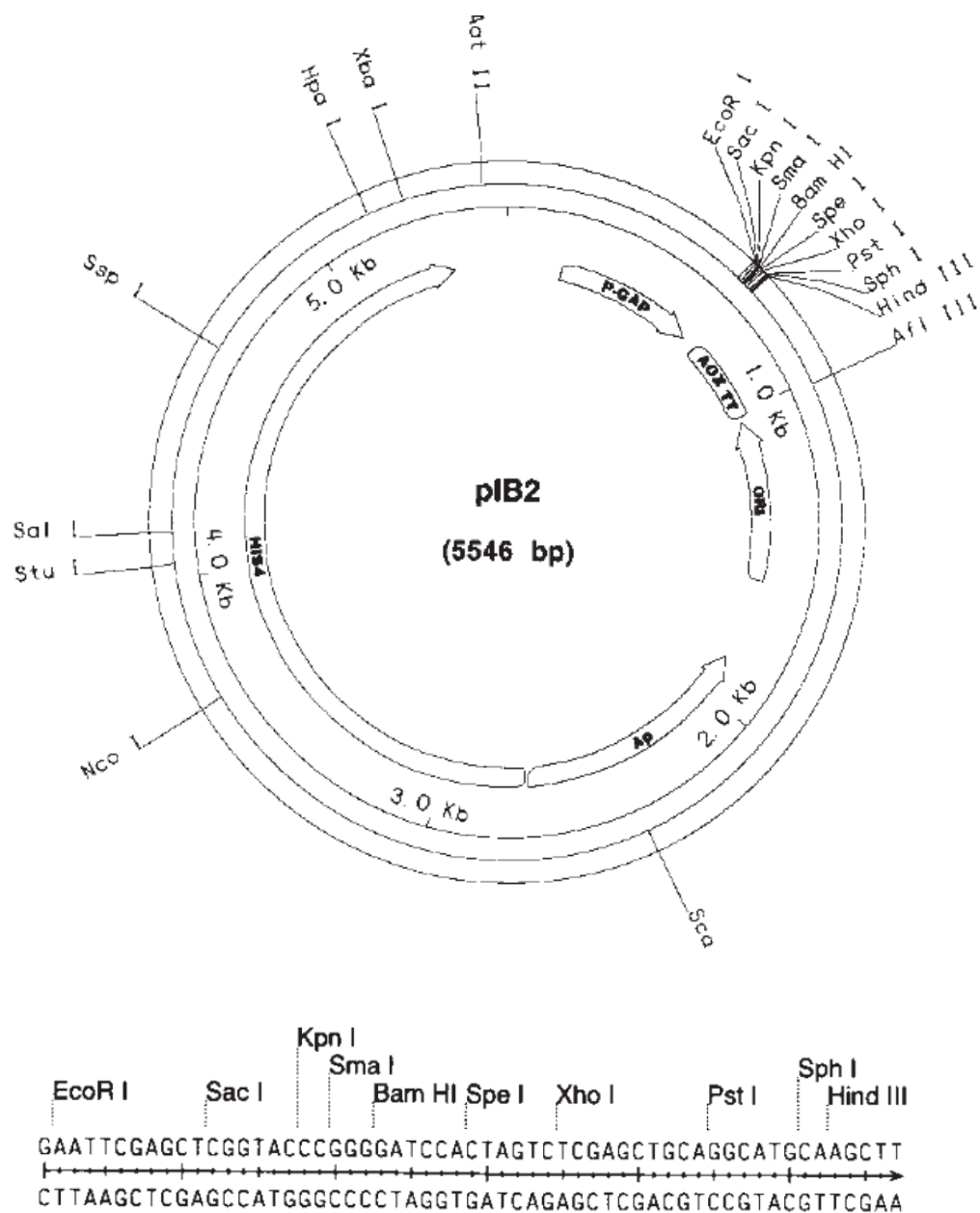


Figura 19 - Estructura del vector de expresión pIB2 y secuencia del sitio de clonación múltiple, indicando los sitios únicos de restricción (Sears et al., 1988).

AOX TT, terminador de transcripción del gen *AOX1*¹⁴ de *P. pastoris*; **ORI**, origen de replicación de ColE1; **Ap**, gen de la β-lactamasa que confiere resistencia a la ampicilina; **HIS4**, el gen *HIS4* de *P. pastoris*; **P-GAP**, promotor del gen *GAP*¹⁵ de *P. pastoris*.

¹⁴ Alcohol oxidasa1.

¹⁵ Gliceraldehído-3- fosfato deshidrogenasa.

MATERIALES Y MÉTODOS

placas con X-Gal e IPTG (el color azul es consecuencia de la actividad del péptido α de la β -galactosidasa). El vector pBluescript KS(+) tiene un origen de replicación F1, orientado en un modo que la transcripción procede en la misma dirección que la transcripción de *lacZ*.

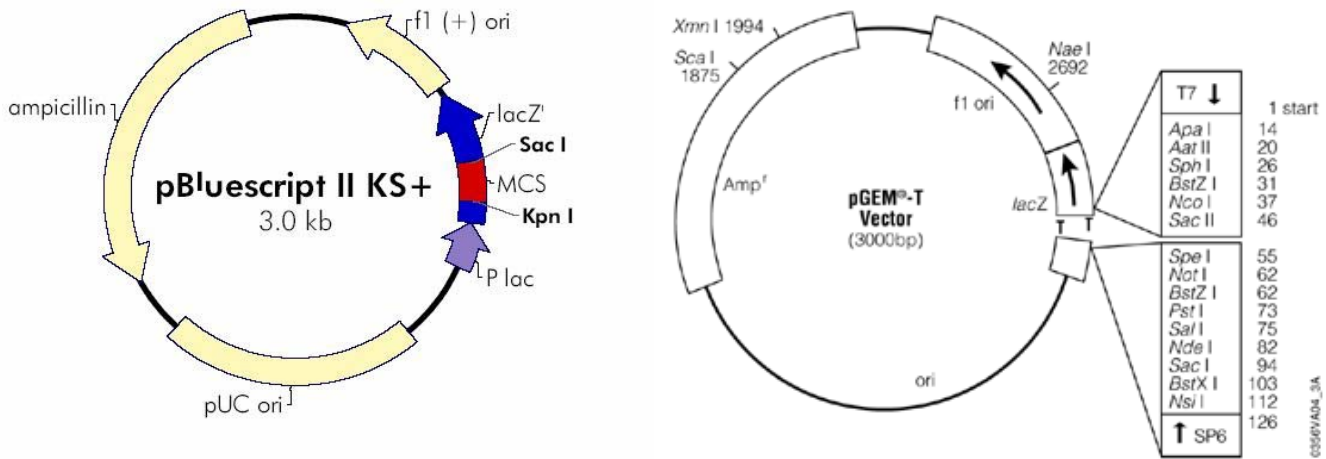


Figura 20 – Estructura de los vectores de clonación bacterianos: pBluescript (A)(Agilent Technologies, 2010) y pGEM-T (B) (Promega, 2010).

3.5.3 Plásmidos víricos

El vector de clonación y de expresión λ gt11, representado en la Figura 21, contiene un sitio único *EcoRI* para clonar el ADNc sintetizado usando oligo(dT) o cebadores al azar, seguido de los adaptadores de *EcoRI*. El sitio de la inserción de *EcoRI* está situado dentro del gen *LacZ* en sentido inverso del código de la terminación de la traducción de la β -galactosidasa. El gen funcional de la β -galactosidasa es inactivado por inserción de ADN exógeno. Los fagos recombinantes pueden ser detectados por la formación de halos de lisis incoloros cuando las genotecas se plaquean en huéspedes *lac-*, en la presencia de X-gal e IPTG. Los fagos no recombinantes forman halos azules. Insertos de ADN hasta 7,2Kb pueden ser clonados en λ -gt11. Este vector está disponible comercialmente, sin cortar o con brazos de *EcoRI*.

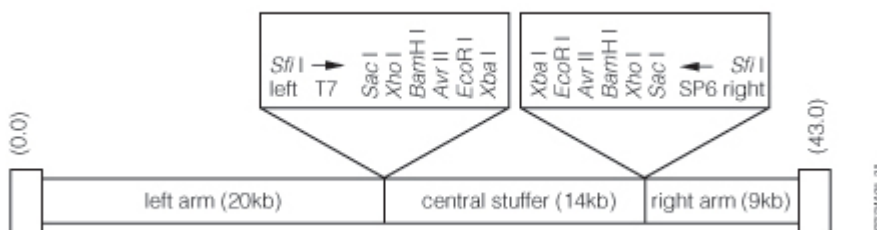


Figura 21 – Mapa del vector λ gt11 (Promega, 2011).

3.6 TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

3.6.1 Obtención de ADN genómico de *T. harzianum*

Para la extracción de ADN genómico de *T. harzianum* T34 se ha recogido el micelio a partir de las zonas de crecimiento activo del hongo en el borde de las colonias desarrolladas en PDA, y se ha depositado en nuevas placas de PDA, cuya superficie se había cubierto con una membrana de celofán estéril. De esta forma, se consiguió después de 3-4 días recoger el micelio del hongo, sin residuos de agar.

El protocolo de extracción de ADN usado se basa en el método de extracción con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1). Por 100 mg de micelio fresco se añadieron 50 mg de arena estéril, 10mg de PVPP y 750µl de tampón de extracción B (200mM de Tris-HCl pH; 250 mM de NaCl; 25 mM EDTA pH 7,5; 0,5% de SDS (p/v). La mezcla fue macerada hasta quedar homogénea. Se centrifugó a 13200 rpm durante 7 minutos, y se llevó el sobrenadante a un tubo limpio.

Se añadió 500 µl de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), y se invirtió el tubo despacio. Se centrifugó a 13200 rpm durante 5 minutos, y se retiró la fase lechosa del sobrenadante, normalmente situada más arriba que se llevó a un tubo limpio. Se llenó el tubo con isopropanol (-20°C) y se invirtió el tubo despacio. Se centrifugó a 13200 rpm durante 10 minutos, y se quitó el isopropanol. Se lavó el tubo con 1ml de etanol al 70%, y se invirtió despacio. Se centrifugó a 13200 rpm durante 2 minutos, y se quitó el etanol. Se secó el contenido del eppendorf, colocándolo en una estufa a 50-60°C, durante algunos minutos hasta secar el pellet de ADN. Se añadieron 100 µl del agua Millipore en el tubo y 3 µl de RNAsa (5 mg/ml). Se llevó a un baño a 37°C durante 5 minutos (el tratamiento con RNAsa puede ser diferido).

3.6.2 Obtención de ADN genómico de *P. pastoris*.

Para la obtención de ADN de *P. pastoris* se usó el protocolo descrito por Hoffman & Winston (1987).

Se partió de un cultivo de 10 ml en YEPD en la fase estacionaria (~100µl de células). Se centrifugó, se retiró el sobrenadante y se resuspendieron las células en 0,5 ml de agua estéril. Se transfirieron a un eppendorf y se volvieron a centrifugar unos segundos para eliminar el sobrenadante.

Luego se añadieron 200 µl de tampón de extracción (Tritón X-100 al 2%; SDS 1%; NaCl 100mM; Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM), 200 µl de fenol-cloroformo-isoamilalcohol (25:24:1) y 0,3 g de perlas de vidrio de 0,45-0,5 mm de diámetro (ballotini).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se rompieron las células por agitación durante 3-5 minutos en el vortex, usando ciclos de 30 s de vortex y 30 s en hielo, alternadamente. Se les añadió 200 µl de TE.

Tras centrifugar 5 minutos, se transfirió la fase acuosa a un eppendorf nuevo, se añadió 1ml de etanol absoluto y se mezcló por inversión. Se centrifugó durante 2 minutos, y se quitó el sobrenadante. Se resuspendió el precipitado en 400 µl de TE, y se le añadió 30 µl de RNAsa A. Se incubó 5 minutos a 37°C, y se añadieron 10 µl de acetato de amonio 4M y 1ml de etanol absoluto. Se mezcló por inversión, y se dejó en hielo por 10 minutos.

El ADN precipitado se recuperó tras centrifugación de 2 minutos, se lavó con etanol a 70°C, se secó y se resuspendió en 30 µl de TE o agua.

3.6.3 Aislamiento de ADN plasmídico de *E. coli*.

Se usó el método de lisis alcalina para el aislamiento de ADN plasmídico a pequeña escala a partir de *E. coli* (Birboim & Doly, 1979). La obtención de ADN de alta calidad a pequeña escala se realizó utilizando el “kit” Wizard® plus SV minipreps de Promega. Para la obtención de ADN a gran escala se usó el “kit” Wizard® plus SV midipreps de Promega, siguiendo las indicaciones del fabricante.

3.6.4 Aislamiento de ADN del fago λGEM-11

Para la obtención de ADN del fago se usó el “kit” Qiagen® Lambda Midi Kit, siguiendo las indicaciones del fabricante.

3.6.5 Obtención de ARN

3.6.5.1 En *T. harzianum*

En la extracción de ARN se utilizó el reactivo Trizol, que está compuesto por una mezcla de fenol (en el que los ácidos nucleicos son insolubles) y tiocianato de guanidina (agente desnaturalizante de proteínas e inhibidor de proteasas) a pH 4,5. Así la integridad del ARN se mantiene durante la extracción. La adición de cloroformo, seguida de una centrifugación, permite separar la fase acuosa superior, que contiene el ARN, de la fase orgánica, compuesta por proteínas y ADN. El ARN se recupera mediante una precipitación con isopropanol.

Descripción del método:

El micelio del hongo, previamente congelado en nitrógeno líquido, se fragmentó en un mortero y se pasó a tubos de 1,5 ml. En cada tubo se colocaron cerca de 50-100 mg, con

MATERIALES Y MÉTODOS

precaución de que la muestra no se descongele. El volumen de la muestra no debe exceder el 10% del volumen de Trizol usado.

Los 50-100 mg del micelio fragmentado se homogeneizaron en 1 ml de Trizol, primero con embolo y cuidadosamente evitando que se vuelque el Trizol, después con vórtex. Las muestras se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente.

Se centrifugó 10 minutos a 4°C y 12000 g. El pellet resultante contiene membranas, polisacáridos y ADN, mientras que el sobrenadante contiene ARN. Este se transfirió a un nuevo tubo y se le añadió 0,2 ml de cloroformo por ml de Trizol. Se agitaron manualmente los tubos por 20 s y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos, con agitación periódica. Se centrifugaron las muestras a 12000 g durante 15 minutos a 4°C.

Se transfirió la fase acuosa, donde se encuentra el ARN, a un tubo limpio. El volumen de esta fase está en torno al 60% de volumen de Trizol usado en la homogeneización.

Para la precipitación de ARN se añadió 0,25 ml de isopropanol seguido de 0,25 ml de una solución 1,2 M de citrato sódico y 0,8 M de NaCl. Se mezcló y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se centrifugó a 12000 g durante 8 minutos a 4°C. Se retiró el sobrenadante y se guardó el pellet. En este paso, el ARN precipita de forma efectiva, mientras que contaminantes del tipo proteoglicanos o polisacáridos permanecen en forma soluble en el sobrenadante.

Se lavó y se despegó el pellet con 1 ml de etanol al 75% en H₂O tratada con DEPC al 0,1%, helado. Se agitó en vórtex, y se centrifugó a no más de 7500 g durante 10 minutos a 4°C, y se eliminó el sobrenadante.

Se dejó secar el pellet 5 minutos a temperatura ambiente o a 37°C.

Se resuspendió el pellet en 20 µl de H₂O tratada con DEPC al 0,1% y se incubó a 55-60° C durante 10 minutos. Es importante calentar para aumentar la solubilidad del ARN.

Se tomó una muestra para correr en gel, y se almacenó a -70°C.

3.6.5.2 En *P. pastoris*

También aquí se usó el protocolo del Trizol, pero adaptándolo a levaduras. Se efectuó la disrupción de células previamente congeladas en nitrógeno líquido en un mortero y se pasaron a tubos de 1,5ml. Se usó 1 ml de Trizol por 5x10⁶ células de *P. pastoris*.

3.6.6 Valoración de la concentración de ácidos nucleicos.

Las concentraciones de ADN y ARN se calcularon midiendo la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro Cary 50 Scan UV-Visible (Varian), considerando las siguientes ecuaciones:

$$C_{\text{ADN}} = A_{260} \times 50 \times \text{Factor de dilución } (\mu\text{g/ml}), \text{ y}$$

$$C_{\text{ARN}} = A_{260} \times 40 \times \text{Factor de dilución } (\mu\text{g/ml})$$

El ARN se midió diluido en Tris-HCl 10 mM pH 7,0. Se consideró la relación de absorbancia 260/280 para estimar el grado de pureza de la preparación (1,8 para el ADN; 2,0 para el ARN). Ocasionalmente, también se midió la relación de absorbancia 260/230, para evaluar la presencia de vestigios de fenol.

En ocasiones, se comparó la intensidad de la fluorescencia de las bandas de ADN de la muestra con otras de concentración conocida, mediante electroforesis en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio e irradiados con luz ultravioleta.

3.6.7 Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa

3.6.7.1 Electroforesis de fragmentos de ADN

La separación e identificación de fragmentos de ADN se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa (al 0,7-2,0%) (Sambrook et al., 1989). Los geles se prepararon con TBE (Tris-Borato 90 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0) y se realizó la electroforesis a voltajes entre 40-80 V en una cubeta de electroforesis con el mismo tampón. Cuando fue necesario recuperar fragmentos de ADN se utilizó TAE (Tris-Acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) en lugar de TBE. Para visualizar los fragmentos de ADN, al gel se le añadió bromuro de etidio (concentración final de 0,1 $\mu\text{g/ml}$). Las bandas se observaron al irradiar el gel con luz ultravioleta. Los tamaños de los fragmentos se determinaron comparándolos con marcadores de peso molecular conocido. Las imágenes de los geles se tomaron con un equipo Eagle Eye™ II de Stratagene.

3.6.7.2 Electroforesis de fragmentos de ARN

Para comprobar la calidad del ARN después del proceso de extracción, la separación e identificación de fragmentos de ARN se realizó mediante electroforesis en geles no desnaturizantes de agarosa al 1,0 %, en TAE preparado en H₂O tratada con DEPC al 0,1%. En este caso, el tampón de carga usado, 2X ARN loading dye Fermentas (95% formamida; 0,025% SDS; 0,025% azul de bromofenol; 0,025% xileno cianol FF; 0,025% BrEt; EDTA 0,5 mM pH 8,0), ya tenía añadido el bromuro de etidio. Las muestras se

hirvieron a 70°C durante 5 minutos en tampón de carga, se pusieron en hielo y se cargaron de inmediato.

La visualización de imágenes de los geles se hizo como para el ADN. Se usó el “RiboRuler High Range RNA Ladder” Fermentas como marcador de peso molecular.

3.6.8 Purificación de fragmentos de ADN

El aislamiento y la purificación de fragmentos específicos de ADN a partir de geles de agarosa se realizaron recortando la banda de agarosa que contenía el fragmento de ADN de interés, a partir de geles preparados en TAE, y bien resueltos. El ADN presente en la banda recortada se purificaba mediante el "kit" GeneClean II (Bio 101, La Jolla, California), siguiendo las indicaciones del fabricante. El ADN se adhiere primero a una matriz de sílica y después se libera en condiciones controladas.

3.6.9 Digestión del ADN con enzimas de restricción

La digestión con enzimas de restricción permite la caracterización física de fragmentos de ADN y es una etapa necesaria para la construcción de moléculas recombinantes. El tratamiento de las muestras se llevó a cabo siguiendo las recomendaciones especificadas por los suministradores comerciales (Promega, Fermentas e Invitrogen) y las generalidades descritas en los manuales de laboratorio (Sambrook et al., 1989). El análisis de los fragmentos se realizó por electroforesis en geles de agarosa.

En los casos en que tuvo de efectuarse digestiones con dos enzimas en simultáneo, se recurrió al tampón universal, con la siguiente composición:

10X DTT (DTT 10mM)

10X espermidina (espermidina 30 mM)

10X tampón Carlos:

- Tris-acético 330 mM pH 7,5
- Acetato de magnesio 100 mM
- Acetato de potasio 660 mM
- BSA 1mg/ml

Por su efecto estabilizador y protector de proteasas (Promega, 2013), la sero albumina bovina (BSA) se añadió a todas las reacciones de digestión enzimática hasta una concentración final de 0,2mg/ml.

3.6.10 Tratamiento con fosfatasa alcalina

Este tratamiento se llevó a cabo para eliminar los grupos fosfato de los extremos 5' del plásmido linearizado e impedir la religación, con el siguiente método: el plásmido linearizado se incubó con CIAP, "Calf Intestine Alkaline Phosphatase", - fosfatasa alcalina de ternera (Promega), en una proporción de 0,01 u CIAP/pmol de extremos¹⁶ en 5 µl de tampón CIAP 10X tampón apropiado (Tris-HCl 50 mM pH 9,3, 1 mM MgCl₂, 0,1 mM ZnCl₂, 1 mM de espermidina) y agua desionizada hasta un volumen final de 50µl, durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente el plásmido desfosforilado se sometió a electroforesis en un gel de agarosa y se recuperó la banda de interés mediante fijación del ADN a una matriz de sílica, utilizando el "kit" de GeneClean, como se describe en el apartado 3.6.8.

3.6.11 Construcción de plásmidos recombinantes

La construcción de moléculas recombinantes se realizó mediante la combinación de fragmentos de ADN purificados, siendo uno de ellos siempre un vector plasmídico. Cuando los extremos del vector eran compatibles, éste se trató previamente con fosfatasa alcalina (CIAP, "Calf Intestine Alkaline Phosphatase, Boehringer/Promega) para eliminar los grupos fosfato del extremo 5' del fragmento y evitar la recircularización del mismo. Las reacciones de ligación se realizaron con ADN ligasa del fago T4. La mezcla de la ligación se utilizó para transformar directamente *E. coli*, y recuperar los plásmidos recombinantes.

Los tratamientos con las enzimas anteriores se llevaron a cabo siguiendo los protocolos habituales (Sambrook et al., 1989), y las recomendaciones de las casas comerciales suministradoras.

Las ligaciones se llevaron a cabo con una relación molar de 3:1 de inserto/vector. La cantidad de inserto en nanogramos necesario para la reacción de ligación se estimó según la ecuación (Sambrook et al., 1989; Promega, 2010):

$$\text{ng inserto} = \frac{\text{ng vector} \times \text{tamaño inserto (Kb)} \times \text{razón molar inserto /vector}}{\text{tamaño del vector (Kb)}}$$

3.6.12 Secuenciación de ADN

La secuenciación de los fragmentos de ADN obtenidos en este trabajo se llevó a cabo utilizando un secuenciador automático ABI prism 377™ (Departamento de Microbiología y Genética, Universidad de Salamanca), que realiza la separación electroforética y la

¹⁶ A 1 µg de ADN de 1000 pb corresponden 1,52 pmol ADN o 3,03 pmol de extremos. Por 1µg de una secuencia de 7500pb, se tendrían cerca de 25 pmol de extremos y se necesitaron cerca de 0,25 µl de CIAP a 1 u/µl.

detección de los fragmentos de ADN marcado con fluorescencia. Cuatro colores diferentes de fluorescencia identifican los cuatro dideoxinucleótidos incorporados en la reacción de extensión (A, G, T o C).

3.6.13 Reacciones de amplificación

3.6.13.1 Oligonucleótidos utilizados

Los oligonucleótidos empleados en este trabajo se adquirieron a las casas comerciales Isogen y Thermo. Las Tablas 12 y 13 son una recopilación de todos los oligonucleótidos usados en este trabajo para pesquisa de *lip1* y *lip2*, respectivamente. La Tabla 14 es una recopilación de los oligonucleótidos usados comúnmente en la pesquisa de ambos los genes.

3.6.13.2 PCR estándar

La reacción de amplificación con la enzima *Taq* polimerasa (conocida como "reacción en cadena de la polimerasa" o PCR) se realizó en un termociclador Biometra "Uno II" o en un termociclador "My cycler" de Bio-Rad.

En las reacciones de PCR estándar, las condiciones programadas fueron:

- Desnaturalización inicial del ADN molde a 94° C durante 1 a 2 minutos.
- 37 ciclos con los siguientes pasos:
 - desnaturalización (30 s a 1 minuto a 94° C).
 - anillamiento (30 s a 1 minuto a 57-64° C), dependiendo de las características de los cebadores utilizados en la PCR.
 - extensión (30 s hasta 2 minutos a 72° C).
- Extensión final (5 a 7 minutos a 72° C)
- Manutención de la reacción a 4° C, indefinidamente.

Dependiendo de la reacción, las condiciones fueron distintas. Se usaron 0,2 mM de cada oligonucleótido iniciador, 50-100 ng de ADN molde, 0,2 mM de cada dNTP y 1,5 unidades de *Taq* polimerasa (Promega o Thermo) en 50 µl de volumen total de solución tamponada.

El resultado de la PCR se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa. Cuando fue necesario, el ADN amplificado se purificó a partir de un gel de agarosa mediante "GeneClean kit", anteriormente descrito en el apartado 3.6.8.

3.6.13.3 PCR para marcaje de las sondas de ADN con digoxigenina

Las sondas utilizadas en el rastreo de genotecas de ADN y en la detección de genes con actividad lipásica fueron marcadas no radiactivamente, recurriendo al "kit" "PCR DIG Probe

MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 12 - Listado de las secuencias de oligonucleótidos usados en la caracterización de *lip1*.

Nombre	Secuencia	Tm (°C)	Página
lurdjo1	5'- CAG CTA TGT GGG CTG CAG TA -3' RV	59,4	85, 89
lurdjo6	5'- GTC CGA GGC GAA TGC GAC AT -3' RV	61,4	85, 89
lurdjo7	5'- ATG ATC GGT GTA CCA GAA GC -3' RV	57,3	85, 87
lurdjo8	5'- TAG AGG CAT ACC TTA CGC GC -3'D	59,4	85, 87
lurdjo9	5'- TCG CAG TTT GTC GTA GCG AA -3' RV	57,3	85, 88
lurdjo10	5'- ACT CCA CAA ATC TCA TCC AAG C -3' D	58,4	85, 87
lurdjo11	5'- GCT TCA AGA GGT CAA TTT GC -3' D	55,3	85, 87, 132
lurdjosuccess	5'- GCT GAT TCC AGG GCT ACG CT -3 D	61,4	85, 88
dir	5'- CTG GTG CAG ATG GTC CAA CCG T -3'D	64,0	94
nrev1	5'- ATG CTG GTG GTA GGC CAC TGG GAG T -3' RV	67,9	92, 93
nrev2	5'- GGA ACC GCT TGA AGC ATC CGA GGG CC -3' RV	71,1	92, 93, 132
nrev0a	5'- ATC CTA CTG GCG GCT GCG CGT AAG G -3' RV	68,2	92-95
nrev0b	5'- GAA TAG CGC AAG GCC ACG GTT GGA CC -3' RV	69,2	92-95
nrev0c	5'- TGT GAG GCT GAA CAT GGT GGA GCC G -3' RV	67,9	94, 95
nrev0d	5'- TCT GCC TCG GGT CAT GGC TAT CGC A -3' RV	67,9	94, 95
nrev0e	5'- GCA ACC GCG GTA CAA TGG CTT AGC GG -3' RV	69,5	94, 95
F52	5'- AGA CTA TAC GGG CCT GGG CTC -3' RV	63,7	85, 88, 91
F3	5'- ACC GAT CAT TTT TGT GGC GGC A -3' D	60,3	91, 126
R50	5'- TTG GAC CTG GGA CGC AGT GGC T -3' RV	65,8	85,87,91,126
EcoLip	5'- GGC GAA TTC ATG TTC AGC CTC AC -3' D	62,4	131
XhoLip	5'- TAC CTC GAG CTA AAT ATG TAG TGC CTG G -3' RV	65,1	131
gclcont	5'- TGC GAT AGC CAT GAC CCG AGG C -3' D		
PRSETblip1F	5' – GAG GTA CCA TGT TCA GCC TCA C – 3' D	62,1	126
PRSETblip1R	5 - GTC AAG CTT TGA ACT AAA TAT G - 3' RV	52,8	126
ORF Lip1 P32 fw	5' – ATG TTC AGC CTC ACA AC – 3' D	50,4	
ORF Lip1 P32 rev	5 – CTA AAT ATG TAG TGC CTG G - 3' RV	52,4	

Se indica el nombre utilizado como referencia, la secuencia en sentido 5'-3' y la página en la que aparece el experimento en el que fue utilizado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 13 - Listado de las secuencias de oligonucleótidos usados en la caracterización de *lip2*.

Nombre	Secuencia	Tm (°C)	Página
lurdjo2	5'- CTG CCA GAA CTC AAG GCA CT -3' D	59,4	90,91,100
lurdjo3	5'- ATC ATG AAT CGT TGC GCG AC -3' RV	57,3	90,91,100
lip2a	5'- CTG GCA GAA CCG ATT CCC GAG CGC TT -3' RV	69,5	98-99
lip2b	5'- ACG CAA CTA CGA TGG CGC CTT GCT CG -3' RV	69,5	98-99
lip2c	5'- TGC GAT GAA CCC ACA GCT ATC GCC GA -3' RV	68,0	98-99
lip2d	5'- GAG AAA GCC TGT ACT CCA CGT AGA GG -3' RV	68,0	98-99
lip2e	5'- GCA CAT CGT TC GAC GCT GCT GGT CC -3' RV	69,5	98,100
lip2f	5'- CTC GCC AGC GGT TAC ACC AAA GCT GC -3' RV	69,5	100
1279promo	5'-CAA ATT CGT TCG CTG GCG ATG A -3' RV	60,3	98,101
1279lip	5'- AGT TAG GAT CTG CGT CGC CGA C -3' RV	64,0	98,101

Se indica el nombre utilizado como referencia, la secuencia en sentido 5'-3' y la página en la que aparece el experimento en el que fue utilizado.

Tabla 14 – Listado de las secuencias de los oligonucleótidos de uso común utilizados en el desarrollo de este trabajo.

Nombre	Secuencia ¹⁷	Tm (°C)	Página
R1	5'- NGT CGA SWG AMA WGA A -3'	46,6	92-94,98-100
R2	5'- GTN CGA SWC ANA WGT T -3'	-	92-94,98-100
R3	5'- WGT GNA GWA NCA NAG A -3'	-	92-94,98-100
R4	5'- NCA GCT WSC TMT SCT T -3'	49,2	92-94,98-100
Act Th sense	5'- CGT GAC ATC AAG GAG AAG -3' D	53,7	72
Act Th antisense	5'- CAA GAC CAA GGA CAG AAG -3' RV	53,7	72
Act 7	5'- ACA GTG TTC CCA TCG GTC G -3' D	58,8	72
Act Pic R	5'- ACT CGT TGT AGA AGG TGT G -3' RV	54,5	72
Lip1 RTF	5'- AGG AAG ATG AAG GAA CTC -3'	51,4	72
Lip1 RTR	5'- CTG GTC TAC TGT CTC AAG -3'	53,7	72

N= (A/G/C/T); S= (G/C); W= (A/T); M= (A/C); Se indica el nombre utilizado como referencia, la secuencia en sentido 5'-3' y la página en la que aparece el experimento en el que fue utilizado.

¹⁷ N= (A/G/C/T); S= (G/C); W= (A/T); M= (A/C);

MATERIALES Y MÉTODOS

Synthesis Kit", de Roche. En este sistema, además de los desoxirribonucleótidos (dNTPs) utilizados en cualquier reacción de amplificación (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), se usa uno otro, el dUTP, marcado con digoxigenina (DIG-11-dUTP). Este se incorpora en las nuevas cadenas formadas durante el proceso de PCR, y puede ser detectado a través de un anticuerpo conjugado (Anti-DIG-AP), y de un sustrato quimioluminiscente que detecta la presencia de la enzima fosfatasa alcalina (CDP-star). En este caso se forma un compuesto intermedio que emite fluorescencia y la señal emitida puede ser registrada en una película de autorradiografía.

Los productos de PCR marcados se pueden obtener a partir de pequeñas cantidades de ADN (10-100 ng), y posteriormente ser usados como sondas. El dUTP marcado es alcalilábil, permitiendo su eliminación después de la detección, y por tanto una subsecuente reutilización de las membranas con otras sondas. Estas sondas de hibridación son muy sensibles y se adecuan a la detección de genes en copia única (Roche, 2008a).

En este caso, las **condiciones físicas** de PCR programadas fueron adaptadas de las descritas en el protocolo de la casa comercial suministradora (Roche, 2008a):

- Desnaturalización inicial del ADN molde a 95° C durante 2 minutos.
- 37 ciclos con los siguientes pasos:
 - desnaturalización (30 s a 95° C).
 - anillamiento (*lip1*: 30 s a 60,2° C; *lip2*: 30 s a 57,5° C)
 - extensión (1 minuto a 72° C).
- Extensión final (7 minutos a 72° C)
- Manutención de la reacción a 4° C, indefinidamente.

Condiciones químicas:

Una vez que los nucleótidos marcados con digoxigenina (DIG-dUTPs) pueden retrasar la actividad enzimática de la Taq polimerasa, y la su capacidad para polimerizar cadenas completas (Roche, 2008a), y que la eficiencia de amplificación puede depender del contenido de ADN usado como molde, se ensayaron dos concentraciones distintas de DIG-dUTPs en las reacciones de PCR (35µM y 70µM), siguiendo las recomendaciones de la casa comercial.

Se usó un volumen total de la reacción de 50 µl, 20-50 ng de ADN (de sonda limpia con geneclean), tampón de PCR 1X (1,5 mM MgCl₂), 0,1-1,0 µM de cada oligo¹⁸ y 0,75 µl de enzima Expand High Fidelity™ (105 U; 3,5 U/µl). Las concentraciones de dNTPs usadas fueron las siguientes:

¹⁸ F3 y R50, en la sonda usada para detección de *lip1*. Lurdjo2 y lurdjo3, en la sonda para detección de *lip2*.

- 70 μ M: mezcla de dATT, dCTP, dGTP (2 mM cada); 1,3 mM dTTP; 0,7 mM DIG-11-dUTP.
- 35 μ M: mezcla de dATT, dCTP, dGTP (2 mM cada); 1,65 mM dTTP; 0,35 mM DIG-11-dUTP.

En las reacciones se incluyeron un control negativo (sin ADN) y un control positivo (con ADN molde pero sin DIG-dUTP en la mezcla de nucleótidos). Este último sirve para evaluar la eficiencia del marcaje.

3.6.13.4 High-Efficiency Thermal Asymmetric Interlaced (HE-TAIL) PCR

Es una técnica de TAIL PCR (Michiels et al., 2003) que es una modificación de la TAIL PCR descrita por Liu & Whittier (1995). De acuerdo con los primeros autores es una técnica adecuada para determinar secuencias de ADN adyacentes a otras ya conocidas (para completar secuencias pequeñas de exones o de ESTs, o para identificar regiones del promotor), y permite la clonación de fases de lectura abierta completas sin necesidad de tener que recurrir al rastreo de genotecas de ADNc.

Se basa en el uso de oligonucleótidos específicos (de cerca de 26nt o más, con temperatura de anillamiento y estabilidad más elevadas), diseñados en la proximidad del extremo de la secuencia de ADN a completar, y de oligonucleótidos degenerados de 16nt, sujetos a un programa de ciclos térmicos en varias etapas, en que hay alternancia de ciclos de baja y elevada estringencia, que permiten la amplificación de las regiones que flanquean la secuencia de ADN conocida.

Los ciclos de PCR a temperaturas más elevadas favorecen el anillamiento de los oligonucleótidos específicos, mientras que los de temperaturas más bajas permiten el anillamiento de los dos tipos de oligonucleótidos. Además los oligonucleótidos específicos deberán tener una T_m superior a 70°C y un contenido GC de 40-50%.

Este método se utilizó para obtener las secuencias completas de los genes *lip1* y *lip2*. Se desarrolla en tres series de reacciones, en las que hay una única etapa combinada de anillamiento-extensión a 65°C, en las reacciones de PCR primaria y secundaria. En las Tablas 15 y 16 se muestran, respectivamente, las condiciones de HE-TAIL PCR y los oligonucleótidos usados para obtener las secuencias de los ORFs completas de los genes *lip1* y *lip2*, respectivamente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 15 – Reacciones, ciclos y condiciones de HE-TAIL PCR usados en la elucidación de *lip1*

Reacción	Número de ciclos	Condiciones térmicas programadas
Primaria	1	93 °C (1min); 95 °C (5min)
	5	94 °C (0,5min); 62 °C (1min) ; 72 °C (2,5min)
	1	94 °C (0,5min); 25 °C subindo gradualmente até 72 °C em 3min; 72 °C (2,5min)
	15	94 °C (20s) ; 65 °C (3,5min); 94 °C (20s) ; 65 °C (3,5min); 94 °C (0,5min); 42 °C (1min); 72 °C (2,5min)
	1	72 °C (5min); 4 °C. Pausa.
Secundaria	12	94 °C (20s) ; 65 °C (3,5min); 94 °C (20s) ; 65 °C (3,5min); 94 °C (0,5min); 42 °C (1min); 72 °C (2,5min)
	1	72 °C (5min); 4 °C. Pausa.
Terciaria	30	94 °C (0,5min); 44 °C (1min); 72 °C (2,5min)
	1	72 °C (5min); 4 °C. Pausa.

La reacción primaria de PCR se ejecutó en 15µl de volumen total con 80ng de ADN genómico; 0,2 µM del oligo **nrev2**; 2 µM de cada uno de los oligos degenerados (R1, R2, R3 o R4); 0,2mM de cada dNTP. La reacción secundaria se realizó con el oligo **nrev1** (0,2 µM) y el mismo oligo degenerado Ri (2 µM) usado en la reacción primaria. Se usó 1µl de la dilución 1:50 del producto de la PCR primaria como ADN molde. La reacción terciaria se llevó a cabo con 1 µl de la dilución 1:10 del producto de la PCR secundaria; 0,2 µM de los oligos **nrev0a** y **nrev0b**; 0,2 µM del oligo degenerado Ri; 0,2 mM de cada dNTP. En todas las reacciones de PCR se usó 1U de Taq ADN polimerasa (Promega) y tampón 10X de la enzima. Para excluir amplificaciones no específicas, se usaron controles de oligos degenerados R-R en las diversas reacciones.

Tabla 16 – Reacciones, ciclos y condiciones de HE-TAIL PCR usados en la elucidación de *lip2*.

Reacción	Número de ciclos	Condiciones térmicas programadas
Primaria	1	93° C (1min); 95° C (5min)
	5	94 °C (0,5min); 62 °C (1min) ; 72 °C (2,5min)
	1	94 °C (0,5min); 25 °C subindo gradualmente até 72 °C en 3min; 72 °C (2,5min)
	15	94 °C (20s) ; 66 °C (3,5min); 94 °C (20s) ; 66 °C (3,5min); 94 °C (0,5min); 42 °C (1min); 72 °C (2,5min)
	1	72 °C (5min); 4 °C. Pausa.
Secundaria	12	94 °C (20s) ; 65 °C (3,5min); 94 °C (20s) ; 65 °C (3,5min); 94 °C (0,5min); 42 °C (1min); 72 °C (2,5min)
	1	72 °C (5min); 4 °C. Pausa.
Terciaria	30	94 °C (0,5min); 42 °C (1min); 72 °C (2,5min)
	1	72 °C (5min); 4 °C. Pausa.

La reacción primaria de PCR fue ejecutada en 15µl de volume total con 80ng de ADN genómico; 0,2 µM del oligo **lip2a**; 2 µM de cada uno de los oligos degenerados (R1,R2,R3 ou R4); 0,2mM de cada dNTP. La reacción secundaria fue ejecutada con el oligo **lip2b** (0,2 µM) y el mismo oligo degenerado Ri (2 µM) usado en la reacción primaria. Se usó 1µl de la dilución 1:50 del produto de la PCR primaria como ADN molde. La reacción terciaria fue ejecutada con 1 µl de la dilución 1:10 del produto de la PCR secundaria; 0,2 µM de los oligos **lip2c** e **lip2b**; 0,2 µM del oligo degenerado Ri; 0,2 mM de cada dNTP. En todas las reacciones de PCR se usó 1U de Taq ADN polimerasa (Promega) y tampon 10X de la enzima. Para excluir amplificaciones no específicas, fueron usados controles de oligos degenerados R-R en las diversas reacciones.

3.6.13.5 PCR a tiempo real (RT- qPCR)

Esta técnica se usó en el estudio de la expresión del gen *lip1*, tanto homóloga (en *T. harzianum*) como heteróloga (en *P. pastoris* GS115 transformada con el gen *lip1*).

En RT-qPCR el uso de reporteros fluorescentes permite la detección de productos de amplificación al final de cada ciclo de PCR, permitiendo el análisis de la cinética de la reacción. La fluorescencia emitida es proporcional a la cantidad de producto formado. Los datos pueden ser analizados mediante un software informático y la expresión génica relativa entre varias muestras puede calcularse (Heid et al., 1996).

Para la ejecución de las reacciones de RT-qPCR, las muestras de ARN de *T. harzianum* (y de los transformantes de *P. pastoris* con el gen *lip1* inserto) se trataron con DNAsa exenta de RNAsa, de acuerdo con las instrucciones del kit RNase-free DNase de Qiagen®, y se cuantificaron en espectrofotómetro. Además se determinaron los ratios A260/A280nm y A260/A230nm para evaluar la pureza de las mismas, y se corrieron en gel de electroforesis para evaluar la integridad del ARN total, una vez que el uso de muestras de ARN parcialmente degradadas pueden llevar a resultados incorrectos y no reproducibles (Fleige & Pfaffl, 2006; Gingrich et al., 2008).

La síntesis de ADN complementario (ADNc) se hizo con la transcriptasa inversa del virus de leucemia murina (MMLV) del “iScript Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR” de Bio-Rad, de acuerdo con las condiciones descritas en la Tabla 17. En la reacción se usaron 2 µg de ARN en 20 µl de volumen total.

En RT-qPCR se usó el “iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix” kit, de Bio-Rad, que utiliza el fluorocromo no específico SYBR-Green I, que emite fluorescencia al unirse a ADN

Tabla 17 – Etapas y ciclos usados en la síntesis de ADNc.

Reacción	Número de ciclos	Condiciones térmicas programadas
Anillamiento	1	25 °C (5min)
Transcripción reversa”	1	42 °C (60min)
Inactivación de la enzima	1	85 °C (5min); 4 °C. Pausa.

La reacción fue ejecutada con 2µg de ARN total de *T. harzianum* y 4 µl 5X iScript Reverse Transcriptase Supermix for RT-qPCR, en 20µl de volumen total.

MATERIALES Y MÉTODOS

de doble cadena. En *T. harzianum* se hicieron tres réplicas por muestra¹⁹ y gen endógeno (β -actina), con normalización frente al endógeno, de acuerdo con lo propuesto por Taylor et al. (2010). Para los transformantes en *P. pastoris* se usó la cepa GS115 con el plásmido linearizado (GS115-pIB2 linKpn2I) como control. Se hicieron tres réplicas por muestra. Se incluyeron dos controles por reacción (NTC – “no template control”, tubo control sin ADNc; NRT – “no reverse transcriptase”) y se realizaron curvas de disociación o desnaturalización (“Melt-curve”) para la discriminación de productos inespecíficos que podrían incrementar los valores de fluorescencia obtenidos durante la reacción. Las condiciones físicas y químicas usadas se describen en Tabla 18. Se usó un termociclador “Mini Opticon Real-Time PCR system MJ Mini”, de Bio-Rad, que lleva incorporado un sistema de tratamiento de los datos obtenidos.

Tabla 18 – Etapas y ciclos usados en RT-qPCR.

Reacción	Número de ciclos	Condiciones térmicas programadas
Activación enzimática	1	95° C (30s);
Desnaturalización	40	95°C (15s);
Anillamiento	40	Tm 52°C (30s)
Extensión/Lectura	40	60°C (30s);
Melting Curve/Lectura	1	65-95 °C (con incremento de 0,5°C/“step”) 4 °C. Pausa.

En *T. harzianum* la reacción fue ejecutada en 20 μ l de volumen total con 2 μ l de una dilución 1:6 de ADNc de cada muestra, y se usaron los oligos **act Th sense**, **act Th antisense**, **lip1 RTF**, **lip 1RTR** a 0,5 μ M y 10 μ l 2X iTaq Universal SYBR Green Supermix. En *P. pastoris* se usaron los oligos **act PicF**, **act PicR**, **lip1 RTF** y **lip 1RTR** a 0,15 μ M y 2 μ l de distintas diluciones de ADNc de GS115-pLJ4 (1:5) y de GS115-pIB2linKpn2I (1:30), en 20 μ l de volumen total. Se usó una Tm de 52,6°C para las reacciones con **act PicF/act PicR**, y de **lip1 RTF/lip 1RTR**, y 25s para el anillamiento. En *T. harzianum* se usó una Tm de 53,0°C para las reacciones con **act Th sense/act Th antisense**, y de 51,6°C para las de **lip1 RTF/lip1 RTR**.

3.6.14 Hibridación de ácidos nucleicos

3.6.14.1 Preparación de sondas marcadas con digoxigenina

El marcaje de sondas utilizó el “kit” “PCR DIG Probe Synthesis Kit”, siguiendo las indicaciones dadas por el proveedor (Roche). Para el marcaje de la sonda se empleó DIG-

¹⁹ A las 6, 24, 48, 72 e 96 horas después inducción en medio con aceite de soja al 2%.

dUTP, añadido como reactivo para PCR (3.6.13.3). Se verificaron los productos de las DIG-PCRs en geles de agarosa para confirmación de los productos de amplificación.

Posteriormente, para ensayar la eficiencia del marcaje, se efectuó un "Dot blot". Para ello, se distribuyeron 10µl de los productos de DIG-PCR (marcados) y el ADN control, no marcado, en una membrana de nilón (Amersham Biosciences) con distintas diluciones: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} . Se les añadió un anticuerpo, el conjugado anti-DIG-AP (Roche, 2005), que contiene fosfatasa alcalina. Para visualizar la reacción se recurrió a CDP-Star, un sustrato quimioluminiscente que detecta la fosfatasa alcalina y sus conjugados (Roche, 2007). La fosfatasa alcalina es capaz de desfosforilar este sustrato produciendo un compuesto intermedio inestable que libera luz. Su señal emite fluorescencia, que puede ser registrada en una película de autorradiografía recurriendo a sistemas de imagen adecuados después de algunos minutos de contacto entre la película y la membrana. Para ello se recurrió a un equipo revelador de películas, Fujifilm FPM-100, y a películas Fuji Film Super RX.

3.6.14.2 Detección de secuencias de ADN específicas (Southern Blot).

La técnica de "Southern Blot" fue usada en tres situaciones distintas:

- En el rastreo de una genoteca de ADN genómico de *T. harzianum* T34 clonada en el fago λGEM-11.
- En la detección del gen *lip1* en ADN genómico de *T. harzianum*.
- En la detección de genes análogos a *lip1* en ADN genómico de *T. atroviride*, *T. virens* y *T. reesei*.

Detección de clones positivos a partir de genotecas

○ Preparación de los medios y infección

Para analizar clones de genotecas, se preparó un cultivo de *E. coli* LE392 en placa de LB y se mantuvo a 37°C durante toda la noche. A partir de una única colonia de esa placa se inició un nuevo crecimiento en 50 ml de LB líquido suplementado con maltosa al 0,2% y MgSO₄ 10 mM, hasta alcanzar una D.O. de 0,8-1,0 a 600 nm. Las células se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos, y se resuspendió el "pellet" en 25 ml de una solución de MgSO₄ 10 mM. Se midió la densidad óptica de la suspensión y se diluyó con la misma solución hasta alcanzar un valor de D.O. de 0,5.

Conocido el título de la genoteca de ADNc, se añadió la cantidad adecuada a 800 µl de la suspensión de células de *E. coli* LE392 (D.O. de 0,5), para obtener cerca de 15000 halos de lisis por placa Petri de 150 mm. En este caso, el título de la genoteca fue de

MATERIALES Y MÉTODOS

aproximadamente $2,2 \times 10^5$ halos de lisis/ μl , de los que se añadieron 4 μl . Los eppendorf con el fago y las células huéspedes se incubaron durante 15 minutos a 37°C para permitir la ligación del fago a las células.

Se mezcló cada alícuota de la bacteria infectada con 6,5ml de NZY "top agar" a 49°C . La mezcla se colocó en una placa de NZY "bottom agar" previamente calentada a 37°C , y homogéneamente distribuida. Se procedió a la incubación de las placas a 37°C , en posición invertida, durante cerca de 10 horas (tiempo que varió dependiendo del aspecto de las células lisadas en la superficie de la placa, hasta conseguir un aspecto de césped).

○ **“Plaque lifts”**

Se hicieron réplicas de los crecimientos de cada placa en membranas de nilón (Amersham) en duplicado. Para ello, las membranas se cortaron para que se ajustasen al interior de las placas y se colocaron en contacto con su parte interna, para que se diese la transferencia de las partículas del fago a las membranas. La primera membrana estuvo en contacto con las partículas del fago 5 minutos, la segunda durante 10 minutos, Las dos membranas fueron hibridadas, los duplicados ayudan a distinguir las señales positivas de las de fondo. Además, las dos membranas se marcaron de forma distinta para facilitar la posterior localización de las señales positivas en las placas. En cada una se efectuaron tres agujeros en posición asimétrica, y se marcó su correspondiente posición en el fondo de la placa con un bolígrafo, correspondiendo un color a la posición de los agujeros en la primera membrana, y otro a de los de la segunda.

Las colonias transferidas a las membranas se lisaron mediante sucesivas incubaciones de 5 minutos de los filtros sobre papel Whatman 3MM, saturado con las siguientes soluciones:

- Solución de desnaturalización (0,5M NaOH, 1,5M NaCl)
- Solución de neutralización (1,5M NaCl, 0,5M Tris-HCl pH 8,0)

Posteriormente se procedió al lavado de las membranas durante 30 segundos sobre papel Whatman 3MM, saturado con una solución tamponada (2X SSC, 0,2M Tris-HCl, pH 7,5) y a su secado.

El ADN se fijó por radiación UV (120000 μJ durante 30 s) mediante el equipo Stratalinker® 2400 UV crosslinker, de Stratagene.

○ **Hibridación y detección**

Se utilizó el protocolo de hibridación recomendado por la casa comercial, seguido de un sistema de detección que utiliza anticuerpos anti-digoxigenina conjugados con fosfatasa alcalina.

MATERIALES Y MÉTODOS

La prehibridación se llevó a cabo durante 2 horas a 65°C con 30 ml de una solución tamponada conteniendo 5% (p/v) de SSC; 0,02% (p/v) de SDS; 0,1%(p/v) de N-lauroil sarcosina y 1X de reactivo de bloqueo (hidrolizado de caseína). Se utilizó un horno de hibridación con árbol rotatorio sobre el que se clava el contenedor cilíndrico en el que se realizaron las reacciones de prehibridación e hibridación.

La hibridación se realizó añadiendo 10µl de la sonda marcada con digoxigenina y desnaturalizada (por calentamiento a 100°C durante 10 minutos, seguido de "snap cool" en hielo) en 15ml de la mezcla de prehibridación e incubando posteriormente a 65°C durante al menos 6 horas.

Después de la hibridación, las membranas se lavaron 2 veces con 2X SSC/SDS 0,1% durante 5 minutos con agitación a temperatura ambiente, y 2 veces con 0,1X SSC/SDS 0,1% durante 15 minutos a 65°C.

La inmunodetección utilizó $C_{18}H_{19}Cl_2O_7PNa_2$ del "kit" CDP-Star™(Roche, 2007) como sustrato quimioluminiscente. La señal emitida fue registrada en una película de autorradiografía. El tratamiento de las membranas para la inmunodetección se llevó a cabo siguiendo las recomendaciones especificadas por lo suministrador comercial (Roche, 2008b). Para ello se prepararon los siguientes reactivos:

- Tampón 1 (tampón de ácido maleico): ácido maleico 0,1M, NaCl 0,15M, ajustado a pH 7,5.
- Tampón de lavado: mezcla de tampón 1 con Tween 20® al 0,3% (v/v).
- Solución "stock" de bloqueo (10x): Reactivo de bloqueo al 10% (p/v) en tampón de ácido maleico.
- Tampón 2 (solución de bloqueo): dilución de la solución "stock" de bloqueo a 1:10 en tampón 1.
- Tampón 3 (tampón de detección): Tris-HCl 0,1M, NaCl 0,1M, pH 9,5.

Las membranas se lavaron con tampón de lavado durante 1-5 minutos, seguidamente se incubaron durante 30 minutos en 100 ml de tampón 2. Se retiraron 50 ml de los 100 ml iniciales, y se añadieron 2,5 µl de solución de anticuerpos – conjugado anti-digoxigenina-AP (1:20000 o 37,5 mU/ml) (Roche, 2005). Se incubó 30 minutos. En seguida las membranas se lavaron en tampón de lavado durante 15 minutos, dos veces, y se equilibraron en tampón 3 durante 2-5 minutos. Se diluyeron 30µl de CDP-Star (25mM) en 3ml de tampón 3, se puso cada mitad de la mezcla en el centro de cada una de las membranas (el original y el duplicado) envueltas en papel celofán, y se incubó durante 5 minutos en la oscuridad. Todos

los pasos anteriores, con excepción del último transcurrieron con las membranas en el interior de un tablero sujeto a agitación.

Para el revelado, la cara de la membrana que estuvo en contacto con las partículas del fago quedó en contacto con la película fotográfica durante 15 segundos a 5 minutos, dependiendo de la intensidad de la señal pretendida.

La presencia de los fragmentos que hibridaron específicamente con la sonda se visualizó por la impresión que produjo la fluorescencia emitida por la sonda en una película Fuji Film Super RX.

o Selección

Cuando se detectaron señales positivas, se hicieron coincidir las películas y las placas de Petri para determinar la localización. Con la punta más larga de una pipeta de vidrio se retiraron las porciones de agar correspondientes a las señales y se transfirieron cada una de ellas a un eppendorf con 1 ml de tampón SM (NaCl al 0,58%, MgSO₄·7H₂O al 0,2%; Tris-HCl 1 M (pH 7,5) al 5% (v/v); 0,5% de gelatina al 2% (p/v)). Se incubó a 37°C durante al menos 8 horas. En cada porción había una mezcla de fagos y se pretendía obtener un fago aislado, por lo que hubo que hacer nuevos crecimientos en placa e hibridar. En esta fase se usaron placas de 90mm, y se hicieron diluciones del tampón SM con fago a 1:100 (infectando cada placa con 1 µl) o a 1:500 (infectando cada placa con 4 o 5 µl). Estas cantidades dependieron del título del fago y hubo que ensayar diferentes diluciones para obtener colonias aisladas. Las placas se prepararon con NZY "bottom agar" y se usaron 200 µl de *E. coli* LE392 (D.O. de 0,5) infectada con el fago para 3,5 ml de NZY "top agar". Se incubó a 37°C durante 10 horas y se siguieron los restantes pasos anteriormente descritos.

Detección del gen *lip1* en ADN genómico de *T. harzianum*

Las hibridaciones ADN-ADN se realizaron mediante el protocolo descrito por Roche (2008b).

Así, después de digerir el ADN genómico (2-5 µg) con las enzimas de restricción adecuadas, los fragmentos se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%.

Antes de hacer la transferencia de ADN, el gel se pasó de manera secuencial por las siguientes soluciones:

- Solución de desnaturalización (0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl): dos veces 15 minutos, seguido de lavados con agua.

- Solución de neutralización (0,5 M Tris-HCl pH 7,5; 1,5 M NaCl): dos veces 15 minutos.

MATERIALES Y MÉTODOS

- 20XSSC (3 M NaCl, citrato trisódico 0,3 M pH 7,0) durante 20 minutos, para equilibrarlo.

El ADN se transfirió por capilaridad durante al menos 16 horas a membranas de nilón (Hybond-N+™, Amersham Life Sciences), empleando 20XSSC. El ADN se fijó a la membrana mediante exposición a luz ultravioleta en un transiluminador durante 1 minuto.

Una vez fijado el ADN a la membrana, se iniciaba la hibridación con una sonda de ADN marcada por DIG-PCR (como se indica en el apartado 3.6.14 1).

La prehibridación se llevó a cabo durante 2 horas a 42°C en una solución tamponada conteniendo 50% formamida desionizada, 5% SSC; 0,02% de SDS; 0,1% (p/v) de N-lauroil sarcosina y 2% de reactivo de bloqueo, en un horno de hibridación. La hibridación se realizó añadiendo la sonda marcada con digoxigenina y desnaturalizada en 15 ml de la mezcla de prehibridación e incubando posteriormente a 42°C durante al menos 16 horas.

Después de la hibridación, las membranas se lavaron 2 veces con 2X SSC; 0,1% SDS durante 5 minutos con agitación a la temperatura ambiente, y 2 veces con 0,1X SSC; 0,1% SDS durante 15 minutos a 68°C.

Tanto la preparación de la solución de anticuerpos anti-digoxigenina-AP como las condiciones de inmunodetección fueron análogas a las ya descritas en el rastreo de genotecas.

Detección de genes análogos a *lip1* en ADN genómico de *T. atroviride*, *T. virens*, y *T. reesei*.

En este caso, el gel en el que se corrieron las muestras se pasó en solución de depurinación (0,25 M HCl) durante varios minutos antes de la transferencia a la membrana.

Se siguió el proceso descrito anteriormente para la detección de *lip1* en *T. harzianum*, pero se bajaron las temperaturas usadas durante las etapas de prehibridación y hibridación para los 39°C. También se usó como temperatura de lavado de alta estringencia los 65°C (y no los 68°C), y se disminuyó la estringencia de la solución usada en ese lavado (0,5X SSC; 0,1% SDS).

3.7 MÉTODOS DE TRANSFORMACIÓN

3.7.1 Transformación de *E. coli* con plásmidos replicativos

La transformación se basó en el choque térmico. Se utilizaron células supercompetentes de *E. coli* DH5α. Se usó el siguiente protocolo:

MATERIALES Y MÉTODOS

- Las células competentes de *E. coli* fueron descongeladas en hielo.
- Sobre 90-95 μl de células competentes de *E. coli* se colocaron 5-10 μl de la mezcla de ligación, para un volumen total de 100 μl .
- Las células se mantuvieron en hielo durante 20 minutos.
- Las células se sometieron a choque térmico: 42°C durante 90 segundos e inmediatamente fueron colocadas en hielo durante 2 minutos.
- Las células se mantuvieron a temperatura ambiente y se les añadió 400 μl de medio LB líquido sin ampicilina.
- Se agitó un poco, y se puso en un baño a 37°C durante 50-60 minutos, con agitación de 10 en 10 minutos.
- Se prepararon alícuotas de 250, 150 y 100 μl en placas de LB con ampicilina, a las cuáles se había añadido 100 μl de IPTG y 50 μl de X-Gal.
- Las placas se incubaron durante 24 h a 37°C.
- Se procedió a choques térmicos de 4°C durante 30 minutos, seguidos de incubación a 37°C.
- Tras 24 horas, las colonias blancas se transfirieron a nuevas placas de LB con ampicilina.

3.7.2 Transformación de *P. pastoris* con plásmidos integrativos.

La transformación de *Pichia pastoris* GS115 se hizo por electroporación. Este método no requiere la generación y el mantenimiento de los esferoplastos, lo que lo hace un método muy conveniente para generar los transformantes de *Pichia*. Según las referencias bibliográficas es el método que mejor está funcionando en *P. pastoris*, una levadura que tiene por norma presentar menores eficiencias de transformación.

Se utilizó el siguiente protocolo adaptado, basado en los protocolos de electroporación de Invitrogen (2002) y de Eppendorf (2004), y en los descritos por Wu & Letchworth III (2004) y Papagianni et al. (2007), que proponen un tratamiento previo de las células con acetato o cloruro de litio y DTT para aumentar la permeabilización de las paredes celulares, facilitando la integración de ADN ajeno.

3.7.2.1 Preparación de células (obtención de células electrocompetentes)

- Se sembró la cepa de *P. pastoris* en una placa de YPD, para conseguir colonias aisladas. Se incubó la placa a 30°C durante 2 días.

MATERIALES Y MÉTODOS

- Se inocularon 10ml de YPD en un tubo falcon de 50 ml con una sola colonia de *Pichia*, se creció a 30°C con agitación durante la noche, hasta una D.O. de aproximadamente 3,0 a 600 nm.
- Se inocularon 500 ml de medio YPD fresco en un frasco de 2 litros con 0,1-0,5 ml del cultivo anterior (para obtener una D.O. inicial de aproximadamente 0,005 a 600 nm). De nuevo se creció durante la noche hasta una D.O. de aproximadamente 1,3-1,5 a 600 nm.
- Se centrifugaron las células a 1500 x g durante 5 minutos a 4°C. Se resuspendió el pellet en 25 ml de una solución 100 mM de cloruro de litio, 10 mM DTT, 0,6 M de sacarosa (estabilizador osmótico) y 10 mM de Tris-HCl, pH 7,5. El tratamiento se llevó a cabo durante 30 minutos, con agitación suave, antes del lavado de las células, para permeabilizar la pared celular.
- Se centrifugaron las células a 1500 x g durante 5 minutos a 4°C, y se resuspendió de nuevo el pellet en 500 ml de agua helada desionizada, estéril.
- Se centrifugaron las células como en el paso anterior, después se resuspendió de nuevo el pellet en 250 ml de agua helada desionizada, estéril.
- Se centrifugaron las células como en el paso anterior, después se resuspendió de nuevo el pellet en 20 ml de sorbitol 1 M helado, en un tubo falcon de 50 ml.
- Se centrifugaron las células como en el paso anterior, después se resuspendió de nuevo el pellet en 1 ml de sorbitol 1 M helado para un volumen final de aproximadamente 1,5 ml.

3.7.2.2 Electroporación de células

- Se mezclaron suavemente 80 µl de células electrocompetentes con el ADN linearizado del plásmido pIB2-*lip1* (en 5-10 µl de agua desionizada estéril) y se transfirió la mezcla a una cubeta del electroporador de 0,2 cm de boquete, helada. Se incubó en el hielo por 5 minutos.
- Se pulsaron las células, según los parámetros para la levadura sugeridas por el fabricante del dispositivo específico de electroporación (Electroporador 2510, de Eppendorf), que están de acuerdo con las referencias de *Pichia* en la bibliografía (1500 V, 5 ms). Se usó 1µg de pIB2-*lip1* y células eletrocompetentes de *P. pastoris* GS115, a 1500mV, 200mF e 50Ω.
- Se añadió inmediatamente 1 ml de sorbitol 1 M helado a la cubeta y se incubó 2 horas a 30° C sin agitación.

MATERIALES Y MÉTODOS

- Se transfirió el contenido de la cubeta a un tubo estéril de 15 ml. Se añadió 1 ml de YPD, y se incubó 2-3 horas a 30° C con agitación.
- Se prepararon alícuotas de 10, 25, 50, 100 e 200 µl en placas de RDB.
- Se incubaron las placas a 30° C hasta que aparecieron colonias (3-4 días).

3.8 ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

3.8.1 Obtención de extractos celulares

Para la obtención de extractos celulares de levaduras se usó el protocolo de Invitrogen (2002): se recogieron las células procedentes de 5-10 ml de cultivo mediante centrifugación y se lavaron con agua destilada. Por cada mililitro de muestra se resuspendieron las células en 100 µl de tampón de lisis (50 mM fosfato de sodio monobásico, pH 7,4; 1 mM PMSF - fenil-metil-sulfonil-fluoruro; 1 mM EDTA; 5% glicerol), y se les añadió igual volumen de perlas de vidrio estériles de 0,45-0,50 µm de diámetro ("ballotini"). La ruptura se realizó mediante ciclos de 30 s de agitación en vórtex, seguidos de igual período de reposo en hielo. La ruptura se corroboró mediante observación al microscopio óptico. Una vez rotas las células, se eliminaron los "ballotini" por decantación, y se separaron los restos celulares de los extractos mediante centrifugación en eppendorf a 13200 rpm durante 15 minutos a 4°C. Se transfirieron los extractos celulares a un tubo limpio y se congelaron a -70°C. En alternativa, algunas veces se rompieron células recurriendo al uso de nitrógeno líquido.

3.8.2 Obtención de extractos proteicos en sobrenadante de cultivo

Para obtención de extractos proteicos del sobrenadante de cultivo se recogió el sobrenadante de 100ml de cultivo de levaduras crecido cerca de 18h, aislándolo de las células por centrifugación en un tubo falcon, y se concentró en membrana de celulosa con límite de exclusión de 30 KDa Millipore (Amicon Ultra-15) a 5000 rpm y a 4°C, en centrifuga Eppendorf 5804R con rotor fijo. Por último se lavó el sobrenadante concentrado resultante con tampón fosfato 50 mM pH 7,0 o Tris HCl pH7,4, se pasó a un tubo limpio y se congeló a -70°C en alícuotas de 100µl o se procesó de inmediato para la valoración de actividades lipásicas.

3.8.3 Valoración de proteínas

El contenido de proteína total presente en las muestras se determinó mediante la técnica colorimétrica descrita por Bradford (1976). Para realizar la recta patrón absorbancia/µg de proteína se emplearon distintas diluciones de seroalbúmina bovina. Teniendo en cuenta los

volúmenes de muestra usados en cada caso y teniendo en cuenta la dilución realizada, calculóse la concentración de proteínas en la muestra analizada.

3.8.4 Separación de proteínas en geles de poliacrilamida

Las muestras para electroforesis se prepararon mezclando extractos de proteínas con tampón de muestra 2X Fluka®, diluyendo convenientemente con agua hasta una concentración final de tampón 1X. En estas condiciones se calentaron 5 minutos a 95° C y se depositaron las muestras en los pocillos.

La separación de proteínas se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (12% acrilamida: bisacrilamida 29:1) con SDS al 1%, según el protocolo descrito por Laemmli (1970), usando geles de apilamiento (pH 6,8) y de resolución (pH 8,8) al 4% y 12% de poliacrilamida, respectivamente. Para la electroforesis se emplearon cubetas de tipo “Mini Protean I” de Bio-Rad, siguiendo las recomendaciones del fabricante. El tampón utilizado contenía 0,3% Tris, 14% glicina y 0,1% SDS. Se aplicó una intensidad de corriente constante de 30 mA durante 1-2h. Se usaron marcadores de distintos comerciales.

3.8.5 Tinción de proteínas

La tinción se realizó por inmersión del gel de poliacrilamida en una solución de “Coomassie Brilliant Blue” R-250 al 0,25 % (p/v) en una mezcla de 90ml de metanol/agua (1/1) y 10 ml de ácido acético glacial durante 15-30 minutos, después de los cuales el exceso de colorante se eliminó sumergiendo el gel en una solución diluida de metanol/ácido acético glacial (250 ml metanol y 70 ml de ácido acético glacial hasta un volumen total de 1 l con agua), sin colorante.

3.8.6 Valoración de la actividad enzimática por espectrofotometría

En esto caso los extractos proteicos de células de levaduras se obtuvieron por ruptura con nitrógeno líquido y mortero. Se resuspendieron 300µl de células en 1000µl de tampón de ruptura y 100µl de PMSF 10mM, se agitaron y centrifugaron 15 minutos a 4°C a 13200rpm. Se recogió el sobrenadante de ruptura a un tubo limpio.

Los sobrenadantes se obtuvieron a partir del crecimiento del clon pLJ4 y de *P. pastoris* GS115-linKpn2l durante cerca de 18h en 100ml de MD para una D.O. inicial de 0,005. Las células se recogieron por centrifugación en una centrífuga Eppendorf 5804R.

3.8.6.1 En *p*-nitrofenil butirato

Como sustrato de reacción se utilizó *p*-nitrofenil butirato (Sigma), un sustrato cromogénico que por hidrólisis origina *p*-nitrofenol, de coloración amarilla, y ácido butírico. Se mezclaron

MATERIALES Y MÉTODOS

7,2 μ l del mismo²⁰ con 96 ml de tampón Tris-HCl 50 mM pH 7,4 y 4 ml de acetona como agente dispersante, o sea se usó una emulsión de pNPB 0,41mM.

La valoración espectrofotométrica se realizó de la siguiente manera:

- Se añadieron 2,4 ml de emulsión con el sustrato en una cubeta de cuarzo de 10 mm de paso para medidas espectrofotométricas de luz visible.
- Se termostató a 37 °C durante 10 minutos, manteniendo agitación constante con la ayuda de un microagitador magnético de 2 mm (Helma Cuv-O-Stir 333). Se hizo un blanco sustituyendo la muestra de extractos celulares de levadura por 100 μ l del tampón de lisis en el que se obtuvieron las muestras, o de sobrenadante de cultivo.
- Para medición de actividad en las muestras, a tiempo cero se añadieron 100 μ l de la muestra a analizar a los 2,4 ml de emulsión con el sustrato.
- La curva cinética se siguió en continuo durante cerca de 15 minutos, registrando la absorbancia a 410 nm en un espectrofotómetro ScanSource UV-Vis, de ScanSci.
- La velocidad inicial de la reacción se calculó automáticamente en cada caso, mediante el programa de tratamiento de datos cinéticos que lleva incorporado el espectrofotómetro.

3.8.6.2 En *p*-nitrofenil palmitato

Se usó un protocolo adaptado de Mahadik et al. (2002). Para ello se prepararon dos soluciones. La solución A se obtuvo mezclando 40mg de *p*-nitrofenil palmitato (pNPP) en 12 ml de isopropanol, la B se preparó en agua destilada con 0,1% de goma arábica (p/v) y 0,4% de Triton-X. Se hizo una emulsión a una razón de 1:19 de solución A y B, respectivamente, y se efectuó una dilución a 1:10 con agua. Esta emulsión primero se sometió a agitación en un agitador magnético y después a ultrasonificación durante 10 minutos.

- Se añadieron en una cubeta de cuarzo de 10 mm, 2,0 ml de emulsión con pNPP y 0,25 ml de tampón fosfato 0,5 M. Se termostató a 25 °C durante 10 minutos, manteniendo agitación constante con la ayuda de un microagitador magnético de 2 mm (Helma Cuv-O-Stir 333).
- A tiempo cero se añadieron 250 μ l de la muestra a analizar.
- La curva cinética se siguió en continuo durante 15 minutos, registrando la absorbancia a 410 nm en un espectrofotómetro ScanSource UV-Vis, de ScanSci. La velocidad de reacción se calculó como en el caso anterior. El blanco se hizo con 250 μ l de tampón fosfato 50 mM.

²⁰ El *p*-nitrofenil butirato tiene una masa volúmica de 1,19g/ml y un peso molecular M=209,2g.

3.9 MICROSCOPIA

La observación de los microorganismos y el recuento de esporas se realizaron en un microscopio óptico Leica CME.

3.10 ANÁLISIS MEDIANTE TRATAMIENTO INFORMÁTICO DE LOS DATOS

3.10.1 Análisis informática de las secuencias de ADN y proteína

El análisis de las secuencias de ADN y de las secuencias de aminoácidos derivadas a partir de la región codificante de los genes correspondientes se realizó mediante programas informáticos locales o por acceso a servidores en Internet.

Para la edición detallada de las secuencias se utilizó el programa BioEdit, cuya versión 7.2.5 puede ser descargada en <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/page2.html>, mientras que para su comparación y anillamiento se utilizó también el programa Sequencher, de Gene Codes Corporation (copia de demostración de la versión 5.2.4, la actual puede ser descargada en www.genecodes.com).

Para diseño y análisis de oligonucleótidos se usó el programa Fast PCR, cuya versión 6.5.43 se puede descargar en <http://primerdigital.com/fastpcr.html>, o se consultaron las páginas web de Premier Biosoft (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/>) y de Integrated DNA Technologies (<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>).

Para limpiar las secuencias nucleotídicas de las ESTs de los fragmentos del vector pBluescript KS+ se utilizaron los programas VecScreen (NCBI) o EMVEC (EBI), que pueden ser accedidos respectivamente en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/vecscreen/>, y <http://ebi.edu.au/tools/ncbi-blast-emvec-database-query>.

Se accedió al European Bioinformatics Institute siempre que fue necesario obtener datos de alguna secuencia registrada en las bases de datos de ADN (EMBL) o proteína (Swiss-Prot o UniProt) en <http://www.ebi.ac.uk/services> y <http://www.ebi.ac.uk/services/proteins>. En este servidor se llevaron a cabo comparaciones de secuencias de ADN mediante el algoritmo implantado (Pearson, 1988) en el programa FASTA, así como las predicciones de la estructura secundaria de las proteínas. También en este servidor se efectuó un registro “en línea” de las secuencias de ADN de los genes *lip1* y *lip2* de *T. harzianum*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las comparaciones de secuencias usando las diferentes variantes del algoritmo BLAST (BLASTN, BLASTX, BLASTP) (Altschul et al., 1997) se llevaron a cabo en la página <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

Los esquemas de las construcciones plasmídicas y la edición gráfica de secuencias nucleotídicas se realizaron mediante el programa Ape – A plasmid Editor (versión 2.0.47), que puede descargarse en <http://biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/>, o Serial Cloner versión 2.6.1, que puede descargarse en http://serialbasics.free.fr/Serial_Cloner-Download.html.

La búsqueda de intrones se ejecutó en la aplicación AUGUSTUS, que puede ser accedida en <http://bioinf.uni-greifswald.de/augustus>.

La detección de factores de transcripción se llevó a cabo en la aplicación Genebuilder de Webgene (<http://www.itb.cnr.it/webgene/>).

El estudio de las características fisicoquímicas de las proteínas, tales como puntos isoeléctricos y la predicción de sitios de procesamiento del péptido señal u otros sitios de procesamiento típicos, así como las predicciones de las estructuras secundarias se realizaron en PROSITE <http://prosite.expasy.org/scanprosite/>, en el sistema de redes neurales del "Pôle BioInformatique Lyonnais/Network Protein Sequence Analysis" (<http://npsa-pbil.ibcp.fr>) o en la aplicación DiANNA 1.1 (<http://clavius.bc.edu/~clotelab/DiANNA/>). Se han consultado distintos sitios para la predicción de modificaciones postraduccionales en la página web del Center of Biological Sequence Analysis (<http://www.cbs.dtu.dk/services>).

La predicción estructural de lip1 se hizo en el servidor Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/>) y en su representación estructural se usó el programa Pymol, cuya versión v1.8 se puede descargar en <https://www.pymol.org/>.

Las citas bibliográficas se fueron recopilando periódicamente a partir de búsquedas en Internet en las bases de datos centrales (MEDLINE®, Current Contents®), accediendo a ellas a través de los sistemas de búsqueda b-on (www.b-on.pt).

4. RESULTADOS

4.1 ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS CONTENIDAS EN LAS ESTS

En la busca de genes involucrados en la síntesis de proteínas con actividad lipásica, fosfolipásica o esterásica (carboxilesterasas), se han comparado las secuencias nucleotídicas contenidas en siete ESTs de *T. harzianum* (EST-299.T3, EST-1279, EST-2104, EST-2126, EST-2957, EST-5482 y EST-9632), con las secuencias de proteínas existentes en las bases de datos no redundantes (nr) de EBI/EMBL, de acuerdo con el algoritmo BLASTx.

Después de la obtención del ADN plasmídico de las ESTs, la primera etapa de secuenciación se realizó con los oligos directo e inverso. En cada una de las etapas de secuenciación se procedió a la limpieza y corrección de las secuencias proporcionadas por el servicio de secuenciación, a su alineamiento con las secuencias conocidas preexistentes (como se indica en la Figura 22), y al diseño de nuevos oligonucleótidos que posibilitasen el alargamiento de la cadena.

Tras algunas etapas de secuenciación, alineamiento de secuencias y sometimiento a las bases de datos, a medida que se fue avanzando en el conocimiento de las secuencias de cada una de estas ESTs, con las respectivas implicaciones de aumento o de pérdida de homología con lipasas, nos quedamos con dos, por los valores de elevada identidad y E-value obtenido por sus proteínas deducidas con putativas lipasas: la EST-1279 y la EST-9632. El gen incluido en la EST-9632 se llamó *lip1* y el incluido en la EST-1279 se llamó *lip2*.

4.1.1 Secuencia nucleotídica de la EST-9632

En las Figuras 23 a 25 está representada la secuencia nucleotídica total contenida en la EST-9632, después de varias etapas de secuenciación. Las letras mayúsculas corresponden a un ORF incompleto y las minúsculas al terminador de *lip1*. En azul están representados los oligonucleótidos usados en sentido directo (lurdjo8, lurdjo10, lurdjo11), y en verde se representan los complementarios a los oligos usados en sentido inverso (lurdjo1, lurdjo6, lurdjo9). Los oligos lurdjo7, lurdjosuccess, R50 y F52 fueron diseñados posteriormente para confirmación y corrección de la secuencia nucleotídica.

Tras las varias etapas de secuenciación descritas, la EST-9632 tenía 4442pb, 2815pb localizadas después del codón de parada, pero por comparación con otras proteínas

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

semejantes existentes en las bases de datos, se constató que faltaban cerca de 52pb correspondientes al inicio del ORF, y la región del promotor.

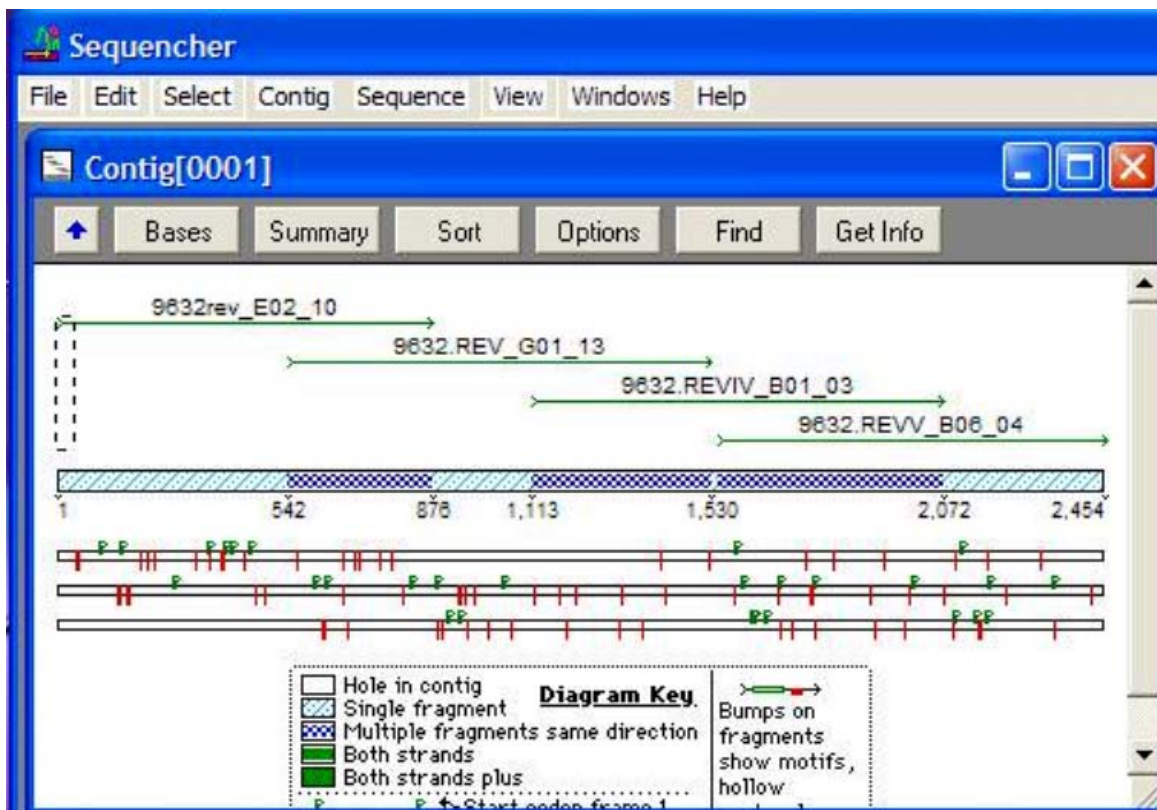


Figura 22 – Ensamblaje de algunas secuencias relativas a la EST-9632.

4.1.2 Secuencia nucleotídica de la EST-1279

En la Figura 26 está representada la secuencia nucleotídica total contenida en la EST-1279 que, después de dos etapas de secuenciación (una con los oligonucleótidos universales directo e inverso, otra usando los oligonucleótidos lurdjo2 y lurdjo3, representados en la figura, tenía 1168pb. Se comparó esta secuencia con las existentes en EBI/EMBL, a través del programa FASTA. La secuencia presentaba una homología de $1,8e^{-80}$ y 61,8% de identidad con una lipasa hipotética de *Giberella zae* = *Fusarium graminearum* (Q4ING8-Gibze), de 408 aminoácidos. Por comparación entre las dos secuencias, se verificó que faltarían cerca de 300pb, correspondientes al inicio del ORF.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.2 ESTRATEGIAS PARA COMPLETAR LAS SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS DE LOS GENES *lip1* Y *lip2*

4.2.1 Rastreo de una genoteca de ADNc

Para intentar completar las fases de lectura abierta de los genes incluidos en las ESTs 1279 y 9632, se rastreó una genoteca de ADNc de *T. harzianum* T34, según el protocolo descrito en 3.6.14.2. Se usaron como sondas los productos de amplificación obtenidos a partir de ADN genómico de *T. harzianum*. Para la detección de *lip1* se usó el producto de amplificación obtenido por PCR con los oligos F3 y R50; para la detección de *lip2* se usaron los oligos lurdjo2 y lurdjo3.

En la Figura 27 se representa la autorradiografía de una de las membranas de hibridación mostrando la localización de las señales emitidas por la sonda marcada (A), y la correspondencia entre algunas señales más aisladas y las placas de lisis del fago (B).

Sin embargo, antes de se haber conseguido extraer ADN del fago λ GEM-11 con calidad suficiente para secuenciar, y completar la secuencia en falta, se ha obtenido resultados más rápidos con otro método alternativo, descrito en 4.2.2.

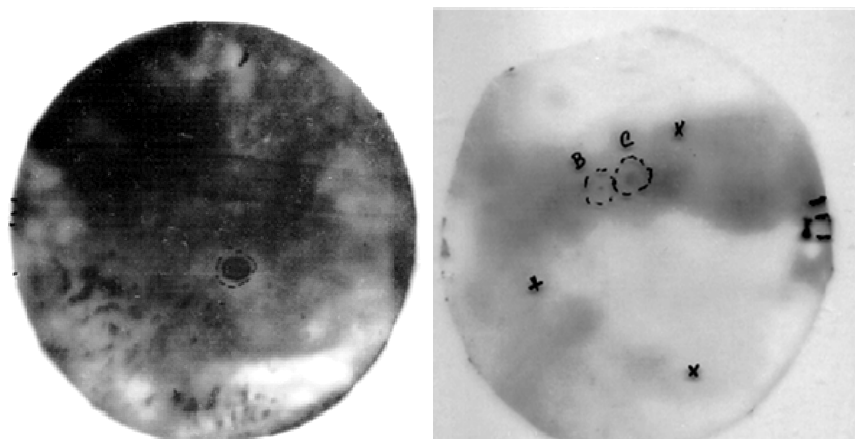


Figura 27 A – Impresión de una película de Rayos X, mostrando la localización de las señales emitidas por la sonda marcada. B – Correspondencia entre las señales escogidas y las placas de lisis del fago.

Cada mancha localiza un clone probable. Las cruces y las líneas marcadas en la periferia del círculo sirven sólo para orientación de la película respecto a la placa original.

4.2.2 Ejecución de HE-TAIL PCR

Para completar la secuencia de las dos ESTs se recurrió a la técnica HE-TAIL PCR según el protocolo descrito en 3.6.13.3.

4.2.2.1 Obtención de la secuencia del gen *lip1*

Para obtener la secuencia completa del gen *lip1*, se han diseñado en la secuencia incompleta del ORF de *lip1* los oligonucleótidos específicos de 26 nt²¹ indicados en la Figura 28: **nrev2**²² (5'- GGA ACC GCT TGA AGC ATC CGA GGG CC -3'), **nrev1**²³ (5'- ATG CTG GTG GTA GGC CAC TGG GAG T -3'), **nrev0a**²⁴ (5'- ATC CTA CTG GCG GCT GCG CGT AAG G -3') y **nrev0b**²⁵ (5'- GAA TAG CGC AAG GCC ACG GTT GGA CC -3'). Se han usado también en las reacciones, los oligonucleótidos degenerados **R1**²⁶ (5'- NGT CGA SWG AMA WGA A -3'), **R2** (5'- GTN CGA SWC ANA WGT T -3'), **R3** (5'- WGT GNA GWA NCA NAG A -3') y **R4** (5'- NCA GCT WSC TMT SCT T -3'), descritos por Michiels et al. (2003).

La separación e identificación de fragmentos de ADN de los productos de reacción se han realizado por electroforesis en geles de agarosa al 0,8%. En la Figura 29 se representan las imágenes obtenidas por electroforesis de los productos de reacción de las tres etapas de HE-TAIL PCR usadas en la obtención de la secuencia nucleotídica de *lip1*.

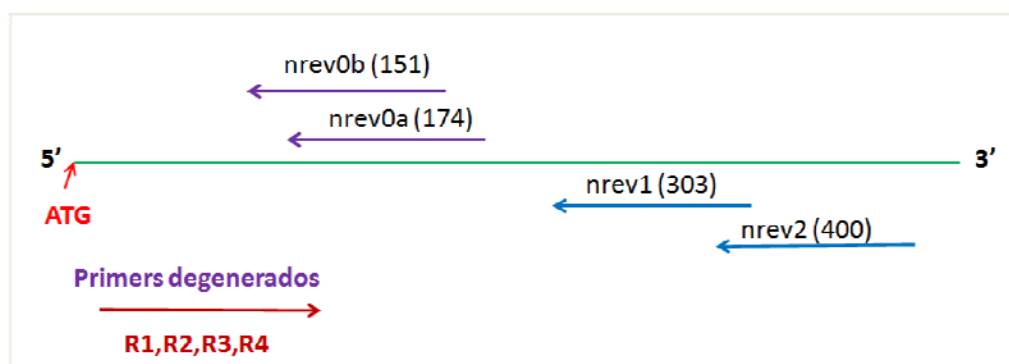


Figura 28 – Representación esquemática de la amplificación por HE-TAIL PCR del gen *lip1*.

Los números entre paréntesis se refieren a la posición del ORF en que cada oligo específico fue diseñado. Las flechas representan el sentido de amplificación en la cadena. En este caso concreto se desconocía la secuencia de las primeras 52pb del ORF.

²¹ Con valores de Tm situados entre 70 y 72 °C.

²² Usado en la reacción primaria de HE-TAIL.

²³ Usado en la reacción secundaria de HE-TAIL.

²⁴ Usado en una de las reacciones terciarias de HE-TAIL.

²⁵ Usado en una de las reacciones terciarias de HE-TAIL.

²⁶ En que M=(A/C), N=(A/G/C/T), S=(G/C); W=(A/T).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las Figuras 29 A, B y C corresponden a las amplificaciones obtenidas en las reacciones primaria, secundaria y terciaria, designadas como TAIL 1, 2 y 3, respectivamente, para las diferentes combinaciones entre oligonucleótidos. En TAIL 1 sólo aparecen bandas nítidas en las combinaciones **R1+nrev2** (carril 3) y **R3+nrev2** (carril 5). En TAIL 2 aparece nuevamente una banda en la combinación **R1+nrev1** (carril 4), pero no en la combinación **R3+nrev1** (carril 6). En TAIL 3 aparecen bandas en las combinaciones **R1+nrev0a** (carril 2) y **R1+nrev0b** (carril 3), y también en las combinaciones **R2+R2** (carril 11) y **nrev0b+nrev0b** (carril 15).

Se consideraron como siendo interesantes los fragmentos de tamaño semejante en las combinaciones **nrev0a-R1** y **nrev0b-R1** de la reacción terciaria (carriles 2 y 3, Figura 29-C), de acuerdo con la diferencia de tamaño prevista entre sus productos de amplificación específicos (cerca de 23pb, en este caso, como se indicó en la Figura 28), pero inexistentes en las reacciones control **R1-R1**.

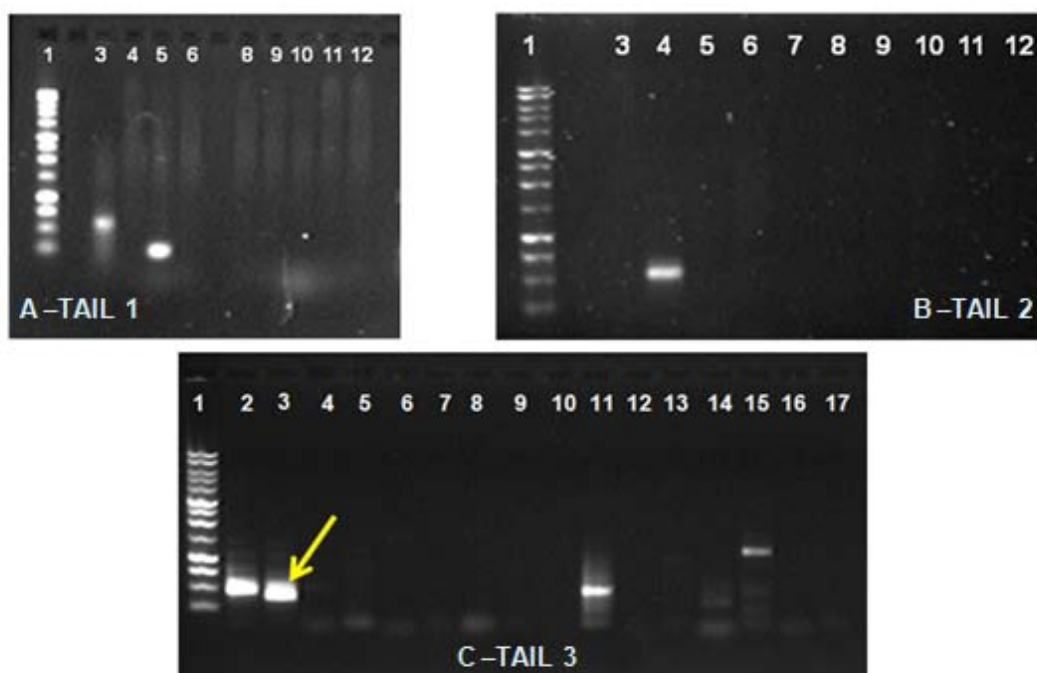


Figura 29 – Electroforesis de los productos de reacción de la HE-TAIL PCR usada en la elucidación de *lip1*. La flecha amarilla indica las bandas seleccionadas en este trabajo para elucidar *lip1*.

- A. Carril: 1 – Marcador de 1Kb; 3 – **R1+nrev2**; 4 – R2+nrev2; 5 – **R3+nrev2**; 6 – R4+nrev2; 8 – R1+R1, 9 – R2+R2; 10 – R3+R3, 11 – R4+R4; 12 – nrev2+nrev2; 13 – control negativo.
- B. Carril: 1 – Marcador de 1Kb; 3 – control negativo; 4 – **R1+nrev1**; 5 – R2+nrev1; 6 – R3+nrev1; 7 – R4+nrev1; 8 – R1+R1; 9 – R2+R2; 10 – R3+R3; 11 – R4+R4; 12 – nrev1+nrev1.
- C. Carril: 1 – Marcador de 1Kb; 2 – **R1+nrev0a**; 3 – **R1+nrev0b**; 4 – R2+nrev0a; 5 – R2+nrev0b; 6 – R3+nrev0a; 7 – R3+nrev0b; 8 – R4+nrev0a; 9 – R4+nrev0b; 10 – R1+R1; 11 – **R2+R2**; 12 – R3+R3; 13 – R4+R4; 14 – nrev0a+nrev0a; 15 – **nrev0b+nrev0b**; 16,17 – **controles negativos**.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El hecho de no haber obtenido amplificación en la reacción **R1-R1** sugiere que las bandas observadas en las interacciones de **R1** con los oligonucleótidos **nrev0a** y **nrev0b** fueron específicas. La banda de 500pb del carril 2 se ha purificado por geneclon y se ha secuenciado con el oligonucleótido **nrev0a**, permitiendo la elucidación del inicio del ORF de *lip1*²⁷, y de 416pb del promotor. Posteriormente, en la secuencia del promotor se han diseñado en el sentido directo los oligonucleótidos **gclcont** (5'-TGC GAT AGC CAT GAC CCG AGG C-3') y **dir** (5'- CTG GTG CAG ATG GTC CAA CCG T -3'), para permitir corregir las regiones peor secuenciadas de las regiones inicial y final de *lip1*, respectivamente.

Se ha decidido hacer una segunda HE-TAIL PCR para elucidación de más bases del promotor de *lip1*. En esto caso se usaron los oligonucleótidos específicos **nrev0b**²⁸ (5'- GAA TAG CGC AAG GCC ACG GTT GGA CC -3'), ya utilizado anteriormente, **nrev0c**²⁹ (5'- TGT GAG GCT GAA CAT GGT GGA GCC G -3'), **nrev0d**³⁰ (5'- TCT GCC TCG GGT CAT GGC TAT CGC A -3') y **nrev0e**³¹ (5'- GCA ACC GCG GTA CAA TGG CTT AGC GG -3'), los dos últimos completamente diseñados en la secuencia del promotor de *lip1* (Figura 30), y los oligonucleótidos degenerados **R1**, **R2**, **R3** y **R4**, descritos anteriormente. Los resultados se presentan en Figura 31.

En esta segunda serie de HE-TAIL PCR ya no se han hecho las combinaciones con **R2**, **R3** y **R4**, una vez que en la serie anterior no habían originado amplificación de bandas de interés. En la reacción terciaria, las combinaciones **R1+nrev0d** (carril 2) y **R1+nrev0e** (carril 3) originaron dos bandas específicas del gen de interés, señaladas por flechas amarillas en la Figura 31. Se ha purificado la banda de 1100bp, y se ha secuenciado parte de ella con los oligonucleótidos **nrev0d** y **nrev0e**, obteniéndose cerca de 395bp anteriores a la región promotora.

La secuencia nucleotídica completa, con 3982pb ha sido sometida a las bases de datos de EMBL, dónde puede ser consultada con el número de acceso AM180877.1. *Lip1*, con un ORF de 1677pb, codifica una proteína deducida de 558 aminoácidos, con 59,3KDa y un punto isoeléctrico teórico (pI) de 4,56. El número de acceso de la secuencia de aminoácidos en la base de datos de UniProt³² es B0B099_TRIHA. La secuencia aminoacídica deducida se encuentra representada en las Figuras 32 y 33.

²⁷ Las 52pb que faltaban.

²⁸ Usado en la reacción primaria de HE-TAIL.

²⁹ Usado en la reacción secundaria de HE-TAIL.

³⁰ Usado en una de las reacciones terciarias de HE-TAIL.

³¹ Usado en una de las reacciones terciarias de HE-TAIL.

³² <http://www.uniprot.org>

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

>orf lip1(694-2370)

1	ATG TTC AGC CTC ACA ACA TTA ACG GGA CTC CTT CTT GCC GTT GCC	45
1	Met Phe Ser Leu Thr Thr Leu Thr Gly Leu Leu Leu Ala Val Ala	15
46	TCC AAC GCA CAG CTG GCT GGT GCA GAT GGT CCA ACC GTG GCC TTG	90
16	Ser Asn Ala Gln Leu Ala Gly Ala Asp Gly Pro Thr Val Ala Leu	30
91	CGC TAT TCT ACA GTT GTT GGT TCT AGC AGT AAT GGA GTC GAT AGC	135
31	Arg Tyr Ser Thr Val Val Gly Ser Ser Ser Asn Gly Val Asp Ser	45
136	TTT AGA GGC ATA CCT TAC GCG CAG CCG CCA GTA GGA TCG CTA CGA	180
46	Phe Arg Gly Ile Pro Tyr Ala Gln Pro Pro Val Gly Ser Leu Arg	60
181	TTG AAG CCA CCA CAA CCC ATA ACT TCT TCT TTG GGC GAG GTT CAG	225
61	Leu Lys Pro Pro Gln Pro Ile Thr Ser Ser Leu Gly Glu Val Gln	75
226	GCA ACC GCT ACT CCG AAA GCA TGC CCT CAA TTT TCT TCG CAG TTT	270
76	Ala Thr Ala Thr Pro Lys Ala Cys Pro Gln Phe Ser Ser Gln Phe	90
271	ACT CCC AGT GgC CTA CCA CCA GCA TTA GTG GAT ATC ATC ACG AAT	315
91	Thr Pro Ser Gly Leu Pro Pro Ala Leu Val Asp Ile Ile Thr Asn	105
316	ATA TCG AAT GTA GTA CAA AAC CAA GAC GAG GAT TGC CTG ACA CTG	360
106	Ile Ser Asn Val Val Gln Asn Gln Asp Glu Asp Cys Leu Thr Leu	120
361	AAT GTC CAG AGG CCC TCG GAT GCT TCA AGC GGT TCC AAG CTC CCT	405
121	Asn Val Gln Arg Pro Ser Asp Ala Ser Ser Gly Ser Lys Leu Pro	135
406	GTA GTA TTC TTC ATT TAT GGA GGA GCT TTT GAA TCT GGC GCA ACA	450
136	Val Val Phe Phe Ile Tyr Gly Gly Ala Phe Glu Ser Gly Ala Thr	150
451	CAG GGA GTT GAC TCC ACA AAT CTC ATC CAA GCC TCA ATT GCT TCT	495
151	Gln Gly Val Asp Ser Thr Asn Leu Ile Gln Ala Ser Ile Ala Ser	165
496	GGT ACA CCG ATC ATT TTT GTG GCG GCA AAT TAT CGA TTA GGG GGC	540
166	Gly Thr Pro Ile Ile Phe Val Ala Ala Asn Tyr Arg Leu Gly Gly	180
541	TTC GGT TTC CTC GCT GGC AAA GAG CTC CTC AAC GAT GGA AGT ACC	585
181	Phe Gly Phe Leu Ala Gly Lys Glu Leu Leu Asn Asp Gly Ser Thr	195
586	AAC CTA GGC CTA AGG GAC CAG CGT TTG GCA CTG CAG TGG GTC GCT	630
196	Asn Leu Gly Leu Arg Asp Gln Arg Leu Ala Leu Gln Trp Val Ala	210
631	GAT AAT ATT GAG CAA TTC GGT GGT GAT CCC GAT AAA GTG ACG CTT	675
211	Asp Asn Ile Glu Gln Phe Gly Gly Asp Pro Asp Lys Val Thr Leu	225
676	TGG GGG TTC TCT GCA GGC TCT ATG AGC GTC TTT GAT CAG ACG GCG	720
226	Trp Gly Phe Ser Ala Gly Ser Met Ser Val Phe Asp Gln Thr Ala	240
721	CTC TTT GGA GGC AAT AAC TCT TAT CAC GGA AAG CCC CTT TTT AGG	765
241	Leu Phe Gly Gly Asn Asn Ser Tyr His Gly Lys Pro Leu Phe Arg	255
766	GCA GCA TTG ATG GAG AGC GGC AGC ATC CTG CCT GCG GAG CCT GCC	810
256	Ala Ala Leu Met Glu Ser Gly Ser Ile Leu Pro Ala Glu Pro Ala	270
811	AAT TCT ACA AAG GCT CAA CTC ATC TAT GAC AAG GTT GTT GAC AGC	855
271	Asn Ser Thr Lys Ala Gln Leu Ile Tyr Asp Lys Val Val Asp Ser	285
856	GCC GGA TGC TCG ACA TCC AGC GAT ACT CTA GCA TGT TTG AGG TCC	900
286	Ala Gly Cys Ser Thr Ser Ser Asp Thr Leu Ala Cys Leu Arg Ser	300

Figura 32 – Secuencia deducida de aminoácidos de la proteína codificada por el gen *lip1* (parte inicial). En azul se encuentra la localización del centro activo, con la serina en la posición 229.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

901	GTA	GAC	TTT	AAC	ACC	TTT	CTG	TTA	GCG	GCA	GAA	TCT	GTT	CCC	ATC	945
301	Val	Asp	Phe	Asn	Thr	Phe	Leu	Leu	Ala	Ala	Glu	Ser	Val	Pro	Ile	315
946	TCA	AGC	AGT	TAT	AAC	TCC	ATC	GCT	TTG	TCA	TAC	CTA	CCA	AGG	CCA	990
316	Ser	Ser	Ser	Tyr	Asn	Ser	Ile	Ala	Leu	Ser	Tyr	Leu	Pro	Arg	Pro	330
991	GAT	GGA	ACA	GTC	CTC	CTT	GAT	TCA	CCG	GAA	ATC	TTG	GCT	TCA	AGA	1035
331	Asp	Gly	Thr	Val	Leu	Leu	Asp	Ser	Pro	Glu	Ile	Leu	Ala	Ser	Arg	345
1036	GGT	CAA	TTT	GCA	AAA	GTC	CCC	TTG	TTG	CTA	GGC	GAT	CAG	GAA	GAT	1080
346	Gly	Gln	Phe	Ala	Lys	Val	Pro	Leu	Leu	Leu	Gly	Asp	Gln	Glu	Asp	360
1081	GAA	GGA	ACT	CTT	TTC	TCG	GTT	TAC	CAA	TTG	AAT	CTT	ACT	AGC	ACA	1125
361	Glu	Gly	Thr	Leu	Phe	Ser	Val	Tyr	Gln	Leu	Asn	Leu	Thr	Ser	Thr	375
1126	CAA	GAC	GTT	GAA	GAA	TAT	CTT	GGC	AGC	CTC	TAT	TTC	CAG	CAA	GCC	1170
376	Gln	Asp	Val	Glu	Glu	Tyr	Leu	Gly	Ser	Leu	Tyr	Phe	Gln	Gln	Ala	390
1171	ACT	GCG	TCC	CAG	GTC	CAA	GAT	CTG	GTG	GCC	ACC	TAT	CCA	GAC	GAT	1215
391	Thr	Ala	Ser	Gln	Val	Gln	Asp	Leu	Val	Ala	Thr	Tyr	Pro	Asp	Asp	405
1216	CCC	TCG	GCT	GGT	TCG	CCT	TTC	AGA	ACA	GGG	TCG	TTG	AAT	AGC	CTT	1260
406	Pro	Ser	Ala	Gly	Ser	Pro	Phe	Arg	Thr	Gly	Ser	Leu	Asn	Ser	Leu	420
1261	TAT	CCA	GAA	TAC	AAA	CGA	CTG	GCC	GCT	ATA	CTT	GGT	GAC	TTT	ATT	1305
421	Tyr	Pro	Glu	Tyr	Lys	Arg	Leu	Ala	Ala	Ile	Leu	Gly	Asp	Phe	Ile	435
1306	TTC	ACA	CTT	CAG	AGG	CGC	AGT	CTT	CTT	GAG	ACA	GTA	GAC	CAG	ATA	1350
436	Phe	Thr	Leu	Gln	Arg	Arg	Ser	Leu	Leu	Glu	Thr	Val	Asp	Gln	Ile	450
1351	GCC	CCA	TCA	GTA	CCG	ACG	TGG	TCT	TTT	CTT	TCG	TCT	TAC	TTA	TAC	1395
451	Ala	Pro	Ser	Val	Pro	Thr	Trp	Ser	Phe	Leu	Ser	Ser	Tyr	Leu	Tyr	465
1396	GGG	ACG	GCT	TTT	TTG	GGA	ACT	TTC	CAC	ACG	ACC	TCA	CAA	ATC	GCT	1440
466	Gly	Thr	Ala	Phe	Leu	Gly	Thr	Phe	His	Thr	Thr	Ser	Gln	Ile	Ala	480
1441	GCT	TTT	GGG	CTG	ATT	CCA	GGC	TAC	GCT	GCC	GCC	GTT	ACA	CAA	GAA	1485
481	Ala	Phe	Gly	Leu	Ile	Pro	Gly	Tyr	Ala	Ala	Ala	Val	Thr	Gln	Glu	495
1486	TTT	TAC	ATC	TCT	TTT	TTC	AAC	ACG	ATG	AAC	CCG	AAC	AGC	AAT	GGC	1530
496	Phe	Tyr	Ile	Ser	Phe	Phe	Asn	Thr	Met	Asn	Pro	Asn	Ser	Asn	Gly	510
1531	TCA	GCA	CTA	CTC	CCT	ACA	TGG	CCA	TGC	TGG	GGA	TCA	GGA	AAA	CAG	1575
511	Ser	Ala	Leu	Leu	Pro	Thr	Trp	Pro	Cys	Trp	Gly	Ser	Gly	Lys	Gln	525
1576	GTG	ATG	CAA	CTT	GGT	GCA	ACT	TCT	TCA	TCT	TTG	TTA	AAT	GAC	AGC	1620
526	Val	Met	Gln	Leu	Gly	Ala	Thr	Ser	Ser	Ser	Leu	Leu	Asn	Asp	Ser	540
1621	TTC	CGA	TCG	GCG	TCC	TTT	GAT	TTT	ATC	CGA	TCA	AAC	TCC	CAG	GCA	1665
541	Phe	Arg	Ser	Ala	Ser	Phe	Asp	Phe	Ile	Arg	Ser	Asn	Ser	Gln	Ala	555
1666	CTA	CAT	ATT	TAG			1677									
556	Leu	His	Ile	End												

Figura 33 – Secuencia deducida de aminoácidos de la proteína codificada por el gen *lip1* (parte final). En azul se localizan los residuos de ácido glutámico (posición 361) y de histidina (posición 474) del centro catalítico.

4.2.2.2 Obtención de la secuencia del gen *lip2*

Para obtener la secuencia completa del gen *lip2* también se recurrió a la HE-TAIL PCR. En este caso se han usado los oligonucleótidos específicos **lip2a** (5'- CTG GCA GAA CCG ATT CCC GAG CGC TT -3'), **lip2b** (5'- ACG CAA CTA CGA TGG CGC CTT GCT CG -3'), **lip2c** (5'- TGC GAT GAA CCC ACA GCT ATC GCC GA -3') y **lip2d** (5'- GAG AAA GCC TGT ACT CCA CGT AGA GG -3'), así como a los oligonucleótidos degenerados **R1**, **R2**, **R3** y **R4** descritos anteriormente. En la Figura 34 se representa la localización de estos oligos específicos, todos ellos diseñados en la secuencia inversa del ORF incompleto.

En la Figura 35A, B y C se pueden observar las amplificaciones obtenidas en las TAIL 1, 2 y 3, respectivamente, para las diferentes combinaciones de oligonucleótidos. En la TAIL 1 las bandas más intensas han correspondido a las interacciones de **R1**, **R3** y **R4** con **lip2a** (carriles 4, 6 y 7), y a la interacción **lip2a+lip2a** (carril 13).

En TAIL 2 la banda más intensa ha correspondido a la combinación **R4+lip2b** (carril 6), pero también a las interacciones **R1**, **R2** y **R3** con **lip2b**, que han originado amplificación del ADN (carriles 3, 4 y 5), así como a la combinación **lip2b+lip2b** (carril 11).

En TAIL 3 sólo las interacciones de **lip2c** y **lip2d** con el oligonucleótido degenerado **R4** han originado bandas que se han considerado correspondientes al fragmento del gen que se pretendía aislar (carriles 8 y 9); se ha seleccionado la banda correspondiente a 2000pb que, aunque menos intensa, parecía ser la que más garantías ofrecía de no corresponder a una amplificación no específica. Esa banda se ha purificado por geneclean, y se ha secuenciado con el oligonucleótido **lip2e** (5'- GCA CAT CGT TTC GAC GCT GCT GGT CC -3'), diseñado en una posición anterior a **lip2c** y **lip2d** (en el sentido inverso del "contig", representado en la Figura 36), para conseguir simultáneamente el alargamiento de la cadena previamente conocida y la corrección de eventuales fallos de secuenciación en la parte final de la secuencia preexistente. La secuenciación ha permitido el conocimiento de más 400pb de la secuencia total del gen. Se ha diseñado un nuevo oligonucleótido, **1279promo** (5'-CAA ATT CGT TCG CTG GCG ATG A -3'), en este fragmento de la secuencia, para secuenciar más bases en la zona del promotor (Figura 37). Por último se han diseñado los oligonucleótidos **1279lip** (5'-AGT TAG GAT CTG CGT CGC CGA C -3'), y **lip2f** que han cubierto las regiones de encaje de las secuencias nucleotídicas de *lip2* con fallos de secuenciación (Figura 37). Para confirmación, se ha amplificado el ADN genómico de *T. harzianum* T34 usando los oligos **lip2a** y **lip2f**, y se ha secuenciado el producto de PCR obtenido.

Al final, la secuencia de *lip2* tenía un total de 1992 nucleótidos, que abarcaban 548pb del promotor, 1215pb de la fase de lectura abierta y uno terminador con 227pb. El ORF

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

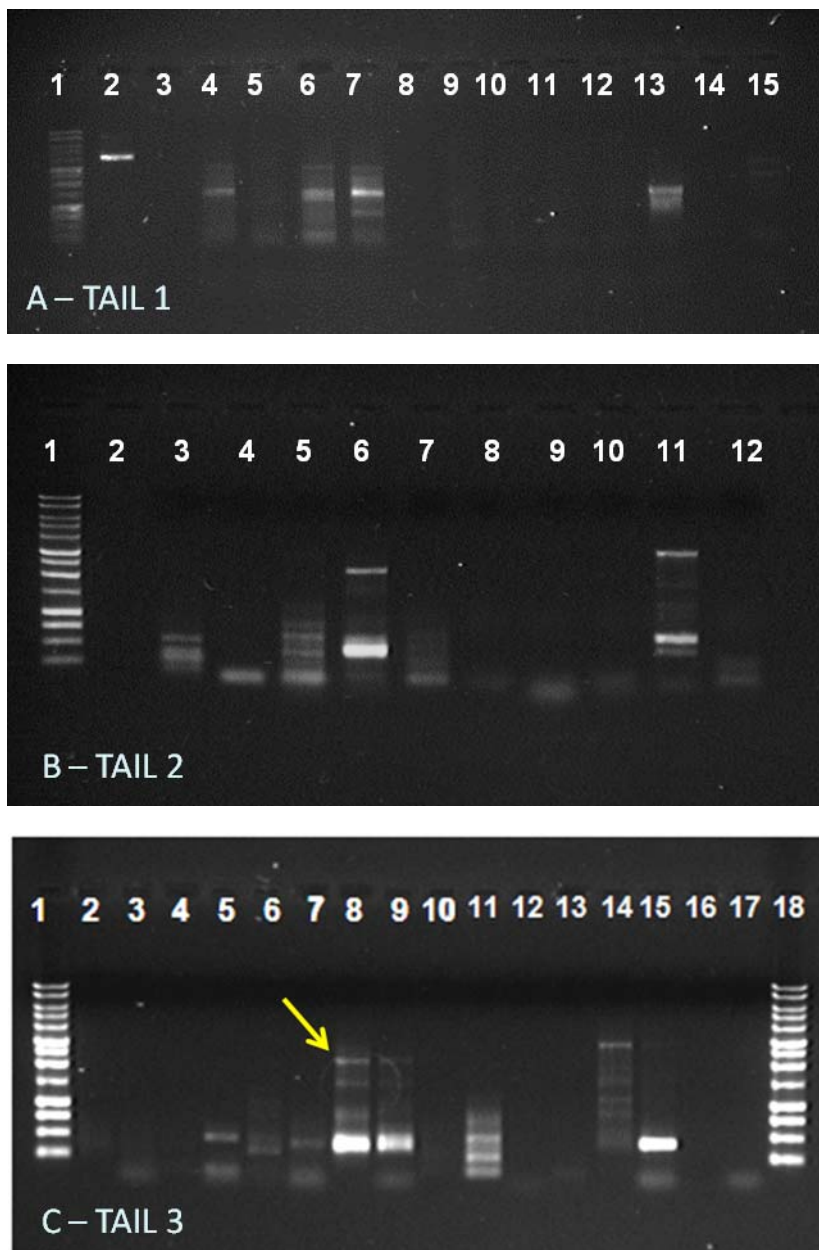


Figura 35 – Electroforesis de los productos de reacción de la HE-TAIL PCR usada en la elucidación de *lip2*.

- A. Carril: 1 – Marcador de 1Kb; 2 – Marcador de intensidad; 4 – R1+lip2a; 5 – R2+lip2a; 6 – R3+ lip2a; 7 – R4+ lip2a; 9 – R1+R1, 10 – R2+R2; 11 – R3+R3, 12 – R4+R4; 13 – lip2a + lip2a; 15 – control negativo.
- B. Carril: 1 – Marcador de 1Kb; 3 – R1+lip2b; 4 – R2+lip2b; 5 – R3+ lip2b; 6 – R4+ lip2b; 7 – R1+R1, 8 – R2+R2; 9 – R3+R3, 10 – R4+R4; 11 – lip2b + lip2b; 12 – control negativo.
- C. Carril: 1 – Marcador de 1Kb; 2 – R1+lip2c; 3 – R1+lip2d; 4 – R2+lip2c; 5 – R2+lip2d; 6 – R3+lip2c; 7 – R3+lip2d; 8 – **R4+lip2c**; 9 – **R4+lip2d**; 10 – R1+R1, 11 – R2+R2; 12 – R3+R3, 13 – R4+R4; 14 – lip2c + lip2c; 15 – lip2d + lip2d; 16, 17 – **controles negativos**.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

>ORF lip2 (549-1763)

1	ATG GGG TGG ACA TTT CTG GGC CGC TTC GGG CTG TTG CTG CTT GTA	45
1	Met Gly Trp Thr Phe Leu Gly Arg Phe Gly Leu Leu Leu Leu Val	15
46	CAG CTC GTC GCT GCT GTC TTT GTC GAG GCC GCT TAC ATC AAT CAA	90
16	Gln Leu Val Ala Ala Val Phe Val Glu Ala Ala Tyr Ile Asn Gln	30
91	CAA GAA CCG TTG GGC GTC AAA GAG CCA GCG TCT GTT TCG AGC ATC	135
31	Gln Glu Pro Leu Gly Val Lys Glu Pro Ala Ser Val Ser Ser Ile	45
136	CCC GTG GCC CTG TTC GCG GAT CTC GAA CGA CTG GCG AGG CTC GTT	180
46	Pro Val Ala Leu Phe Ala Asp Leu Glu Arg Leu Ala Arg Leu Val	60
181	GAC GTC TCA TAT TGC CTT GGC ACC ACA GGC ATT CGC AAG CCG TTC	225
61	Asp Val Ser Tyr Cys Leu Gly Thr Thr Gly Ile Arg Lys Pro Phe	75
226	CAA TGC GTC TCT CGA TGC GAT GAA TTC CCC AAT GTG ACG CTG GCC	270
76	Gln Cys Val Ser Arg Cys Asp Glu Phe Pro Asn Val Thr Leu Ala	90
271	TCT ACG TGG AGT ACA GGC TTT CTC TTC GGC GAT AGC TGT GGG TTC	315
91	Ser Thr Trp Ser Thr Gly Phe Leu Phe Gly Asp Ser Cys Gly Phe	105
316	ATC GCA GTT GAT CAC GGC TCG GAC CAG CAG CGT CGA AAC GAT GTG	360
106	Ile Ala Val Asp His Gly Ser Asp Gln Gln Arg Arg Asn Asp Val	120
361	CTT ATA GGA GAT GAC GAG CAA GGC GCC ATC GTA GTT GCG TTC CGT	405
121	Leu Ile Gly Asp Asp Glu Gln Gly Ala Ile Val Val Ala Phe Arg	135
406	GGG ACC TAC AGC ATC ACC AAT ACC ATT ATT GAT CTG AGC ACC ATG	450
136	Gly Thr Tyr Ser Ile Thr Asn Thr Ile Ile Asp Leu Ser Thr Met	150
451	CCG CAA AAA TAC GTG CCA TAC CCG TCG CCA GAT CAC GGA GGA GAA	495
151	Pro Gln Lys Tyr Val Pro Tyr Pro Ser Pro Asp His Gly Gly Glu	165
496	TCA CCA GAA AAG CCT AGC CAT GAG TGC ACA AAT TGC ACC GTA CAC	540
166	Ser Pro Glu Lys Pro Ser His Glu Cys Thr Asn Cys Thr Val His	180
541	AGT GGG TTT CTC GAG TCT TGG AAA AGC GCT CGG GAA TCG GTT CTG	585
181	Ser Gly Phe Leu Glu Ser Trp Lys Ser Ala Arg Glu Ser Val Leu	195
586	CCA GAA CTC AAG GCA CTG AGG GCC AAG TAT CCG TCT CAC CCC GTC	630
196	Pro Glu Leu Lys Ala Leu Arg Ala Lys Tyr Pro Ser His Pro Val	210
631	CAT CTC ATC GGC CAC AGC CTT GGA GGC GCC GTG GCT TGT CTT GCG	675
211	His Leu Ile Gly His Ser Leu Gly Gly Ala Val Ala Cys Leu Ala	225
676	GCA CTC GAA CTG AAA GTG TCT CTT GGC TGG GAT GAT GTG ACG GTT	720
226	Ala Leu Glu Leu Lys Val Ser Leu Gly Trp Asp Asp Val Thr Val	240
721	ACC ACG TTT GGA GAG CCT CGT GTC GGC AAC TCT GAG TTC GCC CAC	765
241	Thr Thr Phe Gly Glu Pro Arg Val Gly Asn Ser Glu Phe Ala His	255
766	TTC GTT GAC GAT GTT TTT TAC CTC GAC GGC ATC ATT GAC CCT GAA	810
256	Phe Val Asp Asp Val Phe Tyr Leu Asp Gly Ile Ile Asp Pro Glu	270
811	AAG AGG ACC TAT CGA CGA GTT ACC CaC GCC GAC GAC CCA GTA CCC	855
271	Lys Arg Thr Tyr Arg Arg Val Thr His Ala Asp Asp Pro Val Pro	285
856	TTA CTT CCA CCG GGC GAG TTT GGT TAC CAG TCA CAT GGC GGC GAG	900
286	Leu Leu Pro Pro Gly Glu Phe Gly Tyr Gln Ser His Gly Gly Glu	300

Figura 38 – Secuencia deducida de aminoácidos de la proteína codificada por el gen *lip2* (parte inicial). En azul se encuentra la localización del centro activo, con la serina en la posición 216.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

901	ATA TTC ATC TCC AAG TCT GCC CTC TCG CCA TCT GAG ACG GAT GTC	945
301	Ile Phe Ile Ser Lys Ser Ala Leu Ser Pro Ser Glu Thr Asp Val	315
946	CAG CTA TGC GTC GGC GAC GCA GAT CCT AAC TGC AGT GCC AGG GAT	990
316	Gln Leu Cys Val Gly Asp Ala Asp Pro Asn Cys Ser Ala Arg Asp	330
991	GAC AGC TCA ATG GAA GGT CTG CTC AAT CGC CTT CTC CAT TTC TGG	1035
331	Asp Ser Ser Met Glu Gly Leu Leu Asn Arg Leu Leu His Phe Trp	345
1036	GGA ACG ACT GCC TCT TTG GAA GAG TAC ACG GAG AGG ATG AGC ATC	1080
346	Gly Thr Thr Ala Ser Leu Glu Glu Tyr Thr Glu Arg Met Ser Ile	360
1081	CCG ACG CGG TTC AAA TTG TGG CAG CTG TTT TTT GCT CAT CGA GAT	1125
361	Pro Thr Arg Phe Lys Leu Trp Gln Leu Phe Phe Ala His Arg Asp	375
1126	TAC TTC TGG AGA CTC GGA CTA TGT GTG CCC GGC GGC GAC CCT ACA	1170
376	Tyr Phe Trp Arg Leu Gly Leu Cys Val Pro Gly Gly Asp Pro Thr	390
1171	AAC TGG GGT CGG CCT CCG TAT GCG CCT CAT GAC GAG GAG TTG TAA	1215
391	Asn Trp Gly Arg Pro Pro Tyr Ala Pro His Asp Glu Glu Leu End	405

Figura 39 – Secuencia deducida de aminoácidos de la proteína codificada por el gen *lip2* (parte final).

4.3 CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA NUCLEOTIDICA DEL GEN *LIP1*

En total se secuenciaron 3892 pares de bases. Las primeras 693 pares correspondieron a la zona del promotor. El marco de lectura abierto (ORF), con 1667pb, identificado por el programa BioEdit, se situó entre las bases 694 y 2370. Las restantes pares de bases correspondieron al terminador del gen.

Sin embargo, de acuerdo con el análisis predictivo de intrones hecho en la aplicación AUGUSTUS³³ (Stanke et al., 2008) restricta a hongos, y basada en la comparación con las secuencias de genes de *Fusarium graminearum*, ni toda la secuencia nucleotídica es convertida en aminoácidos, se teniendo detectado un intrón de 44pb en las posiciones 1576 a 1619 del ORF. En la Tabla 19 se encuentran descritos las secuencias consenso de procesamiento de intrones en las regiones 5' y 3', y de formación del "lazo", detectados en la secuencia del gene *lip1*. Las secuencias consenso para hongos filamentosos están tomadas de Ballance (1986), y las bases que no coinciden con el consenso se indican en minúscula.

³³ <http://bioinf.uni-greifswald.de/augustus>

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 19 – Intrón del gen *lip1*

	Inicio de procesamiento del intrón	Sitio de formación del "lazo"	Fin de procesamiento del intrón
Consenso	(AG)GTAHGTY	WRCTRAC	MYAG
Intrón de <i>lip1</i>	(AG)GTgAtgC	AAaTGAC	ACAG

Las bases que no coinciden con el consenso se indican en minúscula.

4.3.1 Estudio de la región 5' no codificante

Los elementos principales del promotor de un gen eucariota se sitúan en los, aproximadamente, 300pb que anteceden a la fase de lectura abierta. En la Figura 40 están representados algunos de los motivos encontrados frecuentemente en esta región: la secuencia **TATA**, el iniciador (**Inr**), el elemento de reconocimiento del factor de transcripción TFIIB (**BRE**), y el elemento **DPE** ("downstream core promoter element"), de acuerdo con Butler & Kadonaga (2002). Estos motivos tienen funciones específicas relacionadas con el proceso de transcripción, pero cada uno de estos elementos puede estar o no presente en el promotor de un gen. Un promotor puede contener todos, sólo uno, o ninguno de estos motivos, incluyendo la caja TATA (Butler & Kadonaga, 2002).

De acuerdo con Fukue et al. (2004) la secuencia consenso del elemento TATA es **T-A-T-A-(A/T)-A-(A/T)**, y usualmente está localizada 25-31pb antes del sitio de inicio de la transcripción (**TSS** – "transcription start site"; +1) en los eucariotas superiores. En *S. cerevisiae* se sitúa entre 45-120pb antes (Hampsey, 1998; Butler & Kadonaga, 2002), complicando su predicción bioinformática. Sin embargo, se ha observado que una amplia gama de secuencias puede funcionar en vivo como caja **TATA** (Singer et al., 1998). Por lo tanto, la existencia en el promotor de secuencias semejantes a **TATAAA** (tal vez con uno o dos desajustes de este consenso) pueden ser motivos **TATA** funcionales.

El elemento **BRE** es un sitio de ligación de TFIIB y se localiza inmediatamente antes de la caja TATA (Lagrange et al., 1998, Tsai & Sigler, 2000), pero sólo existe en algunos promotores con caja TATA. Tiene la secuencia consenso G/C-G/C-G/A-C-G-C-C.

En los eucariotas la secuencia circundante de **TSS**, referida como secuencia iniciadora (**Inr**), fue descrita por tener un papel determinante en el inicio de la transcripción (Hampsey, 1998; Smale & Baltimore, 1989), en particular en la ausencia del elemento **TATA**, por lo que puede actuar como el mayor elemento de transcripción en promotores de genes carentes de TATA (Weis & Reinberg, 1992, 1997). Los elementos **Inr** pueden encontrarse en promotores con o sin caja **TATA**, e interactúan con diversos factores, incluyendo **TFIID** (Burke & Kadonaga,

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1996). En *Drosophila*, el consenso **Inr** es **T-C-A₊₁-G/T-T-C/T** (Arkhipova, 1995; Kutach & Kadonaga, 2000). El nucleótido A₊₁ es designado +1 por su correspondencia habitual con el inicio de la transcripción.

El elemento **DPE** es frecuentemente encontrado en promotores sin caja **TATA** y, en conjunto con **Inr** constituye una región de ligación a **TFIID**. **DPE** se localiza exactamente en la posición +28 a +32 relativamente a la posición A₊₁ de **Inr**. Todos los promotores conteniendo elementos **DPE** poseen este espaciado entre los dos motivos, y la alteración de un sólo nucleótido provoca gran decrecimiento de la ligación de **TFIID**, y de la transcripción (Kutach & Kadonaga 2000). La secuencia consenso para **DPE** es **A/G₊₂₈-G-A/T-C/T-G/A/C**.

En el promotor de *lip1*, representado en la Figura 41, hay una secuencia semejante a la secuencia **TATA** canónica, **T-A-A-A-T-A**, a una distancia de -25pb de TSS. No existe el elemento **BRE**. Tampoco existen otros elementos de transcripción frecuentes en promotores de genes eucariotas: los elementos **C-C-A-A-T** (localizados en la dirección 5' de la caja **TATA**). En las posiciones 612-621 se encuentra una región rica en **C-T**, conocida como los "bloques de pirimidinas".

En cuanto al elemento **Inr**, tiene la secuencia **T-C-A₊₁-G-T-C**, que se encuadra con el consenso descrito anteriormente. Tras 29pb de A₊₁ (**TSS**) se encuentra el elemento **DPE**, con la secuencia **A-G-T-C-A**, también concordante con el consenso descrito por Butler & Kadonaga (2002).

Los elementos de respuesta al ácido oleico o a AG, **OREs** o **FAREs** ("oleate responsive elements" o "fatty acids responsive elements") son elementos de transcripción existentes en los promotores de genes de enzimas lipolíticas, formados por dos tripletes de **CGG** dispuestos inversamente, intercalados por 14-18 nucleótidos, de acuerdo con el consenso **C-G-G-N₍₁₄₋₁₈₎-C-C-G** (Rottensteiner et al., 2002). De acuerdo con Einerhand et al. (1993), Filipits et al. (1993) y Karpichev & Small (1998) todos los **OREs** contienen al menos dos residuos de A y T conservados, según el consenso **C-G-G-N₃-T-N-A**, en que N puede ser cualquier desoxirribonucleótido.

En *lip1* hay una secuencia similar la **C-G-G-N₍₁₄₋₁₈₎-C-C-G**, pero con N=26, y que tampoco cumple el consenso **C-G-G-N₃T-N-A**. Sin embargo, ya anteriormente habían sido descritas lipasas cuyo promotor presentaba secuencias de **OREs** no canónicas (González-Ramos, 1997; Choupina, 2001).

Otros motivos **CGG/CCG** son dianas comunes de factores de transcripción fúngicos³⁴ como es el caso de proteínas con dedo de zinc Zn₂Cys₆, que se pueden unir a estos tripletes de

³⁴ Es el caso de los factores de transcripción **ADR1_01**, **CAT8**, **CGR1_01** y **MCM1**, entre otros.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

acuerdo con tres configuraciones distintas: evertida, invertida o repetición directa (Figura 42), pero también en la forma de monómeros, homodímeros o heterodímeros. En la cadena directa del promotor de *lip1* se encuentra el motivo **CGG** en las posiciones 21, 31, 112, 122, 196, 239, 246, 363, 456, 684 y 716; y el motivo **CCG** en las posiciones 24, 30, 68, 204, 225, 325, 329, 341, 353, 437, 453, 511, 595, 656 y 731.

En el promotor de *lip1* se han detectado otros factores de transcripción (TF), listados en la Tabla 20 de acuerdo con la búsqueda hecha en la aplicación Genebuilder de Webgene (<http://www.itb.cnr.it/webgene/>). Entre ellos se encuentran:

- once **HSF_01 [T00385]**, de “heat shock transcription factor” que reconocen distintos elementos de choque térmico – repeticiones invertidas **NGAAN** (Yamamoto et al., 2005)]
- diez **ADR1_01 [T00011]**, de “alcohol deshidrogenase regulator” es un TF necesario para la transcripción de genes reprimidos por glucosa, de genes de proteínas peroxisomales y de genes necesarios para la utilización de etanol, glicerol, y ácidos grasos (Young et al., 2003)
- seis **MATalpha2 [T00487]**, relacionados con el “mating type” (Porter & Smith, 1986)
- tres **CGR1 [T00322]**, de “glycolysis regulation” activadores de genes implicados en glicólisis (Holland et al., 1987)

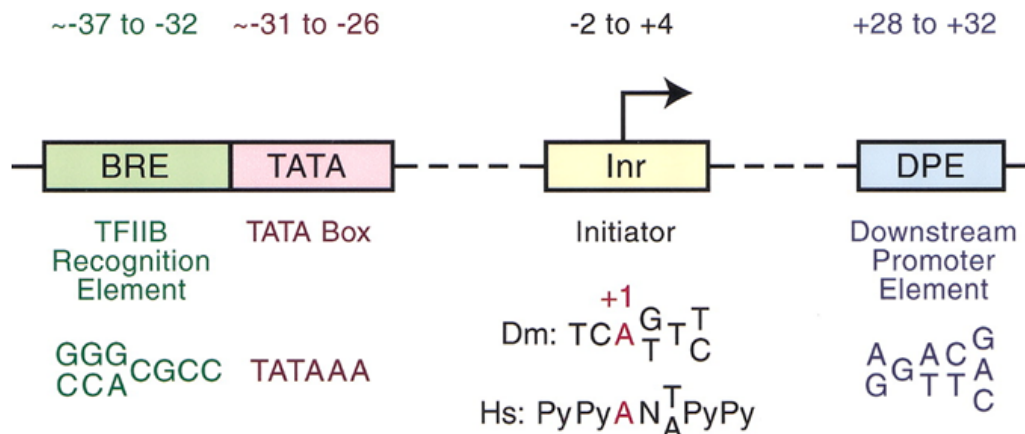


Figura 40 – Elementos de un promotor (Butler & Kadonaga, 2002).

Cada uno de estos elementos sólo es encontrado en un subconjunto de promotores. Uno dado promotor puede contener todos, sólo uno, o ninguno de estos motivos. BRE está situado antes de la caja TATA pero sólo existe en algunos promotores con caja TATA. DPE necesita de uno Inr y se encuentra exactamente en la posición +28 a +32 del nucleótido A₊₁ de Inr. El consenso DPE fue determinado en *Drosophila*. La secuencia consenso Inr es descrita para *Drosophila* (Dm) y para el hombre (Hs). BRE tiene la secuencia consenso G/C-G/C-G/A-C-G-C-C. La secuencia consenso del elemento TATA es T-A-T-A-A (con la T de la posición 5' de la secuencia TATA inmediatamente la seguir al C de la posición 3' de BRE).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

> prom (693pb)

```
-693 TGCTGCCTTGGTCGTCCTCGCGCCGCGAGCCGGGCTTTTGGCTTTGCTCCATTTCTATTCAATAATGACCGAGGATTGAAG
-613 TACAGTCTTCCAGCAAGCACAAAGATGGATGTCGGGGTACGTCGGGGTATGCTGGCGTTTGGACGTGCATGTTCTCTGATG
-533 AGATCGTGATTATGCATCCAACCTCTGGGGGAATTGCGGGGGATCCGTGTCGAATCACGCTATCCCCGCAATCTGACCACG
-453 GAACTCGGCTACGAAATACGAAATATTGGCTACTTTTTGCGTACTCGTATTAGCTTCCTTGCCCTTAGTCGATATTAGT
-373 CGCCCCGACCGAGAAAGCGACCGAGAAGCAATCCGAGACAGTCGGTGAAAAGGAACAAACCATGAAAACACCAAGCCAGC
-293 TGACATGAAAGCGTAGAATTATTACCAAATTTGCTTCCGCTAAGCCATTGTACCGCGTTGCTTCTGACTACACTACTAG
-213 GTAGTTTACTGCATTTGCGATAGCCATGACCCGAGGCAGATGAGAATACATGTAAGCAACTCCAGAGTTGTCAGCTTCTG
-133 AGAGTTGCCAGCTTCTGTAAATAAGGTAGAGGAGGTCCGACTCAGTCACTGCTTCTTTTCTGGGGATTATCGAGTCAAGTT
-53 TGATTCATGTTATTGCCGTTACATAGCAGCCACCTTATTAGTCGGCTCCACCATGTTTCAGCCTCACAAACATTAACGGGA
```

Figura 41 – Elementos del promotor de *lip1* (-1 a -693). Están representados algunos de los motivos encontrados. En recuadros: el iniciador, **Inr** (azul), el elemento **DPE** (turquesa), un elemento de respuesta al ácido oleico, **ORE** (naranja oscuro), y el codón de iniciación, **ATG** (azul oscuro). En subrayado: una secuencia semejante a **TATA** (naranja), bloques **CT** (verde oscuro), sitios de reconocimiento de **ADR1** (rojo), de **STRE** (gris), y de **STE12** (verde claro, solo están representados tres de los cuatro identificados, por superposición con **DPE**; tampoco los sitios de reconocimiento de **MIG1** no están representados por superposición).

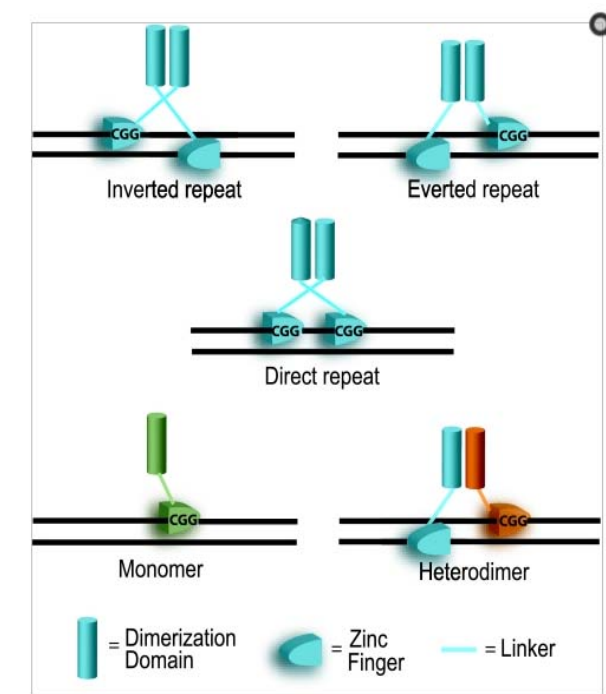


Figura 42 – Modelos de reconocimiento de las proteínas en dedo de zinc. Estas proteínas se pueden unir a tripletes CGG en tres configuraciones distintas: invertidas, evertidas y repeticiones directas. También se pueden unir como monómeros (verde), como homodímeros (dos moléculas en azul) o heterodímeros (dos moléculas, una azul y otra naranja).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 20 – Factores de transcripción predichos en el promotor de *lip1*³⁵

Factor de transcripción	Posición/Cadena	Semejanza	Secuencia
ADR1_01	112 (+)	0,996	cGGGG
ADR1_01	122 (+)	0,996	cGGGG
ADR1_01	185 (+)	1,000	tGGGG
ADR1_01	186 (+)	0,985	gGGGG
ADR1_01	196 (+)	0,996	cGGGG
ADR1_01	197 (+)	0,985	gGGGG
ADR1_01	223 (-)	0,996	cGGGG
ADR1_01	302 (-)	0,989	aGGGG
ADR1_01	323 (-)	0,996	cGGGG
ADR1_01	621 (+)	1,000	tGGGG
GCN4_C	631 (-)	0,949	aacTGACTcg
GCR1_01	85 (+)	0,922	gtCTTCcag
GCR1_01	292 (+)	0,914	agCTTCcct
GCR1_01	432 (+)	0,883	tgCTTCcgc
HSF_01	51 (-)	0,991	AGAAa
HSF_01	150 (-)	1,000	AGAAc
HSF_01	332 (+)	0,991	AGAAa
HSF_01	344 (+)	0,985	AGAAg
HSF_01	415 (+)	0,989	AGAAt
HSF_01	462 (-)	0,985	AGAAg
HSF_01	523 (+)	0,989	AGAAt
HSF_01	555 (-)	0,985	AGAAg
HSF_01	572 (-)	0,985	AGAAg
HSF_01	612 (-)	0,985	AGAAg
HSF_01	617 (-)	0,991	AGAAa
MATALPHA2_01	146 (+)	0,926	gcATGTtctc
MATALPHA2_01	399 (-)	0,910	tcATGTcagc
MATALPHA2_01	524 (-)	0,929	acATGTattc
MATALPHA2_01	528 (+)	0,892	acATGTaagc
MATALPHA2_01	645 (+)	0,977	tcATGTtatt
MATALPHA2_01	658 (-)	0,861	ctATGTgaac
MCM1_01	215 (-)	0,923	gcgggGATAgcgtg
MCM1_01	307 (+)	0,923	tagtcGATAttagt
MCM1_01	494 (+)	0,905	tttgcGATAgccat
MCM1_01	623 (-)	0,917	gactcGATAatccc
PHO4_01	138 (-)	0,868	atgCACGtccaa
STRE	301 (-)	0,992	taAGGGgc

Se señalan las secuencias reconocidas por **ADR_01**, localizadas en el interior del elemento **ORE** (posiciones 196, 197 y 223), así como la situada entre **Inr** y **DPE** (posición 622).

³⁵ <http://bioinfo4.itb.cnr.it/~webgene/genebuilder.html>

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- dos **MCM1 [T00500]**, de “mini chromosome maintenance” implicados también en la respuesta a feromonas (Passmore et al., 1989; Elble & Tye, 1991)]
- un **CGN4 [T00321]**, de “general control nonderepressible” es un activador transcripcional de la síntesis de aminoácidos (Hinnebusch & Natarajan, 2002)]
- un **PHO4 [T00690]**, de “phosphate metabolism”, activa la transcripción en respuesta a la limitación de fosfato. Su función está regulada por la fosforilación en múltiples sitios y por la disponibilidad de fosfato (Zhou & O'Shea, 2011)
- un **STRE**, de “stress responsive element”, con la secuencia consenso AGGGG (Ruis & Schüller, 1995). STRE es funcional en ambas orientaciones (CCCCT o AGGGG) (Estruch, 2000).

Además, de acuerdo con los resultados obtenidos en la aplicación PROMO de <http://alqgen.lsi.upc.es/>, hay:

- cuatro sitios correspondientes al **TF STE12 [T00772]**, de “sterile”, TF que se activa por una cascada de señalización MAPK, activando los genes que participan en el apareamiento o en vías de crecimiento de hifas invasoras. Cooperera con el TF Tec1p para regular genes específicos para el crecimiento invasivo (Roberts & Fink, 1994). Se trata de **ATGAAAAC** (382-389), **ATGAAAGC** (405-412), **AGTTTGAT** (637-644) y **TGATTCAT** (641-648)
- dos sitios correspondientes a **CAT8 [T03227]**, de “catabolite repression”. Es necesario para la desrepresión de una variedad de genes en condiciones de crecimiento no fermentativo; activo después de cambio diaúxico, se une a elementos de respuesta a la fuente de carbono (Haurie, 2001; Hiesinger et al., 2001; Young et al., 2003). Se encuentran en las posiciones 363-374 (**CGGTGAAAAGGA**) y 444-455 (**GCCATTGTACCG**), y
- dos sitios correspondientes a **MIG1 [T00509]**, de “multicopy inhibitor of GAL gene expression”. Es un TF implicado en la represión de la glucosa, una secuencia de ADN específica, que se une a una proteína que contiene dos motivos dedo de zinc Cys2His2 (**MIG1p**). Regula el crecimiento de las hifas junto con **MIG2p** en respuesta al agotamiento de glucosa (Santangelo, 2006; Karunanithi & Cullen, 2012; Garcia-Salcedo et al., 2014)]. Estos motivos se encuentran en las posiciones 179-189 (**CAACTCTGGGG**) y 615-625 (**CTTTTCTGGGG**)

Se sabe que el TF **ADR1** es una proteína codificada por **ADR1**, un gen regulador necesario para la expresión del gen **ADH2**, una alcohol deshidrogenasa esencial para el

primer paso en la oxidación de etanol, y que es reprimido por glucosa (Ciriacy, 1979). También la expresión de otros ocho genes se ha revelado dependiente de **ADR1**, entre los que se incluyen genes importantes para la utilización de etanol y glicerol (Pavlik et al., 1993; Kratzer & Schuller, 1997). Seis de ellos codifican componentes de la vía peroxisomal de β -oxidación de los ácidos grasos (Pavlik et al, 1993; Gurvitz et al, 2000). Actúa junto con **CAT8** en el control de genes implicados en la utilización de etanol (Haurie, 2001; Hiesinger et al., 2001; Young et al., 2003).

En **Lip1** se predicen diez secuencias de unión a **ADR1**, pero también dos de unión a **CAT8** y a **MIG1**, sugiriendo un control de la expresión de **Lip1** reprimido por glucosa. Las secuencias de ADN específicas reconocidas por **ADR1** (**nGGGG**) se encuentran en su mayoría en la cadena directa del promotor, muy cerca del elemento **ORE** (posición 196-227) en la dirección 5' (en las posiciones 112, 122, 185, 186; Figura 41, e incluso en el incluidas (en las posiciones 197, 198 y 223). Otra de estas secuencias se localiza en la posición 622, entre el elemento **Inr** y **DPE**, justo tras el bloque de **CTs** (Figura 41), sugiriendo una estricta represión de **Lip1** en presencia de glucosa. El factor de transcripción **MIG1** reconoce las secuencias nucleotídicas en las posiciones 179-189 y 615-625, que engloban cada una de ellas la secuencia reconocida por **ADR1**, la última de las cuales situada en la posición 622.

Dos de los cuatro motivos reconocidos por **STE12**, involucrada en la regulación de genes específicos para el crecimiento invasivo, se encuentran entre **DPE** y la secuencia **ATG** en las posiciones 637-644 y 641-648, sugiriendo que **Lip1** podrá formar parte de las enzimas hidrolíticas implicadas en el proceso de biocontrol.

4.3.2 Estudio de la región 3' no codificante

La región 3' no codificante situase entre el codón de parada y el inicio de la cola poli (A). En ella se encuentran las secuencias necesarias para la finalización de la transcripción y procesamiento correcto del ARNm. Desempeña un papel importante en la regulación pós-transcripcional de la expresión génica, incluyendo el transporte de ARNm del núcleo, la eficiencia de la traducción (van der Velden & Thomas, 1999), la localización subcelular (Jansen, 2001), y la estabilidad (Bashirullah et al., 2001).

Además de las señales típicas de finalización de la transcripción, en muchos ARN mensajeros aparece una señal de poliadenilación **AAUAAA** o menos frecuentemente **AUUAAA** (en cerca de 15%). Estos hexámeros están involucrados en a terminación de la transcripción y la exportación desde el núcleo hasta el citoplasma. Al estudiar secuencias de ADN de varios genes se ha encontrado en su región 3' no codificante la secuencia

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

correspondiente, A(A/T)TAAA, y alguna otra variante como AATAA o TATAAA que podrán actuar como señales de poliadenilación (Oliver & Warmington, 1989).

En *lip1* después del codón de parada (TGA, en la posición 1638-1640 del ORF) hay en el terminador una región muy corta rica en T, y existen los elementos TAG....TAGT, en las posiciones 35, 45, 48 y 87 (Figura 43). Se encuentra una secuencia TATAAA en las posiciones 96 y 363, o la AATAA en las posiciones 180, 224 y 643.

Sábese que la variación de un ARNm está regulada principalmente por elementos *cis* localizados en la región 3' no codificante, tales como los elementos ricos en **AU** (AREs, "AU rich elements"), que promueven la descomposición de ARNm en respuesta a una variedad de señales específicos intra y extracelulares (Mignone et al., 2002). Se señalan en la Figura 43 las regiones del terminador de *lip1* más ricas en elementos AT.

```
> term
1  TTTTATCCGATCAAACCTCCAGGCACTACATATTTAGTTCAAAGTAGTAGATGAAAACTCTTGTAACCTTCTGCAAGAA
81  GAGAGATAGTGCTAT TATAAAATCCTTATTCTTATAAGGAAATACTATATTCCTACATTCCGATAGGCTTATTATTTTAC
161  CAGAAGCTGTTTCTATCGA AATAATAGCC TTTAATTTTGCATTTTCCCTTGT AACATAAAAAC AATAAGCTACTGTATTC
241  CCTGCTATTG TTTTTAGTATAACCGCTGGCTAAACCAGCTACCCTATTGGTTAATTCGATCAAACTGAATAGAATTCTGC
321  AGAGATCTAACATTGCGTTTTTGAGAGGGAATACAGCATTTTA TATAAATGATCGCCTAGATGTATCATCAATTTGCGAAG
401  GAACTGAAATGGGTAAGATTAAGCAATGCGGATGAATGGTAATCAGTATTTACCCAGAGTATGAGTGAAAGTTTCTGC
481  GTATCATTTTACCTGAGCCCAGGCCGTATAGTCTTCGTCAACCAAACCGTCGCAATACATGCCGGACGCCATCATCAAT
561  GACATCAAGTTTGCTTTCCGCATATTCAGCAATTTGCCACTATTTTTTGCTTCATGGACCCTGAGTGGATTAACCTCCT
641  TA AATAACCGTTTCGTAATAAATTGCCTCAAAGCCAGTCTTGTCGCCGCTTGAGCTGCGATGTAACCCGTATTCTGAGCG
```

Figura 43 – Elementos del terminador de *lip1*. Se localizan algunos de los motivos encontrados frecuentemente en esta región: secuencias TTT (a rojo, subrayado), TAG (subrayado), elementos de la región rica en A/T (verde), los elementos AATAA (naranja) y TATAAA (azul).

4.3.3 Estudio de la región codificante

La composición en bases del ORF del gen *lip1* es: **T** 26,57%, **C** 26,57%, **A** 23,93% y **G** 22,93%. El porcentaje **A+T** del gen *lip1* es de 50,50%. La región codificante propuesta tiene 1596pb, con una secuencia peptídica de **532** aminoácidos (Figuras 32 y 33), y una masa estimada de **56,33 KDa**.

Por análisis de la Tabla 21, se verifica que los codones más utilizados en *lip1* fueron, por orden decreciente **TTT** y **GAT** (17 veces), **GCT** y **ACA** (16 veces), **GCA**, **GGA**, **GGC**, **CAG** y **TCT** (15 veces).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 21 – Número de veces de utilización de cada codón por aminoácido

Aminoácido	Codon usado
A Ala	GCA(15), GCC(12), GCG(6), GCT(16)
C Cys	TGC(4), TGT(1)
D Asp	GAC(10), GAT(17)
E Glu	GAA(9), GAG(7)
F Phe	TTC(13), TTT(17)
G Gly	GGA(15), GGC(15), GGG(5), GGT(11)
H His	CAC(2), CAT(0)
I Ile	ATA(5), ATC(12), ATT(6)
K Lys	AAA(6), AAG(5)
L Leu	CTA(8), CTC(12), CTG(9), CTT(16), TTA(5), TTG(13)
M Met	ATG(4)
N Asn	AAC(10), AAT(12)
P Pro	CCA(13), CCC(8), CCG(7), CCT(7)
Q Gln	CAA(14), CAG(15)
R Arg	AGA(3), AGG(6), CGA(3), CGC(2), CGT(1), CGG(0)
S Ser	AGC(14), AGT(5), TCA(10), TCC(7), TCG(10), TCT(15)
T Thr	ACA(16), ACC(6), ACG(8), ACT(8)
V Val	GTA(8), GTC(8), GTG(5), GTT(11)
W...Trp	TGG(5)
Y Tyr	TAC(8), TAT(10)

De los **532** aminoácidos presentes en la estructura primaria de la proteína codificada por *lip1*, **26** son básicos (lisina o arginina), **43** son ácidos (ácido aspártico o ácido glutámico), **202** son hidrofóbicos (alanina, fenilalanina, isoleucina, leucina, triptófano y valina) y **165** son polares (asparragina, cisteína, glutamina, serina, tirosina y treonina). El aminoácido más frecuente es la **leucina** (11,84%), seguido por **serina** (12,46%) y **alanina** (9,21%). El punto isoeléctrico global calculado tiene un valor de **4,48**, adquiriendo a pH 7,00 una carga neta global de **-16,98**. La composición aminoacídica se presenta en la Figura 44 y la secuencia deducida de aminoácidos de la proteína codificada por el gen *lip1* se presenta en la Figura 45.

La proteína codificada por *lip1* (*lip1*) es una carboxilesterasa ("carboxylesterases type-B signatures, serine active site" – PROSITE PS00122) (Sigrist et al., 2002). Al igual que las lipasas y las serin-proteasas, en las esterasas la triada catalítica es formada por tres aminoácidos: una serina, un ácido glutámico o aspártico, y una histidina. La secuencia alrededor de la serina del centro activo está bien conservada, y es usada como "signature pattern". Es la secuencia **F-[GR]-G-x(4)-[LIVM]-x-[LIV]-x-G-x-S-[STAG]-G**. Como "signature pattern" secundaria fue seleccionada una región conservada situada en la sección N-

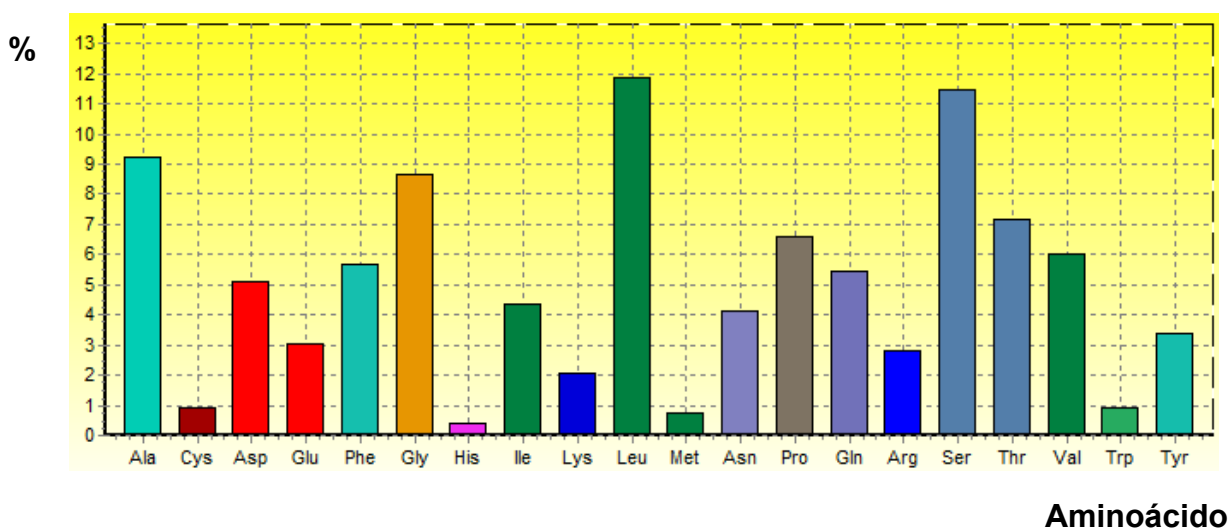
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

terminal, la cual contiene una cisteína implicada en un enlace disulfuro, la secuencia [EDA]-[DG]-C-L-[YTF]-[LIVT]-[DNS]-[LIV]-[LIVFYW]-x-[PQR].

En lip1 están presentes la secuencia **FGGDPDKVTLWGFSAG**, correspondiente a los aminoácidos **216 a 231**, y la secuencia **EDCLTLNVQRP**, entre las posiciones **115 y 125**.

La **serina** del centro activo de lip1 corresponde al residuo **229**, con una posición relativa similar a la existente en otras lipasas y estructura primaria coincidente con el consenso **G-x-S-x-G**, descrito como centro activo de lipasas.

Los otros dos residuos que conforman la triada catalítica pueden localizarse por comparación con las secuencias de otras lipasas. En la posición **361** está localizado el residuo ácido que en este caso es de **ácido glutámico**, y en la posición **474** se encuentra el residuo de **histidina** (como indicado en Figura 45).



Aminoácido	N	%	Aminoácido	N	%
Ala A	49	9,23	Met M	4	0,75
Cys C	5	0,94	Asn N	22	4,14
Asp D	27	5,08	Pro P	35	6,59
Glu E	16	3,01	Gln Q	29	5,46
Phe F	30	5,65	Arg R	15	2,82
Gly G	46	8,66	Ser S	61	11,49
His H	2	0,38	Thr T	38	7,16
Ile I	23	4,33	Val V	32	6,03
Lys K	11	2,07	Trp W	5	0,94
Leu L	63	11,86	Tyr Y	18	3,39

Figura 44 – Composición aminoacídica de la proteína codificada por el gen *lip1*.

“N” indica el número total de cada aminoácido; “%” indica el porcentaje respecto al total de aminoácidos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1	Met Phe Ser Leu Thr Thr <u>Leu Thr Gly Leu Leu Leu Ala Val Ala</u>	15
16	<u>Ser Asn</u> Ala Gln Leu Ala Gly Ala Asp Gly Pro <u>Thr Val Ala Leu</u>	30
31	Arg Tyr <u>Ser Thr Val Val Gly Ser Ser Ser</u> Asn Gly <u>Val Asp Ser</u>	45
46	<u>Phe Arg Gly Ile Pro</u> Tyr Ala Gln Pro Pro Val Gly Ser Leu Arg	60
61	Leu Lys Pro Pro Gln Pro Ile Thr Ser Ser Leu Gly Glu Val Gln	75
76	Ala Thr Ala Thr Pro Lys Ala <u>Cys</u> Pro Gln Phe Ser Ser Gln Phe	90
91	Thr Pro Ser Gly Leu Pro Pro Ala Leu Val Asp Ile Ile Thr Asn	105
106	Ile Ser Asn Val Val Gln Asn Gln Asp Glu Asp <u>Cys</u> Leu <u>Thr Leu</u>	120
121	<u>Asn Val Gln Arg</u> Pro Ser Asp Ala Ser Ser Gly Ser Lys <u>Leu Pro</u>	135
136	<u>Val Val Phe Phe Ile Tyr Gly Gly</u> Ala <u>Phe Glu Ser</u> Gly Ala Thr	150
151	Gln Gly Val Asp Ser <u>Thr Asn Leu Ile Gln Ala Ser Ile Ala</u> Ser	165
166	Gly Thr Pro <u>Ile Ile Phe Val Ala Ala</u> Asn Tyr Arg Leu Gly Gly	180
181	<u>Phe Gly</u> Phe Leu Ala Gly Lys Glu Leu Leu Asn Asp Gly Ser Thr	195
196	Asn Leu Gly <u>Leu Arg Asp Gln Arg Leu Ala Leu Gln Trp Val Ala</u>	210
211	<u>Asp Asn Ile Glu Gln Phe Gly Gly Asp Pro Asp Lys Val Thr Leu</u>	225
226	<u>Trp Gly Phe Ser Ala Gly</u> Ser Met Ser Val Phe Asp Gln Thr Ala	240
241	Leu Phe Gly Gly Asn Asn Ser Tyr His Gly <u>Lys Pro</u> Leu Phe Arg	255
256	<u>Ala Ala Leu Met Glu</u> Ser Gly Ser Ile Leu Pro Ala Glu Pro Ala	270
271	Asn Ser Thr Lys Ala Gln Leu Ile Tyr Asp Lys Val Val Asp Ser	285
286	<u>Ala</u> Gly <u>Cys</u> Ser Thr Ser <u>Ser Asp Thr Leu Ala Cys</u> Leu Arg Ser	300
301	Val Asp <u>Phe Asn Thr Phe Leu Leu Ala Ala Glu Ser Val Pro</u> Ile	315
316	Ser Ser Ser Tyr Asn Ser Ile Ala Leu Ser Tyr <u>Leu Pro Arg Pro</u>	330
331	Asp Gly Thr Val Leu Leu Asp Ser <u>Pro Glu Ile Leu Ala Ser</u> Arg	345
346	Gly Gln Phe Ala Lys Val Pro <u>Leu Leu Leu Gly Asp Gln Glu Asp</u>	360
361	<u>Glu Gly Thr Leu Phe</u> Ser Val Tyr Gln Leu Asn Leu Thr Ser <u>Thr</u>	375
376	<u>Gln Asp Val Glu Glu Tyr Leu Gly Ser Leu Tyr</u> Phe Gln Gln Ala	390
391	Thr <u>Ala Ser Gln Val Gln Asp Leu Val Ala Thr</u> Tyr Pro Asp <u>Asp</u>	405
406	<u>Pro Ser Ala Gly Ser Pro Phe</u> Arg Thr Gly Ser Leu Asn Ser Leu	420
421	<u>Tyr Pro Glu Tyr Lys Arg Leu Ala Ala Ile Leu Gly Asp Phe Ile</u>	435
436	<u>Phe Thr Leu Gln Arg Arg Ser Leu Leu Glu Thr Val Asp Gln Ile</u>	450
451	Ala Pro Ser Val Pro <u>Thr Trp Ser Phe Leu</u> Ser Ser Tyr Leu Tyr	465
466	Gly Thr Ala Phe Leu <u>Gly Thr Phe His</u> <u>Thr Thr Ser Gln Ile Ala</u>	480
481	<u>Ala Phe</u> Gly Leu <u>Ile Pro Gly Tyr Ala Ala Ala Val Thr Gln Glu</u>	495
496	<u>Phe Tyr Ile Ser Phe Phe Asn</u> Thr Met Asn Pro Asn Ser Asn Gly	510
511	Ser Ala Leu Leu Pro Thr Trp Pro Cys Trp Gly Ser Gly Lys Gln	525
526	Leu Pro Ile Gly Val Leu End 532	

Figura 45 – Secuencia deducida de aminoácidos de la proteína codificada por el gen *lip1*.

Aparecen en cursiva y subrayado los sitios más característicos de las lipasas: entre los residuos **134-144**, el hueco oxianiónico; de **216-231**, el patrón de las carboxilesterasas con serina en el centro activo. Los elementos

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

de la Tríada catalítica aparecen en un fondo amarillo: serina activa en la posición **229**; residuos de ácido glutámico y de histidina de la triada catalítica en las posiciones **361** y **474**, respectivamente. De **1-23**, péptido señal. Sitios potenciales de N-glicosilación (**105, 245, 271, 371 y 509**; a naranja), de C-manosilación (**517**; a rosa) y probable de N-miristilación (**37**; a púrpura). Respecto a la estructura secundaria de la proteína, aparecen marcadas en la secuencia como recuadros color de vino las conformaciones extendidas tipo lámina β y como recuadros azules con fondo gris las conformaciones de hélice α , según la predicción realizada a través del servidor Phyre (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2>). Los recuadros fúcsia se sitúan alrededor de cisteínas involucradas en la formación de puentes disulfuro (ligaciones entre las cisteínas en las posiciones **83** y **117**, y las posiciones **288** y **297**, respectivamente).

En general, aquellas proteínas cuyo destino final en la célula se encuentra determinado por su entrada en el retículo endoplasmático tienen una secuencia señal, en su extremo amino terminal con características típicamente hidrofóbicas. La predicción de posibles péptidos señal según el método de von Heijne (Nielsen et al., 1997; Bendtsen et al., 2004) indica que lip1 incluye una secuencia señal, constituida por los primeros 23 aminoácidos, lo que implica la entrada de esta proteína en el retículo endoplasmático (Larriba, 1993).

Pueden existir otras regiones de la proteína, marcadamente hidrofóbicas que contribuyan a la localización celular de esta. En la Figura 46 se muestra el perfil hidropático de lip1 según el algoritmo de Kyte & Doolittle (1982). De acuerdo con el servidor TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>), no se predicen la existencia de helices transmembrana en lip1 (Figura 47), cuya ubicación será el exterior de la célula.

Entre las modificaciones postraduccionales en proteínas, la glicosilación es probablemente la más abundante, y la más compleja por todos los pasos enzimáticos implicados (Walsh, 2006). Los tipos de glicosilación se clasifican de acuerdo a la identidad del átomo del aminoácido a que se une la cadena de carbohidratos, es decir, C-glicosilación, N-glicosilación³⁶ u O-glicosilación. Las N- y C-glicosilación tienen lugar en el retículo endoplasmático y/o aparato de Golgi y sólo ocurren en proteínas extracelulares o secretadas (UniProt, 2015). Al contrario, la O-glicosilación puede ocurrir tanto en proteínas intracelulares como extracelulares (UniProt, 2015).

En la N-glicosilación se reconoce el consenso **N-x-S/T**; sendo x cualquier aminoácido, excepto prolina (Lodish, 2000). De acuerdo con las búsquedas en UniProt (<http://www.uniprot.org>), el motivo **N-x-T** es más frecuente que el **N-x-S**, y más raramente puede ocurrir en **N-x-C**. Lip1 presenta cinco posibles sitios de N-glicosilación en los residuos de asparragina en las posiciones **105, 245, 271, 371 y 509** (Combet et al, 2000).

En C-glicosilación o C-manosilación, en que el azúcar (manosa) se une a la proteína a través de un enlace entre dos átomos de carbono (Furmanek & Hofsteenge, 2000), se

³⁶ La N-glicosilación es un evento co-traducciona que empieza en el retículo endoplasmático.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

reconoce el motivo (**W-x-x-W**), siendo manosilado el primer triptofano (Ihara et al., 2005), o los dos (UniProt, 2015). Además se reconoce el motivo **W-S/T-x-C** (UniProt, 2015). En lip1 hay un sitio posible de C-manosilación en el residuo de triptofano de la posición **517**.

No se han identificado sitios de O- glicosilación en lip1.

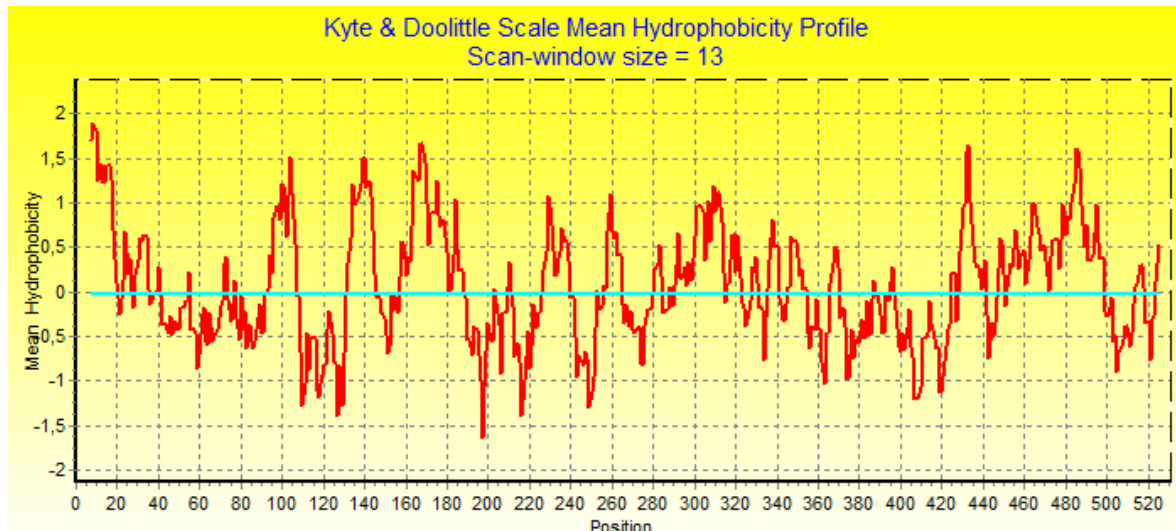


Figura 46 – Predicción de posibles péptidos señal en la proteína lip1.

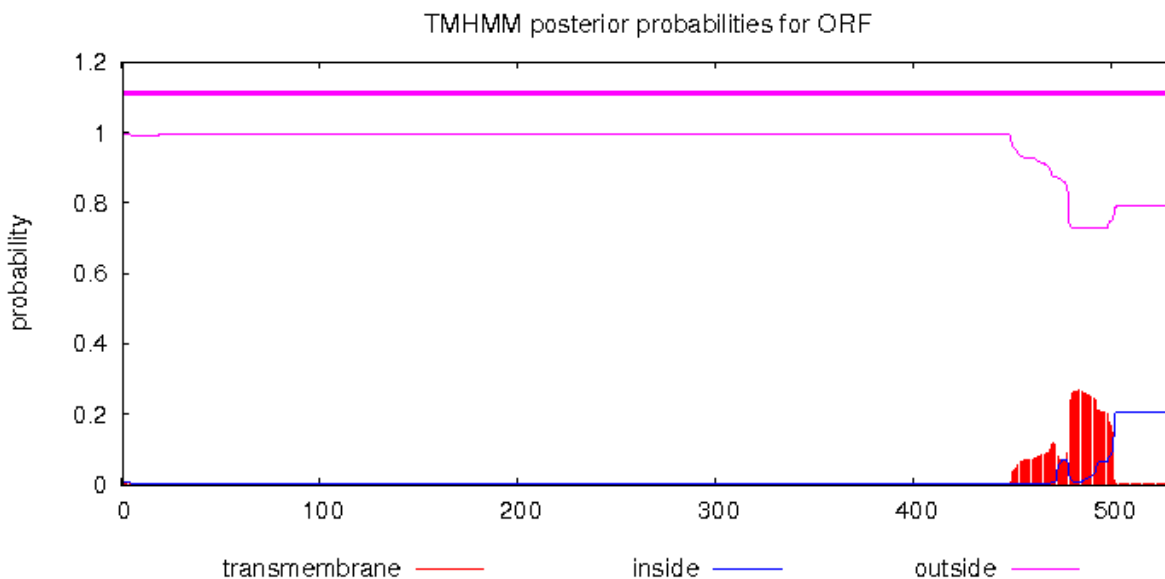


Figura 47 – Predicción de posibles hélices transmembrana en la proteína lip1 (Sonnhammer et al., 1998; Krogh et al., 2001).

La N-miristilación es una lipidación de proteínas que ocurre en el extremo amino-terminal de las proteínas (Devlin, 2004). De acuerdo con las predicciones realizadas en

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

<http://prosite.expasy.org/scanprosite/>, en lip1 hay 13 sitios probables de N-miristilación en los aminoácidos **9, 37, 48, 94, 143, 148, 152, 243, 287, 362, 415, 471 y 483**. El motivo reconocido es **G-{EDRKHPFYW}-x(2)-[STAGCN]-{P}** (Hulo et al., 2006; Battaner, 2012). La N-miristilación ocurre en la glicina, y consiste en la unión covalente a un ácido graso saturado en C14 (miristato). La N-miristilación aumenta la hidrofobicidad de la cadena polipeptídica, siendo necesaria para el anclaje de la proteína a la membrana celular (Mehlhorn, 2011). Por análisis del alineamiento de lip1 con proteínas semejantes en las bases de datos se verificó que las glicinas en las posiciones 37 y 48 están en zonas muy conservadas en lipasas, y en la región amino-terminal, por lo que una de ellas podrá estar involucrada en la ligación a un miristolato.

Se predicen para la proteína lip1 23 sitios potenciales de fosforilación de acuerdo con el programa NetPhos 2,0 (Blom et al., 1999) en <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/> (Figura 48), correspondiendo 16 a fosforilaciones de serina (en los residuos **46, 47, 53, 134, 137, 138, 240, 242, 280, 293, 324, 325, 346, 418, 450 y 485**), cinco a fosforilaciones de treonina (en los residuos **42, 87, 99, 298 y 383**), y dos a fosforilaciones de tirosina (en los residuos **59 y 327**). La búsqueda de motivos en PROSITE <http://prosite.expasy.org/scanprosite/>, de acuerdo con De Castro et al. (2006) ha detectado cinco sitios potenciales de fosforilación por la proteína quinasa C, y seis de fosforilación por la caseína quinasa II. En el primero caso es reconocido el motivo **S/T-x-R/K** en los aminoácidos **45, 58, 79, 272 y 522**. En el segundo caso es detectada la secuencia **S/T-x-x-D/E** en los aminoácidos **70, 234, 290, 374, 401 y 442**. En los dos casos ocurre la fosforilación del residuo de serina o de treonina.

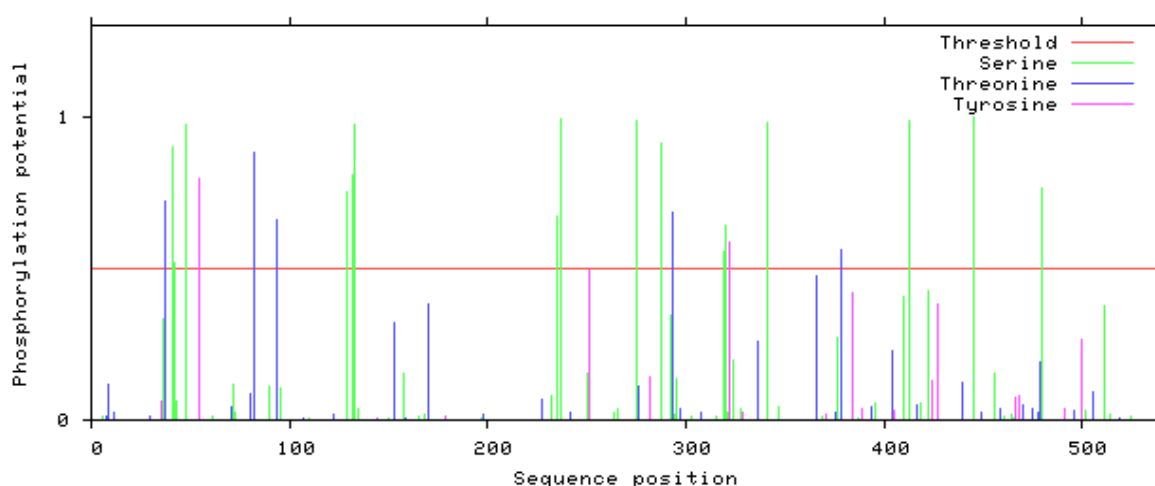


Figura 48 – Predicción de sitios de fosforilación en *lip1* (Blom et al., 1999).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La sumoilación es un sistema de modificación postraduccional en eucariotas. Consiste en la unión covalente de un péptido similar a la ubiquitina denominado SUMO ("small ubiquitin-like modifier"), de 11kDa, a algunas proteínas. Es un proceso de regulación génica, que consiste en modificar las proteínas de un organismo, uniéndoles otra pequeña proteína, y afecta a proteínas implicadas en numerosos procesos celulares. Como consecuencia de la adición, se modifican las propiedades de la proteína sumoilada. Ese cambio puede afectar a su actividad enzimática, a su localización dentro de la célula o a su capacidad de interacción con otras proteínas.

La mayoría de las proteínas modificadas por sumoilación contienen el motivo **B-K-x-D/E**, donde **B** es un residuo hidrofóbico, **K** es la lisina conjugada a SUMO, **x** es cualquier aminoácido, **D** o **E** son residuos ácidos. La probabilidad de ocurrir sumoilación en una proteína se puede predecir con la aplicación SUMOplot™ Analysis Program, de Abgent (accedida en <http://www.abgent.com/sumoplot>).

En la proteína codificada por *lip1* hay dos secuencias con elevada probabilidad de ocurrencia de este tipo de modificación (**LKPP** y **AKVP**). Su localización se describe en la Tabla 22.

Tabla 22 – Sitios con probabilidad de ocurrencia de sumoilación.

Posición	Grupo	"Score"/Probabilidad
K62	VGSLR LKPP QPITS	0,80
K350	SRGQF AKVP LLLGD	0,69

De acuerdo con las predicciones recogidas en el servidor DiANNA 1.1 <http://clavius.bc.edu/~clotelab/DiANNA/> (Ferrè & Clote, 2005a,b; 2006) hay cuatro cisteínas involucradas en la formación de puentes disulfuro [ligaciones entre las cisteínas en las posiciones **83** y **117**, y en las posiciones **288** y **297**, respectivamente, o sea Cys83-Cys117 (score = 0,99728) y Cys288-Cys297 (score = 0,99735)].

El sistema de redes neurales del "Pôle BioInformatique Lyonnais/Network Protein Sequence Analysis" (<http://npsa-pbil.ibcp.fr>) predice para la proteína *lip1* una estructura secundaria típica de las α/β hidrolasas, en la que se alternan varios dominios en conformación de hélice α con dominios en conformación de lámina β (Figura 49). La serina activa se localiza al final de una estructura de lámina β , lo cual es típico de este tipo de centro activo.

Este resultado está de acuerdo con la predicción estructural hecha en el servidor Phyre2 (Kelley & Sternberg, 2009), en base a la homología de *lip1* con la proteína cristalizada 4BE4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

de *Ophiostoma picea* en conformación cerrada (Gutiérrez-Fernández, et al., 2014; DOI:10.2210/pdb4be4/pdb, con código de acceso Q2TFW1 en UniProt). La proteína 4BE4 es una esteroles esterasa (E.C. 3.1.1.13) de 549pb, y 52% de identidad con lip1. El alineamiento entre residuos de las dos proteínas de acuerdo con el algoritmo de Clustall (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) se encuentra en la Figura 50. La predicción de la estructura secundaria se ha basado en el análisis de 534 residuos del ORF deducida de lip1, con una confianza de 100%, y se representa en la Figura 51.

En la Figura 52 se puede observar las representaciones de 4BE4 de *O. picea* y de lip1 de *T. harzianum*, lado a lado, evidenciando la semejanza de sus estructuras secundarias, en la región de la tríada catalítica, así como la superposición de las dos proteínas.

Ese modelo estructural identifica la tríada catalítica de lip1 (**S229**, **E361** y **H474**) y predice a los aminoácidos que constituyen el hueco oxianiónico, representados en las Figuras 53 y 54 (residuos enmarcados a naranja en la Figura 53), así como los que están involucrados en la ligación al sustrato.

Son ellos los residuos **GGA (142-144)**, **FSA (228-230)**, **M (233)**, **Y (381)**, **LY (385-386)**, **L (431)**, **T (475)** y **Q (478)**.

En Q2TFW1 no se encuentra la secuencia **GGA (142-144)** de B0B099, pero sí **GGG (133-135)**, como acontece en la mayoría de las lipasas, incluso en las lipasas lip1 (P20261), lip2 (P32946), lip3 (P32947), lip4 (P32948) y lip5 (P32949) de *Candida rugosa*. En alineamientos

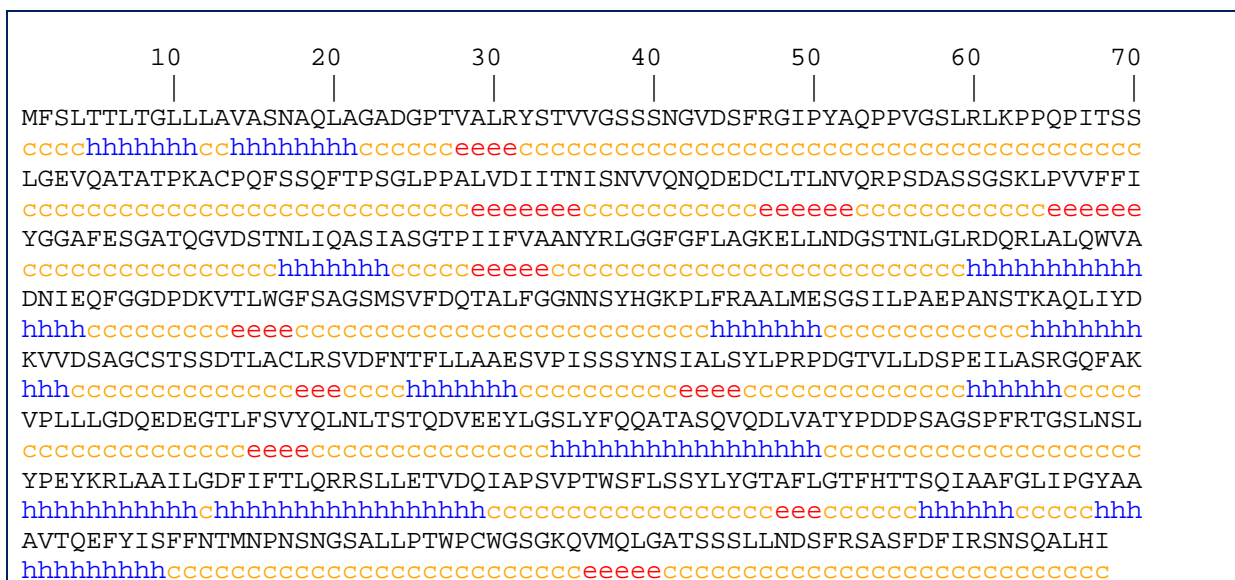


Figura 49 – Predicción de la estructura secundaria de lip1 de acuerdo con el "Hierarchical Neural Network" (Combet et al., 2000). h representa la conformación en hélice α (23,30%); e la conformación en lámina β (9,14%) y c (67,56%) los bucles y vueltas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

```

tr|Q2TFW1|Q2TFW1_9PEZI      -----MPKRRDQSIEPRITTVNVNYPEGEVVGVSVLGIESFRGVP 39
tr|B0B099|B0B099_TRIHA      MFSLTTLTGLLLAVASNAQLAGADGPTVALRYSTVVGSSSNGVDSFRGIP 50
                               :. :. :. * . *** * *::****:*

tr|Q2TFW1|Q2TFW1_9PEZI      FAQPPVGNLRLKPPVRYTENIGTKDITGIGPSCPQMYLSTGNGELLFQLV 89
tr|B0B099|B0B099_TRIHA      YAQPPVGSRLRLKPPQPITSSLGEVQATATPKACPQFSSQFTPSGLPPALV 100
                               :*****:***** *..* :*. :***: . . * **

tr|Q2TFW1|Q2TFW1_9PEZI      GNLINIPLFQTATLSSEDCLILNIQRPAGTTSNSSLPLVFWIFGGGFELG 139
tr|B0B099|B0B099_TRIHA      DIIITNIS--NVVQNQEDEDCLILNVQRPSDASSGSKLPVVFFIYGGAFESG 148
                               . : ** . :. . .*****:***:..*:.*.***:~*~*~*~*~*

tr|Q2TFW1|Q2TFW1_9PEZI      TNQYYDGIDLLTEGISLGEPPFIFVAINYRVGGFGLGGKEIKADGSSNLG 189
tr|B0B099|B0B099_TRIHA      ATQGVDSTNLIQASIASGTPIIFVAANYRLGGFGLAGKELLNDGSTNLG 198
                               :.* * . :* : * * *~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*

tr|Q2TFW1|Q2TFW1_9PEZI      LLDQRIALEWVADNIASFGGDPSKVTIWGESAGSISVFDQMALYGGNNKY 239
tr|B0B099|B0B099_TRIHA      LRDQRLALQWVADNIEQFGGDPDKVILWGSAGSMSVFDQTALFGGNNSY 248
                               * ~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*

tr|Q2TFW1|Q2TFW1_9PEZI      KGKALFRGGIMNSGSVVPAAPVDGVKAQAIYDHVVSEAGCAGISDTLACL 289
tr|B0B099|B0B099_TRIHA      HGKPLFRAALMESGSILPAEPANSTKAQLIYDKVVDSAGCSTSSDTLACL 298
                               :~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*

tr|Q2TFW1|Q2TFW1_9PEZI      RTVDYTKFLIAVNSVPGIVSYSSIALSYLPRPDGVVLIDSPEEIVKNKQY 339
tr|B0B099|B0B099_TRIHA      RSVDFNTFLLAAESVPISSSYNSIALSYLPRPDGTVLLDSPEILASRGQF 348
                               *~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*

tr|Q2TFW1|Q2TFW1_9PEZI      AAVPMIIGDQEDEGTLFAVLPNNITSTAKIVQYFQDLYFYNATKEQLTAF 389
tr|B0B099|B0B099_TRIHA      AKVPLLLGDQEDEGTLFSVYQLNLTSTIQDVEEYLGSLYFQQATASQVQDL 398
                               * ~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*

tr|Q2TFW1|Q2TFW1_9PEZI      VNTYPTDITAGSPFNTGIFNELYPGFKRLAAILGDMTFLARRAFLQLCS 439
tr|B0B099|B0B099_TRIHA      VATYPDDPSAGSPFRIGSLNSLYPEYKRLAAILGDFIFTLQRRSLETVD 448
                               * ~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*

tr|Q2TFW1|Q2TFW1_9PEZI      EVNPDVPSWSYLASYDYGFPLGTFHATDILQVFYGVLPNYASGSIQKYY 489
tr|B0B099|B0B099_TRIHA      QIAPSVPTWSFLSSYLGTAFLGTFHTSQIAAF-GLIPGYAAAVTQEFY 497
                               :. :~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*

tr|Q2TFW1|Q2TFW1_9PEZI      INFVITGDPN-KGAAVDIQWPQSAKKNILQIYATKAVIVADNFRAKSYE 538
tr|B0B099|B0B099_TRIHA      ISFNTMNPNSNGSALLPTWPCWGSGKQVMQLGATSSSLLNDSFRSASFD 547
                               *~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*

tr|Q2TFW1|Q2TFW1_9PEZI      YLYNNIGIFRI 549
tr|B0B099|B0B099_TRIHA      FIRSNSQALHI 558
                               :. :~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*~*

```

Figura 50 – Alineamiento de las estructuras primarias de las proteínas Q2TFW1 de *O. picea* y B0B099 de *T. harzianum*, de acuerdo con el algoritmo de Clustal (Larkin et al., 2007).

múltiples efectuados según el algoritmo FASTA (Pearson & Lipman, 1988) sólo un pequeño número de lipasas/carboxilesterasas presentaba el motivo **GGA** encontrado em B0B099.

Eso motivo fue detectado en las proteínas E5A5B3_LEPMJ, de *Leptosphaeria maculans*; C5FYT5_ARTOC, la colinesterasa de *Arthroderma otae*, E4UVE6_ARTGP y K1WRG1_MARBU, las lipasas 4 de *Arthroderma gypseum* y de *Marssonina brunnea* f. sp. *multigermtubi*, respectivamente; W9C253_9HELO, la lipasa de *Sclerotinia borealis* F-4157; las proteínas O00748 - EST2_HUMAN y Q5XG92 - EST4A_HUMAN, una cocaina esterasa

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

(o carboxilesterasa 2) y la carboxilesterasa 4A de *Homo sapiens*, respectivamente, y en O70631_RAT, una carboxilesterasa de *Rattus norvegicus*.

Cuanto a la secuencia **FSA** (posición 228-230 en lip1, abarcando la serina del centro activo), la presencia del residuo **F** parece ser característico de B0B099, una vez que la

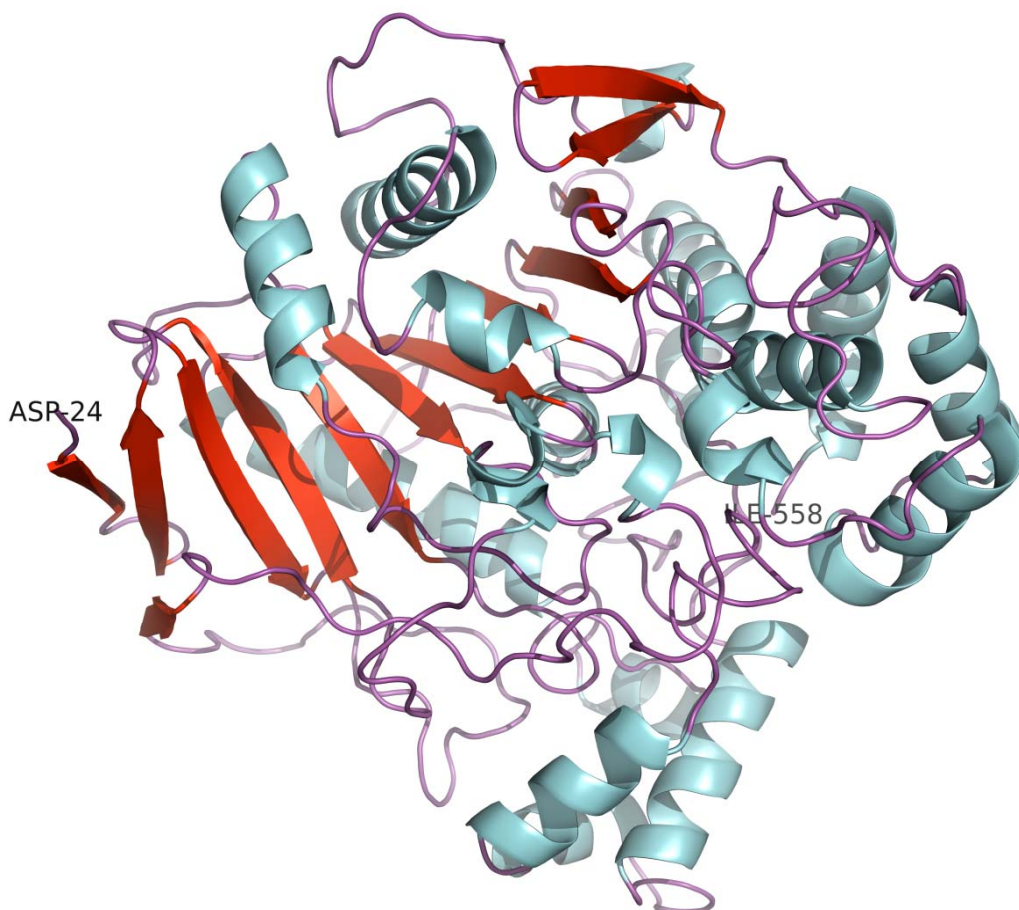


Figura 51 – Representación gráfica de la predicción de la estructura tridimensional de lip1. La predicción estructural se ha hecho en el servidor Phyre2³⁷ en base a la homología de lip1 con la proteína cristalizada 4be4 de *Ophiostoma picea* en conformación cerrada (con código de acceso Q2TFW1 en el “Protein Data Bank”³⁸). Las cintas onduladas rojas con punta de flecha representan las regiones con conformación de lámina β y las cintas en espiral azules aquellas con conformación de hélice α . Las zonas de bucles o vueltas aparecen representadas como elementos tubulares de color púrpura. El residuo de asparragina (Asp24) indica el extremo amino-terminal, el de isoleucina (Ile558) el carboxilo-terminal. La representación se ha realizado a partir de los datos correspondientes a la elucidación teórica utilizando el programa PyMol.

³⁷ <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>

³⁸ <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

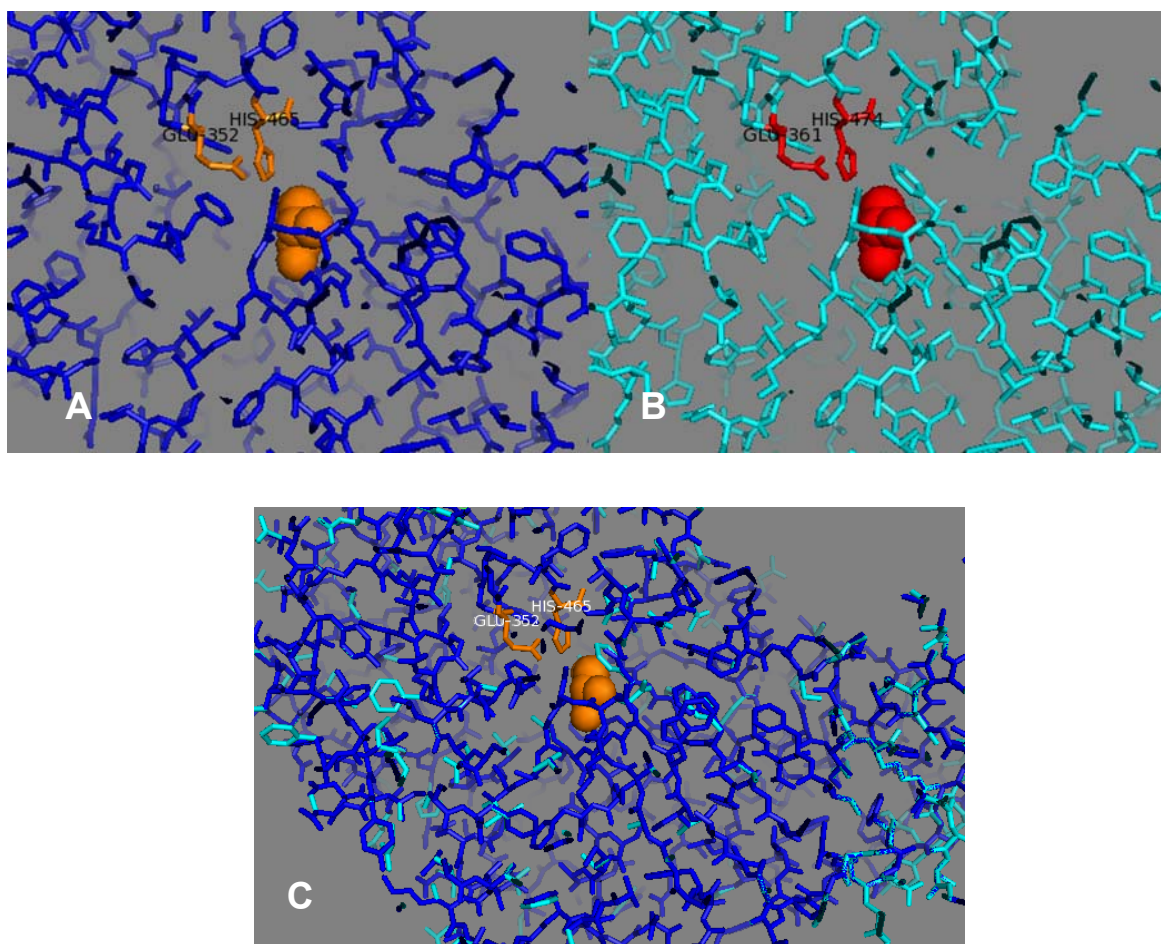


Figura 52 – Representación predictiva de las estructuras tridimensionales de 4BE4 de *O. picea* (A) y de lip1 de *T. harzianum* (B), y su superposición (C). A azul se representa la cadena de 4BE4, a turquesa la de lip1.

mayor parte de las lipasas presenta el motivo **GESAG**, incluyendo Q2TFW1 (219-221), las lipasas de *C. rugosa* previamente referidas, y Q6S5M9 de *C. cylindracea*. En algunas otras, el residuo **E** aparece sustituido por otros residuos tales como **N** (en C3Z014_BRAFL, una putativa lipasa de *Branchiostoma floridae* (un metazoario), **Q** (en Q5XG92 - EST4A_HUMAN, una carboxilesterasa de *H. sapiens*; e en C3YFM5, otra presumible proteína de *Branchiostoma floridae*), **V** (en O70631_RAT, una carboxilesterasa de *Rattus norvegicus*) o **T** (en D2CQL4 _BLUGR, la lipasa 1 de *Blumeria graminis*).

Los residuos **Y (381)**, **LY (385-386)** y **L (431)** de B0B099 corresponden a los **Y (372)**, **LY (376-377)** y **L (422)** de Q2TFW1. Los residuos **M (233)** y **T (475)** son sustituciones conservativas de **I (224)** y de **A (466)** de Q2TFW1, existiendo el primero en las lipasas 1 y 2 de *C. rugosa* y en la de *C. cylindracea*. El residuo **Q (478)** es una sustitución no conservativa de **I (469)**. Las dos secuencias tienen una "signature pattern" secundaria casi igual, así la

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

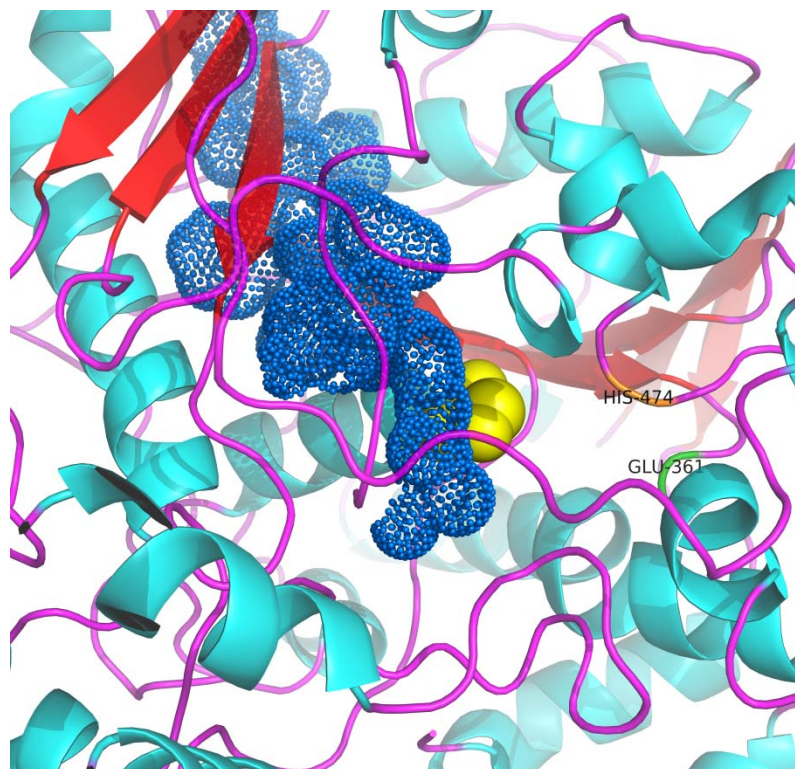


Figura 53 – Pormenor de lip1 evidenciando la tríada catalítica y el hueco oxianiónico. La serina del centro activo (S229) se representa a amarillo. El hueco oxianiónico se representa por puntos azules.

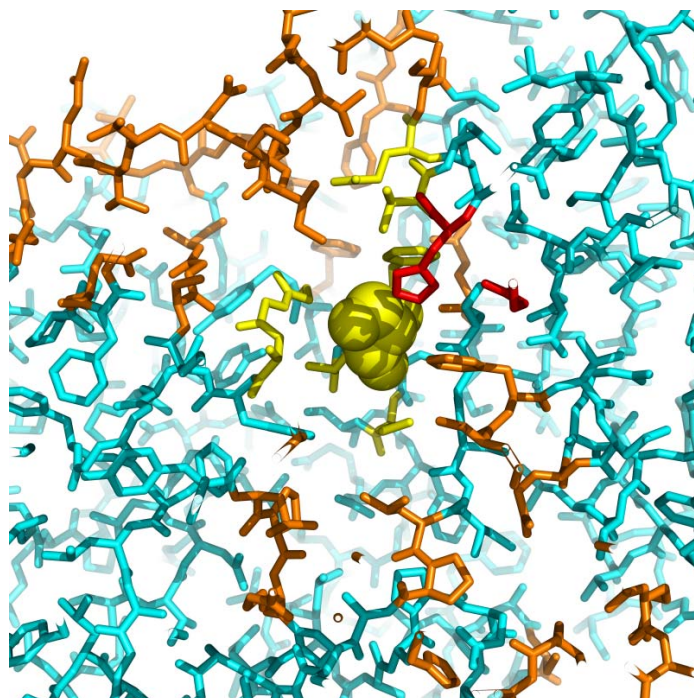


Figura 54 – Tríada catalítica y hueco oxianiónico. La serina del centro activo (S229) y los residuos involucrados en la ligación al sustrato se representan a amarillo. El ácido glutámico (E361) y la histidina (H474) se representan a rojo. A naranja los residuos involucrados en la formación del hueco oxianiónico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

secuencia **EDCLTLNVQRP** de lip1 solamente difiere de **EDCLTLNIQRP** de Q2TFW1 por la sustitución conservativa de **I (113)** por **V (122)**. En las dos existe un residuo **Q** no canónico.

Por comparación entre las estructuras tridimensionales de 4BE4 y de lip1, se predice la región de la tapadera (“lid” o “flap”) de lip1 (Figura 55), constituida por una α -helice (residuos **99-107**) y flanqueada por dos “loops” que terminan en una puente disulfuro (**Cys 83-Cys117**), pero exceptuando las cisteínas involucradas en la ligación S=S, insertadas en regiones bien conservadas, los restantes aminoácidos presentan alguna variabilidad entre las secuencias de las dos proteínas, incluso en lip1 hay dos aminoácidos menos en el “loop” próximo a **Cys117**.

Las isoenzimas de lipasas de *C. rugosa* tienen entre sí una identidad de cerca de 80%, pero difieren en la secuencia aminoacídica de la tapadera. Una vez que, en las enzimas en conformación activa, estos aminoácidos participan en la unión al sustrato y contribuyen a su reconocimiento, pequeñas alteraciones en este sitio se traducen en actividades enzimáticas distintas (Mancheño et al., 2003; Barriuso et al., 2013).

Así, en *C. rugosa*, la sustitución de la tapadera de la isoenzima lip1 por la de lip3 fue suficiente para conferir a lip1 actividad colesterol esterasa (Brocca et al., 2003). De acuerdo con estos autores, el número de aminoácidos hidrofóbicos presentes en la tapadera está relacionado con la especificidad de la enzima para el sustrato. Se verificó en *C. rugosa* que

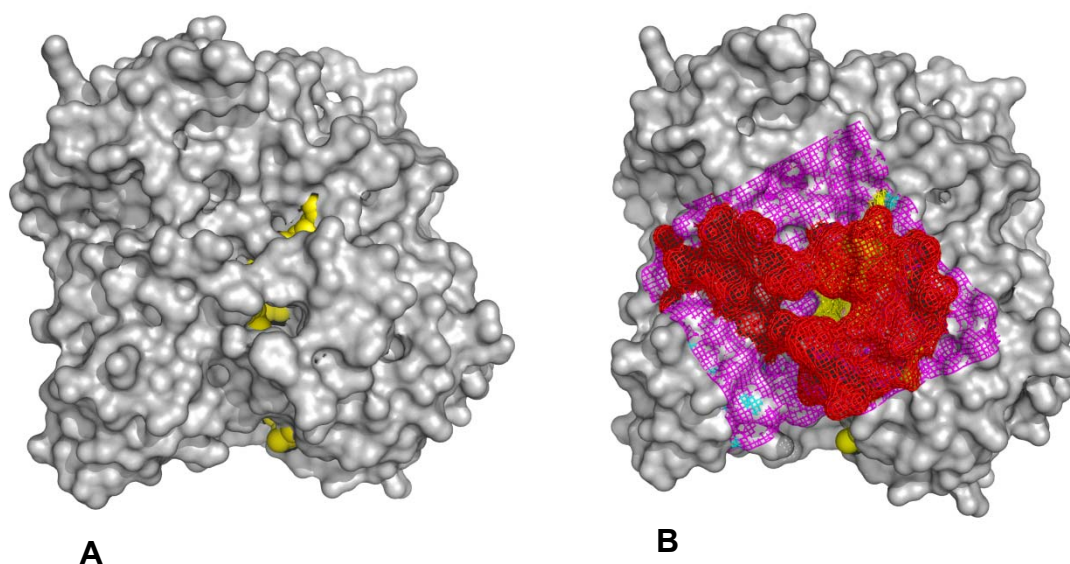


Figura 55 – Lip1 con la localización de los residuos involucrados en la ligación al sustrato (“substrate binding pocket”) (A), y posible posición de la tapadera (“lid” o “flap”) (B). Residuos de ligación al sustrato representados a amarillo, los de la tapadera a fucsia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

las isoformas con un número más elevado de residuos hidrofóbicos en la tapadera poseían una mayor actividad en esterol ésteres que en triglicéridos, según la secuencia lip2 > lip3 > lip1 (con 12, 10, y 8 residuos hidrofóbicos, respectivamente) (Mancheño et al., 2003). De acuerdo con estos datos, la proteína Q2TFW1 de *O. picea*, con 13 residuos hidrofóbicos en la tapadera tendrá una actividad esterol esterasa mayor do que *C. rugosa* lip3 (Calero-Rueda et al., 2009), mientras *T. harzianum* lip1, sólo con 10 presentará mayor actividad en triglicéridos.

En todas las α/β hidrolasas con estructura tridimensional conocida, el residuo nucleófilo (serina) se localiza en una corta vuelta, conocida como codo nucleofílico, donde puede ser acercado por el sustrato y por la molécula de agua (Mancheño et al., 2003). Q2TFW1, no es una excepción. En lip1 se predice una localización idéntica para **S229**.

Para confirmar el modelo estructural obtenido para lip1 se hizo una segunda predicción en el servidor Swiss-Model (<http://swissmodel.expasy.org>; Arnold et al., 2006; Benkert et al., 2011; Biasini et al., 2014). De acuerdo con este servidor se elaboraron distintos modelos tomando como diana proteínas cristalografadas existentes en la librería de Swiss-Model (SMTL³⁹). Los ocho más representativos fueron, en esta orden: la estructura 4be9.1 (SMTL), correspondiente a la esterol esterasa de *O. picea* en conformación abierta (en la forma dimerica, la que es enzimáticamente activa) con un GMQE⁴⁰ de 0,79, seguida de la estructura 4be4.1 (SMTL), correspondiente a la misma esterol esterasa en conformación cerrada (en la forma monomeric, enzimáticamente inactiva, de acuerdo con la cual se hicieron las predicciones estructurales de lip1 ya descritas, con un GMQE de 0,79), y por más cuatro otras variantes de las proteínas anteriores, todas descritas por Gutiérrez-Fernández et al. (2014). En séptima y octava posición figuran las estructuras 1gz7.1 y 1crl.1, correspondientes a las lipasas 2 (Mancheño et al., 2003) y 1 (Grochulski et al., 1993) de *C. rugosa* (P32946 y P20261 UniProt), en forma monomeric y en conformación cerrada y abierta, respectivamente. Las dos primeras estructuras (4be9.1 y 4be4.1) presentan una identidad de 52,25% con lip1; las dos últimas solamente 42,29% (1gz7.1) y 41,90% (1crl.1), respectivamente (Altschul et al., 1997; Remmert et al., 2012).

La estructura de 4be9 fue determinada experimentalmente por difracción de rayos X, para una resolución de 2.00 Å, es homodimerica y además de algunos ligandos no funcionales (gliceroles, iones nitrato,...) tiene como modificaciones postraduccionales la existencia de tres enlaces a moléculas de N-acetil-D-glucosamina (C₈H₁₅NO₆). Su modelo estructural se representa en Figura 56 en conjunto con la estructura superpuesta de 4be4, poniendo en evidencia las diferencias de conformación en la proteína debidas a la presencia de sustrato

³⁹ SMTL – Swiss-Model Template Library.

⁴⁰ GMQE – Global Model Quality Estimate.

(activación interfacial). Así, en presencia del sustrato los 37 aminoácidos que forman la tapadera de la colesterol esterasa de *O. picea* se movimentan de la posición B para A, permitiendo el acceso al sitio activo (Figura 56).

En la Figura 57 se representan las presumibles conformaciones de la tapadera de lip1, de acuerdo con el estado activo o inactivo de la enzima, tomando como modelo las estructuras 4be4 y 4be9 de la colesterol esterasa de *O. picea*.

4.4 “SOUTHERN BLOT” EN *TRICHODERMA* spp.

A través de experimentos de Southern Blot se intentó evaluar el número de copias de *lip1* en el genoma de *T. harzianum*, y la presencia de genes homólogos en los genomas de otros hongos del género *Trichoderma*: *T. atroviride*, *T. reesei* y *T. virens*.

4.4.1 Marcación de la sonda de hibridación

Para el marcaje de la sonda con digoxigenina se usó como molde el producto de amplificación por PCR del ORF de *lip1* con los oligonucleótidos pRSETb lip1F (5'- GAG GTA CCA TG TTC AGC CTC AC – 3') y pRSETb lip1R (5'- GTC AAG CTT TGA ACT AAA TAT G- 3'), de 1698 pb y purificado por geneclean, y no el ADN genómico. En el marcaje se usaron los oligonucleótidos F3 y R50. Los resultados del marcaje se representan en la Figura 58.

Así, en el carril 4 se aprecia una banda de cerca de 688pb, correspondiente al producto de amplificación esperado en la ausencia de digoxigenina. En los carriles 3 y 2 se encuentran bandas que aparentan un tamaño progresivamente superior debido a que tienen incorporado en su cadena cantidades crecientes de digoxigenina, que dificultan la progresión del ADN en el gel. A continuación, la sonda se limpió con geneclean, y se efectuó un “dot blot” para evaluar la mejor concentración de la sonda para su uso en los experimentos de hibridación.

4.4.2 Análisis por “Southern Blot”

En los experimentos para determinar el número de copias de *lip1* en el ADN genómico de *T. harzianum* T34, se usaron distintas endonucleasas en la restricción enzimática. Algunas de ellas cortaban una vez en la totalidad de la secuencia del gen, incluyendo las zonas del promotor y del terminador conocidas: *ClaI* (en la posición 1221), *NotI* (en la posición 21),

SacI (en la posición 1259), *SalI* (en la posición 3558) y *StuI* (en la posición 1286), otras la cortaban dos veces (*NcoI*, en las posiciones 3666 y 4490; *SacII*, en las posiciones 455 y 3685), una tres veces (*PvuII*, en las posiciones 400, 751 y 4591), otras no la cortaban (*XbaI*



Figura 56 – Representación gráfica de las estructuras tridimensionales de 4be9 y 4be4 de la proteína Q2TFW1 de *O. picea*.

4be9 (a turquesa): proteína cristalizada en conformación abierta, homodimerica, enzimáticamente activa; 4be4 (a fucsia) proteína cristalizada en conformación cerrada, monomérica y inactiva. Se hizo la superposición entre la proteína en conformación cerrada (4be4) y una de las cadenas de los monómeros de 4be9. Las flechas A e B indican la posición de la tapadera en las conformaciones abierta y cerrada, respectivamente. Las cintas onduladas con punta de flecha representan las regiones con conformación de lámina β y las cintas en espiral aquellas con conformación de hélice α . Las zonas de “vuelta” o “loop” aparecen representadas como elementos tubulares. La representación se ha realizado a partir de los datos correspondientes a la elucidación teórica utilizando el programa PyMol.

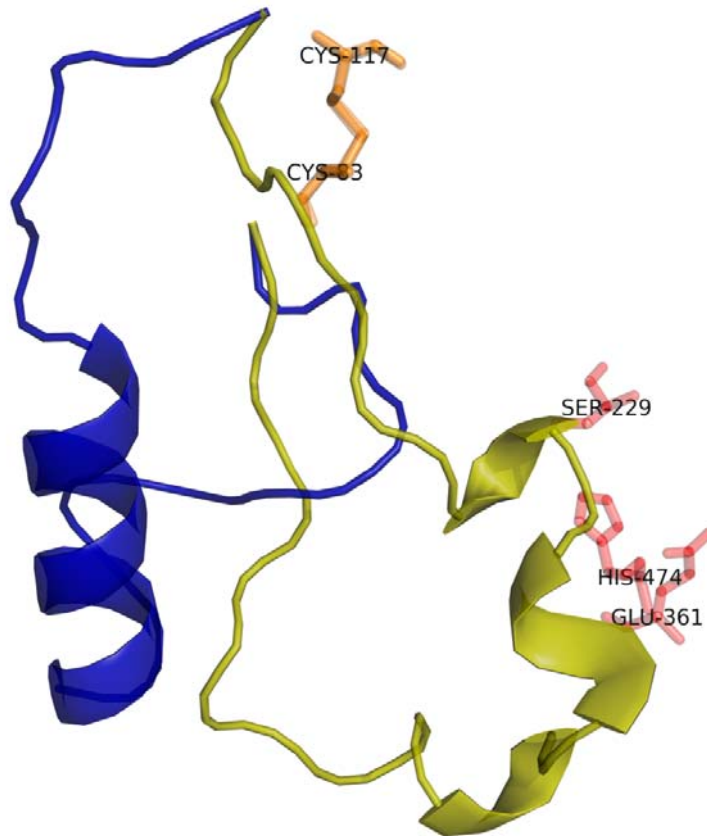


Figura 57 – Presumibles conformaciones de la tapadera en Lip1.

La conformación abierta de la tapadera, correspondiente al estado activo de la enzima, se representa a azul, y la conformación cerrada, protegiendo el acceso al centro activo (S229) se representa a amarillo. La tríada catalítica se representa a rojo, las cisteínas involucradas en la ligación por puente disulfuro se representan a naranja. La representación se ha realizado a partir de los datos correspondientes a la elucidación teórica utilizando el programa PyMol.

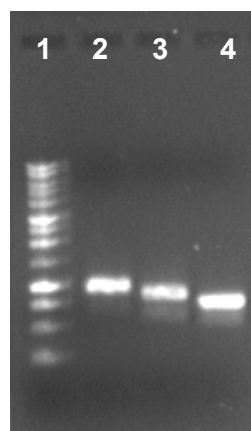


Figura 58 – Marcación de la sonda del gen *lip1* con digoxigenina.

Carril 1: Marcador de 1Kb, carriles 2, 3 y 4: sondas obtenidas con 70 μ M, 35 μ M y 0 μ M (control negativo) de dUTP marcado con digoxigenina.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

y *Xho*I). En la Figura 59 se encuentran representadas la distribución de estos sitios de reconocimiento en la secuencia de ADN genómico conocida.

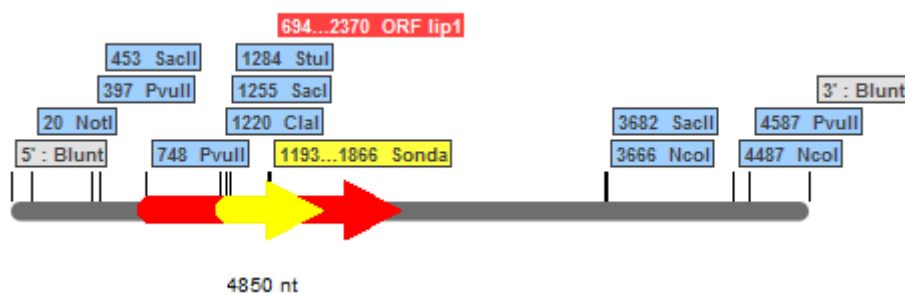


Figura 59 – Representación del fragmento de genómico conocido alrededor del ORF de *lip1*. Se encuentran señaladas las bases correspondientes al inicio de las secuencias de reconocimiento de las endonucleasas usadas en Southern Blot. Se indican las posiciones del ORF de *lip1* (en rojo) y de la sonda utilizada (en amarillo).

Además de digestiones enzimáticas sólo con una enzima (el caso de *Cla*I, *Sac*I, *Sal*I, *Stu*I, *Xba*I y *Xho*I), se usaron las asociaciones de dos enzimas distintas (*Nco*I + *Not*I y de *Stu*I + *Pvu*II).

Los resultados obtenidos se encuentran en la Figura 60. A la combinación *Nco*I + *Not*I corresponde un fragmento de 3645pb en el genómico de *T. harzianum* T34, y a la de *Stu*I + *Pvu*II, un fragmento de 3306pb. A su vez, *Sac*I origina un fragmento de 3229pb. En todas reacciones sólo se han detectado fragmentos únicos, pudiendo deducirse que *lip1* es un gen de copia única en el genoma de *T. harzianum*.

Para evaluar la presencia de genes homólogos en los genomas de *T. atroviride*, *T. reesei* y *T. virens*, se digirieron los ADNs genómicos de *T. atroviride*, *T. reesei* y *T. virens* con las endonucleasas *Sac*II, *Xho*I, *Not*I, *Stu*I y *Xba*I. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 61. Verificase que sólo el ADN de *T. harzianum* hibridó con la sonda.

Su análisis indica que no hay genes homólogos a *lip1* en estas especies del género *Trichoderma*, de las cuales se conoce la secuencia del genoma. Este resultado fue confirmado por BLASTn en <http://genome.jgi-psf.org/programs/fungi/genome-releases.jsf> y en <http://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/fasta/nucleotide.html>, por el programa FASTAx en la base de datos de EMBL.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

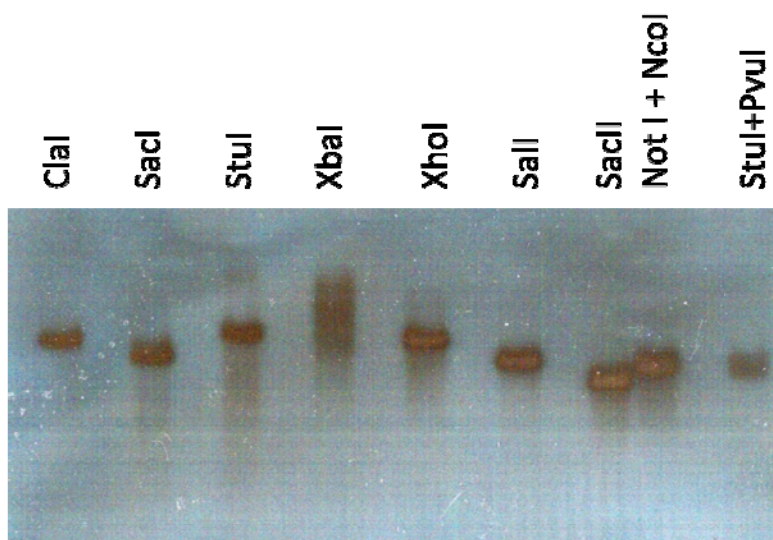


Figura 60 – Análisis por Southern blot del gen *lip1* en *T. harzianum*.

Se usaron las endonucleasas de restricción *Clal*, *SacI*, *Stul*, *XbaI*, *XhoI*, *SalI*, *SacII* (3229pb), *NotI+NcoI* (3645pb) y *Stul+PvuI* (3306pb). La hibridación ocurrió a 68°C en tampón 0,1XSSC; 0,1%SDS, usando como sonda un fragmento de 674pb del gen *lip1*.

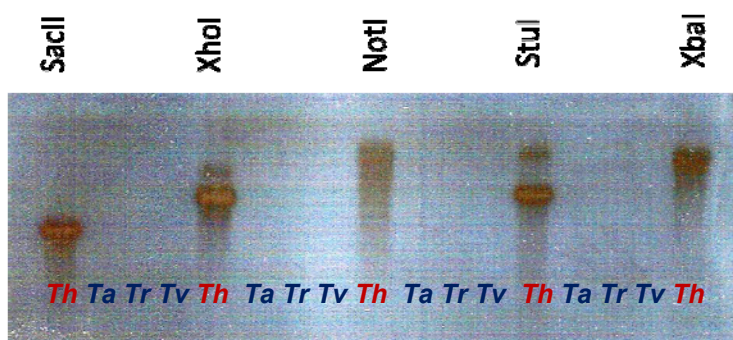


Figura 61 – Southern blot del gen *lip1* en diferentes especies del género *Trichoderma*.

La secuencia de ADN genómico en el gel fue: *T. harzianum* (*Th*), *T. atroviride* (*Ta*), *T. reesei* (*Tr*) y *T. virens* (*Tv*). Se usaron las endonucleasas de restricción *SacII*, *XhoI*, *NotI*, *Stul* y *XbaI*. La hibridación ocurrió a 62°C en tampón 0,5XSSC; 0,1%SDS, usando como sonda un fragmento de 674pb del gen *lip1*. Solamente el ADN de *T. harzianum* hibridó con la sonda.

4.5 EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE LA SECUENCIA NUCLEOTIDICA DEL GEN *LIP1*

4.5.1 Clonación en el vector pIB2

A partir del mapa de restricción de *lip1*, se seleccionaron enzimas que no cortasen el ORF, y simultáneamente existiesen en el sitio de clonación múltiple de pIB2. A continuación, se seleccionaron dos cuyas secuencias de reconocimiento eran más semejantes al inicio y al

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

final del ORF de *lip1*. Así, en los extremos 5' e 3' de la secuencia codificante de *lip1* se diseñaron oligonucleótidos adaptadores con los sitios de restricción de las endonucleasas *EcoRI* y *XhoI*, respectivamente - **EcoLip** (5'- GGC GAA TTC ATG TTC AGC CTC AC -3'), en el sentido directo y **XhoLip** (5'- TAC CTC GAG CTA AAT ATG TAG TGC CTG G-3') en el sentido inverso.

A continuación se realizaron PCRs utilizando estos oligonucleótidos para amplificar ADN genómico de *T. harzianum*. La secuencia resultante de 1696pb se purificó por geneclean y se subclonó en pGEM-T. El ADN plasmídico de los clones resultantes fue digerido con las endonucleasas *EcoRI* y *XhoI*, y de nuevo purificado. Se unió al pIB2 digerido con las mismas enzimas, desfosforilado y purificado por geneclean, obteniéndose el vector pIB2-*lip1* (Figuras 61 y 62).

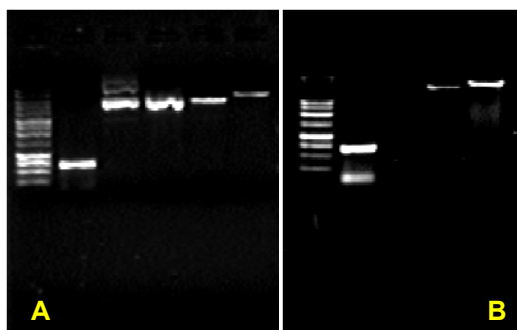


Figura 62 – Electroforesis de los plásmidos pIB2 y pIB2-*lip1* antes (A) y después de desfosforilación (B).

- A. Carril: 1 – Marcador de 1Kb; 2 – Marcador de intensidad (350ng); 3 – pIB2 no digerido; 4 – pIB2-*lip1* no digerido; 5 – pIB2 linearizado; 6 – pIB2-*lip1* linearizado;
- B. Carril: 1 – Marcador de 1Kb; 2 – Marcador de intensidad; 4 - pIB2 linearizado y defosforilado; 5 – pIB2-*lip1* linearizado y defosforilado;

Se transformaron células competentes de *E. coli* DH5 α con pIB2-*lip1* por choque térmico, y se plaquearon los transformantes. De la transformación se obtuvieron 22 colonias (designadas pLJ1, pLJ2,....., pLJ22), de las cuales se extrajo ADN plasmídico, que se digirió con las endonucleasas *EcoRI* y *XhoI*, y se observó en gel, para confirmar el éxito de la clonación. De los clones positivos se seleccionaron tres (pLJ4, pLJ11 y pLJ17), y se reconfirmó el clonación por secuenciación con **EcoLip** y **XhoLip**.

4.5.2 Integración en *P. pastoris* por electroporación y selección de clones pIB2-*lip1*

Para poder ser integrado en el genoma de *P. pastoris*, a nivel del gen *His4*, se linearizó pIB2-*lip1* con *Kpn2I* (*BspEI*), se desfosforiló y se purificó con geneclean. En el proceso de

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

transformación por electroporación se realizó como se indica en 3.7.2.2. Se usaron el vector pIB2 linearizado con *Kpn2I*, y agua como controles positivo y negativo, respectivamente. Las células transformadas se plaquearon en medio RD. Los transformantes se seleccionaron después de 5 días de incubación a 30°C, se transfirieron al medio RD líquido, y más tarde se plaquearon en placas de RD. Células de *P. pastoris* usadas como control negativo y como control positivo (electroporadas con una muestra de agua, o con pIB2-*lip1* linearizado, respectivamente) originaron colonias de color crema, al contrario de lo que sucedió con las células transformadas con pIB2-*lip1* linearizado, que originaron colonias de un color rosa intenso.

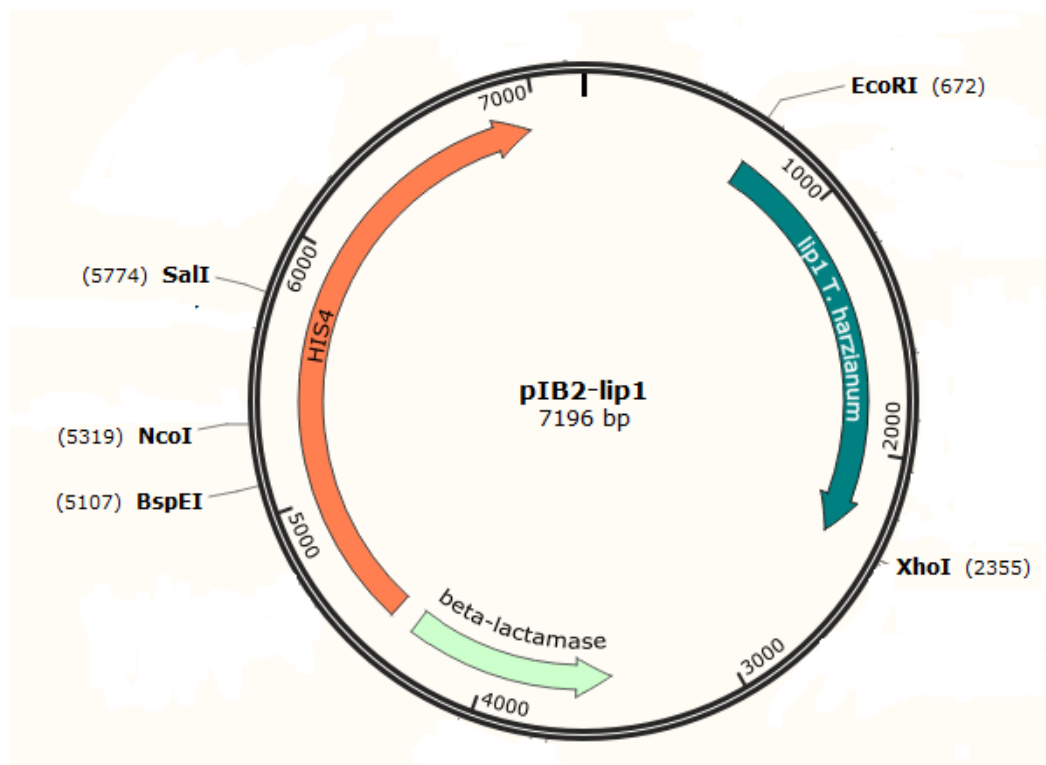


Figura 63 – El plásmido recombinante pIB2-*lip1*. Se representan los genes *His4*, de la β -lactamasa y *lip1* de *T. harzianum* T34.

La confirmación de clones transformados en *P. pastoris* se hizo por amplificación de ADN genómico de los transformantes por PCR, usando distintas combinaciones de oligonucleótidos, diseñados en *lip1* y en pIB2: **F514** (5'-TGG CAA TAA TAG CGG GCG GAC GC-3') + **nrev2** (5'-GGA ACC GCT TGA AGC ATC CGA GGG CC -3'), con un amplicón de cerca de 554pb⁴¹, cubriendo el encaje en el inicio del ORF, y **R756** (5'-GAC CGG TCT TCT CGT AAG TGC C-3') + **lurdjo11**, con un amplicón de cerca de 706pb⁴² (representado en la Figura 64), cubriendo el fin de la secuencia del ORF. Se hizo la comparación entre los tamaños de las

⁴¹ **nrev2** + **F514** – amplifica 396pb del inicio de la ORF y más 158pb de pIB2.

⁴² **lurdjo11** + **R756**= amplifica 654pb del fin de la ORF y más 52pb de pIB2.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

bandas obtenidas por PCR y esperadas, se limpiaron y al final se confirmaron por secuenciación. Los clones obtenidos se designaron pLJ1 a pLJ17.

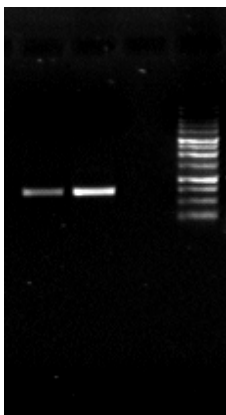


Figura 64 – Confirmación de la integración de *lip1* en el vector pIB2 (parte final del ORF).

4.5.3 Valoración de actividad lipásica en placa frente a distintos sustratos

Se hicieron ensayos previos para evaluar el crecimiento y la actividad esterásica/lipásica de los transformantes en medios con distintas concentraciones de glucosa y de tributirina/aceite. La expresión de la proteína codificada por *lip1* fue detectada en placas Petri usando medios con tributirina o en medios con distintos aceites y rodamina B, sustratos utilizados en la detección de las actividades esterásica y lipásica, respectivamente. En la Figura 65 se presentan algunos de los resultados de esos ensayos usando el clon pLJ4. Se observan halos debidos a actividad esterásica del transformante en los medios Agar Tributirina (Figura 65A y B), al contrario de lo que ocurre con la levadura no transformada, GS115, o a la transformada con el plásmido, pero sin inserto (GS115-pIB2). En medio ADL con aceite de oliva solamente se ha detectado la fluorescencia que es característica de la utilización de ácidos grasos por lipasas en el clon pLJ4 (Figura 65C).

En la Figura 66 se puede observar un ejemplo de los halos de fluorescencia obtenidos en placas Petri con medio ADL al 3% de aceite de maíz y con 0,1; 0,3 y 0,5% de glucosa (A, B y C, respectivamente) de ocho días tras inoculación. En esto ensayo, la fluorescencia fue visible al tercer día, sobretudo en la modalidad A (al 0,1% de glucosa), seguida de la B (al 0,3% de glucosa), y más en pLJ4 do que en los otros clones. Al octavo día la fluorescencia era más intensa en la modalidad B, seguido de la C, por lo que parece ser importante haber alguna glucosa en el medio para obtener más crecimiento inicial de los transformantes y por eso, una mayor utilización del lípido existente en el medio. Sin embargo, en un medio con

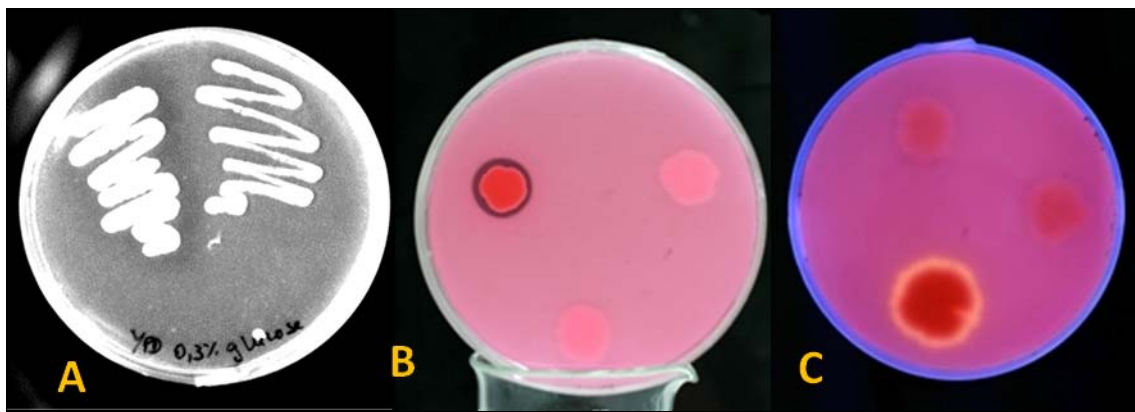


Figura 65 – Halos de actividad esterásica (A e B) y fluorescencia debidos a actividad lipásica) del clon pLJ4.

A – Agar Tributirina (glucosa al 0,3%; en la izquierda crecimiento de pLJ4; en la derecha crecimiento de *P. pastoris* GS115); **B** – Agar Tributirina (glucosa al 0,3%) modificado por adición de rodamina B al 0,02% (los crecimientos sin halo corresponde a *P. pastoris* GS115 y a *P. pastoris* GS115-pLB2); **C** – ADL, con aceite de oliva al 3% como sustrato lipídico. Los crecimientos observados en placa que no presentan halos o fluorescencia corresponden a la levadura no transformada (GS115) o a la transformada solamente con el plásmido pLB2 (sin inserto), usadas como controles negativos. En las dos placas representadas en B y C el crecimiento se originó a partir de 3µl de una suspensión con una D.O. de 1,0 o sea con $\sim 5 \times 10^7$ células/ml.

menos glucosa, la utilización del lípido aparenta ser más temprana. En todas las observaciones el clon pLJ4 originó mayor intensidad de fluorescencia, seguido de pLJ1.

De acuerdo con los resultados anteriores, se ha verificado que tanto la tributirina como los aceites de oliva o de maíz podrían ser usados como sustratos por los transformantes. Se han hecho nuevos ensayos para comparar la eficacia de los tres clones pre-seleccionados (pLJ1, pLJ4, pLJ17) en medios con tributirina como sustrato esterásico, o con distintos aceites (de maíz, de oliva y de soja) como sustrato lipásico. Los resultados se encuentran en los apartados 4.5.3.1 y 4.5.3.2, respectivamente.

4.5.3.1 Usando tributirina como sustrato

Por análisis de la Tabla 23 se pueden comparar los diámetros de los halos de degradación de lípidos obtenidos en los tres clones (pLJ1, pLJ4 y pLJ17) y en el control negativo (*P. pastoris* GS115), así como el crecimiento. La levadura GS115 no presentó cualquier halo de degradación de tributirina al fin de 5 días, sin embargo todos los transformantes originaron halos. Entre los clones, pLJ4 fue el que originó la formación de halos de degradación de tributirina de mayores dimensiones, desde el inicio del ensayo, luego seguido de pLJ1. No

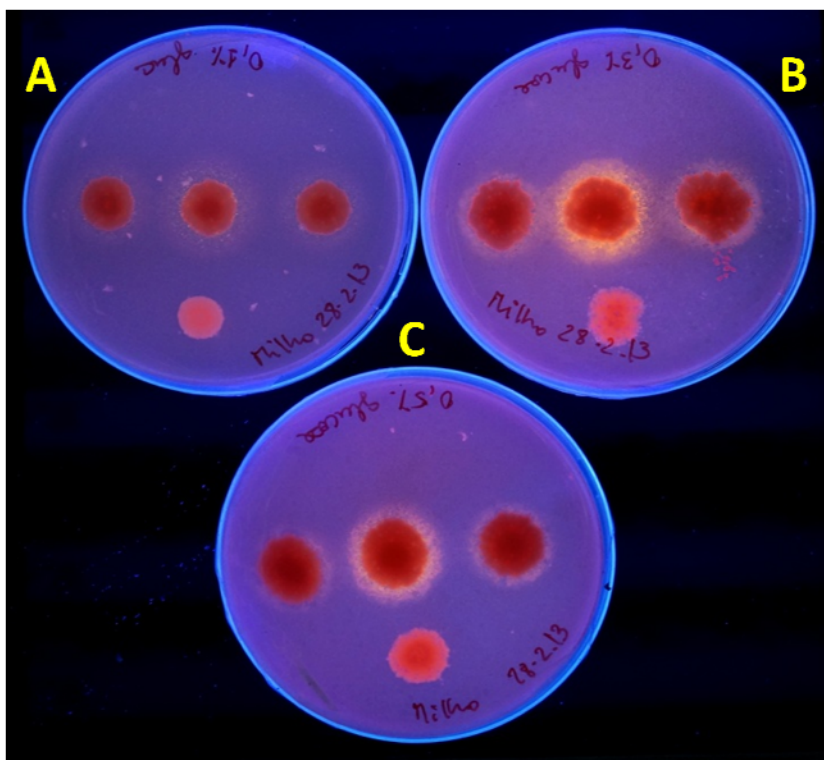


Figura 66 – Halos de fluorescencia debidos a actividad lipásica de los clones pLJ17, pLJ4 y pLJ1, ocho días después la inoculación en medio ADL con aceite de maíz al 3%. Modalidades A, B y C: con glucosa al 0,1; 0,3 y 0,5%, respectivamente; En la imagen, por placa, de la izquierda a la derecha: pLJ17, pLJ4, y pLJ1, respectivamente; Cada colonia se originó a partir de 4 μ l de una suspensión con una D.O. de 1,0 o sea con $\sim 5 \times 10^7$ células/ml.

fueron detectadas diferencias de crecimiento entre colonias de GS115 y las de los transformantes durante el período en análisis.

4.5.3.1 Usando tributirina como sustrato

Por análisis de la Tabla 23 se pueden comparar los diámetros de los halos de degradación de lípidos obtenidos en los tres clones (pLJ1, pLJ4 y pLJ17) y en el control negativo (*P. pastoris* GS115), así como el crecimiento. La levadura GS115 no presentó cualquier halo de degradación de tributirina al fin de 5 días, sin embargo todos los transformantes originaron halos. Entre los clones, pLJ4 fue el que originó la formación de halos de degradación de tributirina de mayores dimensiones, desde el inicio del ensayo, luego seguido de pLJ1. No fueron detectadas diferencias de crecimiento entre colonias de GS115 y las de los transformantes durante el período en análisis.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 23 - Diámetro de los halos de degradación de lípidos y de las colonias (cm) en placas de Agar Tributirina

Día	GS115		pLJ1		pLJ4		pLJ17	
	Halo	Colonia	Halo	Colonia	Halo	Colonia	Halo	Colonia
1	–	0,4	0,6	0,4	0,7	0,4	0,6	0,4
2	–	0,4	0,9	0,4	1,2	0,4	0,9	0,4
3	–	0,5	1,5	0,5	1,8	0,5	1,4	0,5
4		nd		nd		nd		nd
5	–	0,5	>2	0,5	>2	0,5	1,8	0,5

4.5.3.2 Usando distintos aceites como sustrato

En la Figura 67 se puede observar los halos de fluorescencia obtenidos por los transformantes pLJ1, pLJ4 y pLJ17 frente a los distintos sustratos ensayados (aceite de maíz, de oliva y de soja), bien como su intensidad a los veinte días tras la inoculación. Se

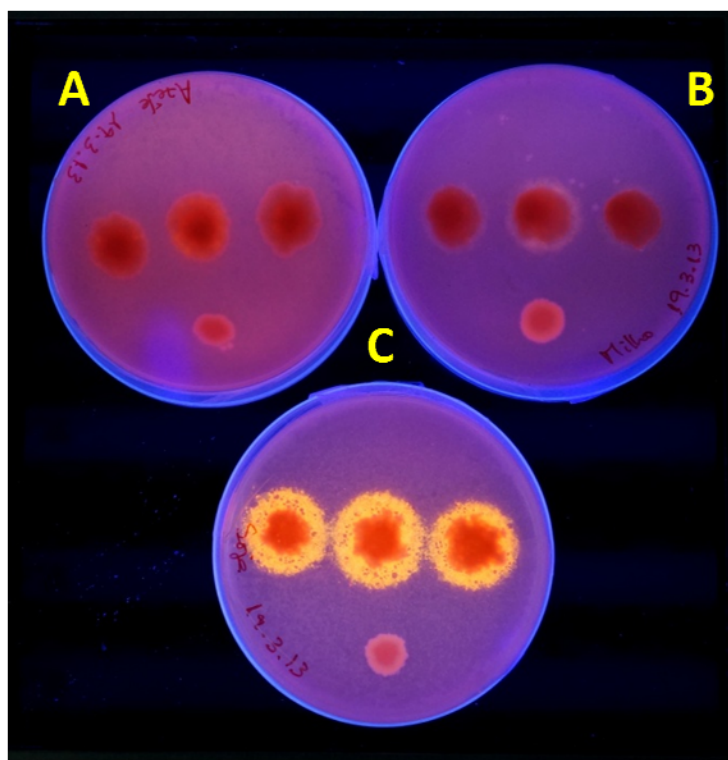


Figura 67 – Halos de fluorescencia debidos a actividad lipásica de los clones pLJ17, pLJ4 y pLJ1, veinte días después la inoculación en medio ADL con aceite de oliva (A), de maíz (B) y de soja (C) al 3% y glucose al 0,3%.

En la imagen, por placa, de la izquierda a la derecha: pLJ17, pLJ4, y pLJ1, respectivamente; En el fondo, la levadura GS115. Cada colonia se originó a partir de 4µl de una suspensión con una D.O. de 1,0 o sea con $\sim 5 \times 10^7$ células/ml.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

verifica que, de los tres aceites ensayados fue el de soja (C) lo que originó una mayor intensidad de fluorescencia, al contrario del aceite de maíz (B), que fue lo que originó menor intensidad de reacción (solo pLJ4 presenta una reacción más intensa en este medio).

En este experimento, al segundo día, antes de 48 h tras inoculación ya estaban visibles a los UVs los halos de fluorescencia en todos los medios y para todos los clones, pero más intensos en pLJ4, seguido por pLJ1. También en todas las placas pLJ4 fue el clon con mayor precocidad de reacción, seguido de pLJ1. Todos los ensayos se hicieron en triplicado.

4.5.4 Medición de actividades por espectrofotometría

Las valoraciones de actividad lipásica de extractos celulares y sobrenadantes de cultivo por espectrofotometría se realizaron usando el clon pLJ4, por haber sido el que probó tener una mayor eficiencia en la utilización de distintos sustratos esterásicos/lipásicos en los experimentos ya descritos. Se probaron el *p*-nitrofenil butirato y el *p*-nitrofenil palmitato como sustratos. Se usaron extractos celulares y sobrenadantes de cultivo de *P. pastoris* GS115-pIB2 como control. Luego se valoró la proteína existente en las muestras para determinar la cinética de las reacciones.

4.5.4.1 En *p*-nitrofenil butirato

- **En extractos celulares**

En esto caso se usaron extractos celulares de crecimientos de pLJ4 en medio MD durante cerca de 18h. Se hicieron tres réplicas por muestra. Se procedió de la misma forma con GS115-pIB2. Los resultados de valoración de la actividad esterásica sobre tributirina para un comprimento de onda de 410nm y de acuerdo con el procedimiento referido en cf. 3.8.6.1 se encuentran en las Figura 68 y 69.

La ley de Lambert-Beer establece que la absorbancia está directamente relacionada con las propiedades intrínsecas del analito, con su concentración y con la longitud de la trayectoria del haz de radiación al atravesar la muestra. Su expresión matemática es:

$$A = C \cdot \epsilon \cdot L$$

donde:

A = Absorbancia de la muestra

C = Concentración del cromóforo

L = Longitud del paso óptico que contiene la muestra (cm)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ϵ = Absortividad molar

Para determinar el valor del coeficiente de extinción molar, se usó la siguiente fórmula de acuerdo con Burguillo (comunicación personal):

$$\epsilon_{\text{app}} (\text{a pH } 7,4) = \frac{\epsilon_{\text{A}^-} + ([\text{H}^+] / K_a) \times \epsilon_{\text{HA}}}{1 + [\text{H}^+] / K_a} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}, \text{ donde sustituyendo}$$

$$\epsilon_{\text{app}} (\text{a pH } 7,4) = \frac{1,72 \times 10^4 + (10^{-7,4} / 7,08 \times 10^{-8}) \times 29,1}{1 + 10^{-7,4} / 7,08 \times 10^{-8}} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$$\epsilon_{\text{app}} (\text{a pH } 7,4) = \frac{1,72 \times 10^4 + 16,36}{1 + 0,562} = 1,10 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1},$$

dónde ϵ_{app} es el coeficiente de absorción molar aparente, absortividad molar aparente o coeficiente de extinción molar; ϵ_{A^-} y ϵ_{HA} son los coeficientes de extinción molar de las formas alcalina y ácida, respectivamente; $[\text{H}^+]$ es la concentración hidrogeniónica, y por último K_a es la constante de ionización (de acidez, de disociación ácida). ϵ_{app} es característico de cada molécula, dependiente del valor de pH, del disolvente usado y del comprimento de onda utilizado en la determinación. Ya que la absorbancia es adimensional, las unidades de ϵ_{app} son concentración⁻¹ longitud⁻¹.

Para pLJ4 la recta $y = 0,0334x + 0,0016$ (Figura 69) relaciona la absorbancia (Abs) con el tiempo de reacción enzimática en minutos. Para convertir para la concentración de proteína, y como de acuerdo con la ley de Lambert-Beer, $C = A / \epsilon$, y teniendo en cuenta la absortividad molar, se calculó:

$$\frac{0,0334}{1,0 \times 10^4} = 3,34 \times 10^{-6} \frac{\text{M } p\text{-nitrofenol}}{\text{min}}$$

De acuerdo con la concentración de proteína de la muestra (74,59 μg de proteína/100 μl de extractos celulares de pLJ4 usados en la cubeta, para un volumen total de 2500 μl), se determinó la concentración de proteína:

$$\frac{74,59 \mu\text{g}}{2,5 \times 10^{-3} \text{ dm}^3} = 2,983 \times 10^4 \frac{\mu\text{g}}{\text{dm}^3}, \text{ y su actividad:}$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

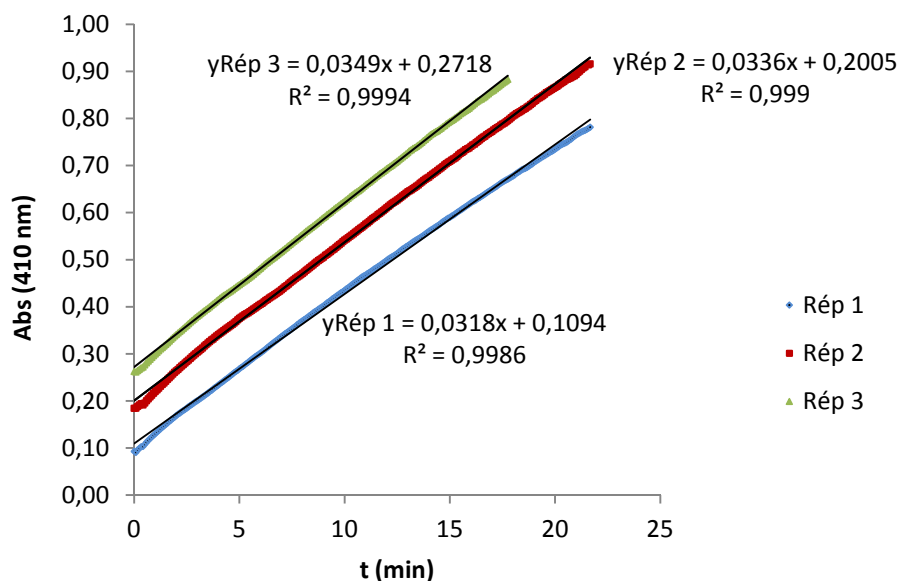


Figura 68 – Valores de absorbancia obtenidos con extractos celulares del clon pLJ4 usando el *p*-nitrofenil butirato como sustrato.

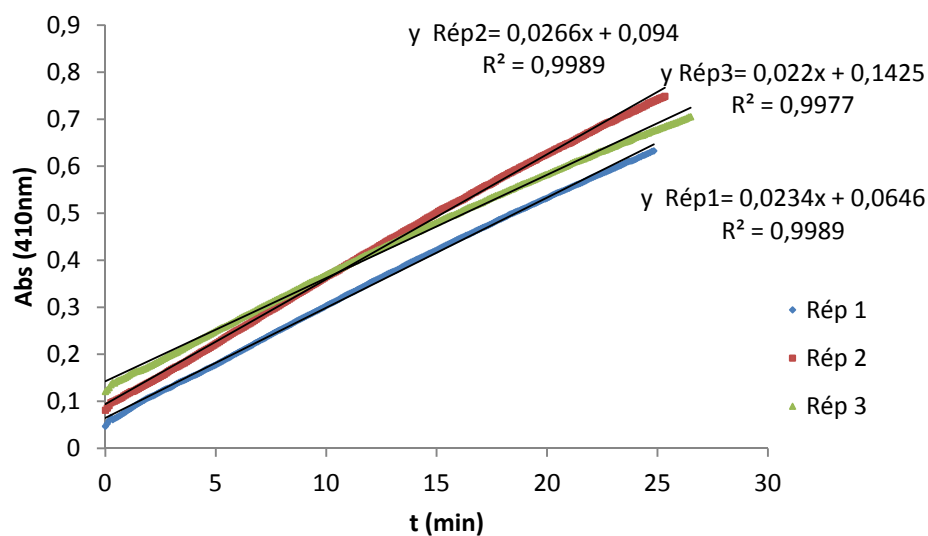


Figura 69 – Valores de absorbancia obtenidos con extractos celulares de levadura GS115-pIB2 usando el *p*-nitrofenil butirato como sustrato.

$$\frac{3,34 \times 10^{-6}}{2,983 \times 10^4} \frac{\text{mol } p\text{-nitrofenol}}{\text{min} \times \mu\text{g de proteína}} = 1,12 \times 10^{-10} \frac{\text{mol } p\text{-nitrofenol}}{\text{min} \times \mu\text{g de proteína}}$$

Para GS115-pIB2linKpn2I, $y = 0,024x + 0,0023$. Así,

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

$$\frac{0,024}{1,0 \times 10^4} = 2,4 \times 10^{-6} \frac{\text{M } p\text{-nitrofenol}}{\text{min}}$$

De acuerdo con la concentración de proteína de la muestra (44,79 µg de proteína/100 µl de extractos celulares de GS115-pIB2 usados en la cubeta, para un volumen total de 2500 µl), se determinó la concentración de proteína:

$$\frac{44,79 \mu\text{g}}{2,5 \times 10^{-3} \text{ dm}^3} = 1,791 \times 10^4 \frac{\mu\text{g}}{\text{dm}^3}, \text{ y su actividad:}$$

$$\frac{2,4 \times 10^{-6}}{1,791 \times 10^4} \frac{\text{mol } p\text{-nitrofenol}}{\text{min} \times \mu\text{g de proteína}} = 1,34 \times 10^{-10} \frac{\text{mol } p\text{-nitrofenol}}{\text{min} \times \mu\text{g de proteína}}$$

Así, verificase que, relativo a pLJ4, la actividad frente a tributirina es cerca de 16,4% superior en GS115-pIB2, lo que podrá ser debido al carácter extracelular de lip1.

• En sobrenadantes de cultivo

Se midió la actividad de extractos proteicos del sobrenadante de cultivo del clon pLJ4 y de GS115-pIB2, frente a pNPB. Para el crecimiento de las levaduras se usó el medio MD, los sobrenadantes se recogieron después de cerca de 18h y se prepararon de acuerdo con lo referido en 3.8.2. Las lecturas espectrofotométricas se hicieron en duplicado y se hicieron tres réplicas por muestra. Los resultados obtenidos con el clon pLJ4 se encuentran en la Figura 70.

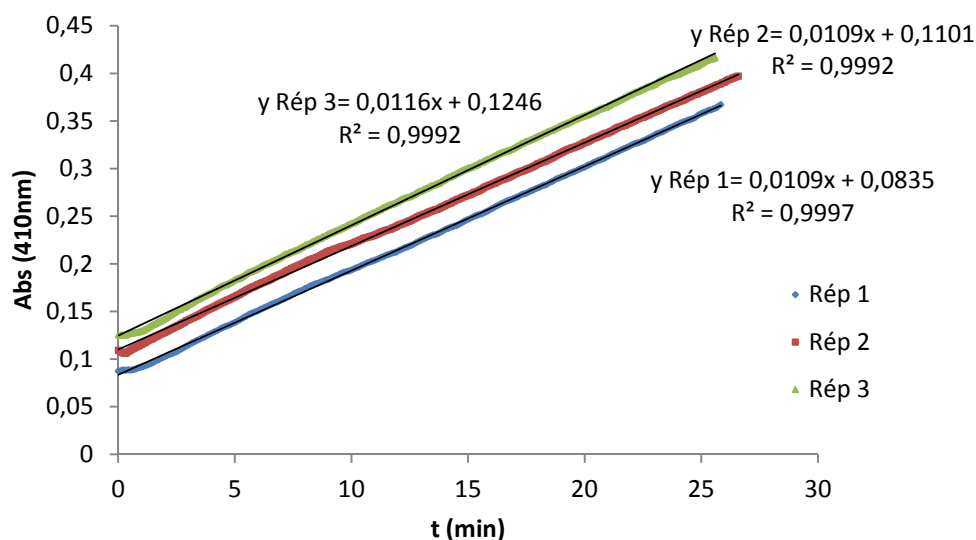


Figura 70 – Valores de absorbancia obtenidos con sobrenadante de levadura pLJ4 usando el *p*-nitrofenil butirato como sustrato.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este caso la recta $y = 0,011x + 0,0004$ relaciona la absorbancia (Abs) con el tiempo de reacción enzimática en minutos. Así, y teniendo en cuenta la absorptividad molar,

$$\frac{0,0110}{1,0 \times 10^4} = 1,0 \times 10^{-6} \frac{\text{M } p\text{-nitrofenol}}{\text{min}}$$

De acuerdo con la concentración de proteína de la muestra (77,83 μg de proteína / 100 μl de sobrenadante usado en la cubeta, para un volumen total de 2500 μl), se determinó la concentración de proteína:

$$\frac{77,83 \mu\text{g}}{2,5 \times 10^{-3} \text{ dm}^3} = 3,113 \times 10^4 \frac{\mu\text{g}}{\text{dm}^3}, \text{ y su actividad:}$$

$$\frac{1,0 \times 10^{-6}}{3,113 \times 10^4} \frac{\text{mol } p\text{-nitrofenol}}{\text{min} \times \mu\text{g de proteína}} = 3,21 \times 10^{-11} \frac{\text{mol } p\text{-nitrofenol}}{\text{min} \times \mu\text{g de proteína}}$$

Cuanto a los resultados de actividad lipásica del sobrenadante de cultivo de GS115-pIB2 frente a pNPB, estos se consideraron despreciables, por lo casi ausente declive de la recta que relacionaba la absorbancia (Abs) con el tiempo, lo que podrá haber sido debido al hecho de *P. pastoris* secretar niveles muy bajos de proteínas nativas, como referido por Macauley-Patrick et al. (2005).

Ya en pLJ4, los resultados apuntan para la existencia de una actividad del sobrenadante de cultivo frente a tributirina con valores bajos, de cerca de $3,21 \times 10^{-11} \frac{\text{mol } p\text{-nitrofenol}}{\text{min} \times \mu\text{g de proteína}}$, o sea inferiores a los existentes intracelularmente (cerca de 28,7%).

Una de las explicaciones posibles es que ni toda la enzima secretada esté en su conformación activa, una vez que el medio de crecimiento contenía glucosa al 2%. Aunque la glucosa promueva la expresión del promotor *GAP* de pIB2 (Sears et al., 1998), un promotor constitutivo, sábase que frecuentemente los microorganismos utilizan la fuente de carbono más sencilla, lo que puede inhibir la expresión de genes que codifican enzimas lipolíticas. Hay indicios de que *lip1* pueda ser reprimido por la presencia de glucosa en *T. harzianum*. Por lo tanto, en el clon pLJ4, *lip1* puede ser secretada al exterior, pero su actividad estar inhibida, una vez que el transformante crecía en un medio con glucosa, originando valores de actividad cinética muy bajos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.5.4.2 En *p*-nitrofenil palmitato

Usando extractos celulares de pLJ4 frente a pNPP se obtuvieron rectas con un declive insignificante. También en los sobrenadantes no fueron detectadas actividades relevantes usando pNPP como sustrato, lo que es consistente con el hecho de lip1 no tener actividad frente a este sustrato.

4.5.5 Gel de proteínas

En SDS-PAGE obtenido con extractos proteicos celulares de la levadura *P. pastoris* GS115 y del clon pLJ4 (crecimiento de 48h en YEPD) se detectó una proteína de cerca de 56kDa, inexistente en la levadura no transformada (Figura 71), y que podrá corresponder a lip1.

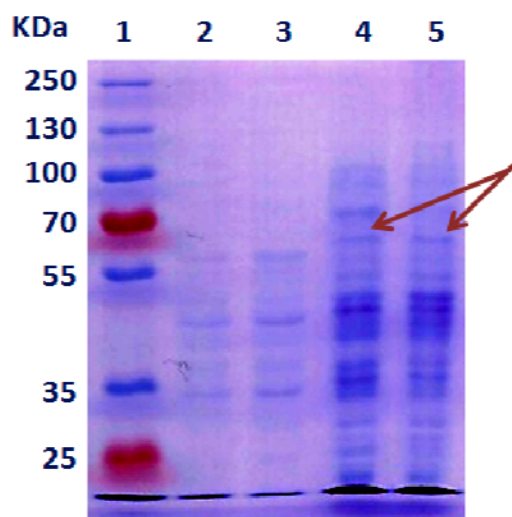


Figura 71 – SDS-PAGE obtenido con extractos proteicos celulares de las levaduras GS115 y pLJ4 (crecimiento de 48h en YEPD).

Carril 1- Marcador de proteínas peqGold V (VWR) ; Carriles 2 e 3- *P. pastoris* GS115; Carriles 4 e 5- pLJ4.

4.6 EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE *lip1* por RT-qPCR

4.6.1 En *T. harzianum*

En este estudio de expresión del gen *lip1* se cultivó *T. harzianum* en pré-inducción en PDB (1×10^5 esporas/ml) durante 48h a 150rpm, se filtró y lavó el micélio con agua ultrapura. Posteriormente se transfirió el micélio a un medio mínimo con 2% de aceite de soja, por ser aquél que en ensayos previos pareció ser lo más utilizado por los transformantes (Figura 67). Se cogieron los crecimientos obtenidos a diferentes tiempos tras inducción (0h, 6h, 24h,

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

48h, 72h y 96h; designados respectivamente por T0, T6, T24, T48, T72 y T96), se extrajo el ARN de cada una de las muestras (Figura 72), y se cuantificó en espectrofotómetro.

Se trataron las muestras de ARN con DNAsa y se procedió a la síntesis de ADNc. En el experimento de RT-qPCR se hicieron tres replicas por muestra y gen endógeno (β -actina), con normalización frente al endógeno. Los ensayos se hicieron en duplicado. En cada caso se confirmó por electroforesis en geles de agarosa si los tamaños de los productos de amplificación obtenidos correspondían a los esperados, así como se confirmó la ausencia de amplificación en los controles NTC (sin ADNc) y NRT (sin el tratamiento con transcriptasa reversa). Los resultados se muestran en la Figura 73. Tras 24h de inducción, *lip1* se expresaba 2,11 veces más respecto a T0 (Cq de 26,57 a T24 contra 27,64 en T0), 3,89 veces más a las 72h (Cq de 25,68) y apenas 1,36 veces más a las 96h (Cq de 27,19), o sea, después de un período de adaptación al nuevo medio (con aceite de soja) en el que hubo un aumento de expresión de *lip1* (por lo menos hasta las 72h), le sigue un período en que esa expresión disminuye (o los nutrientes se agotan, una vez que el crecimiento se desarrolla en sistema cerrado).

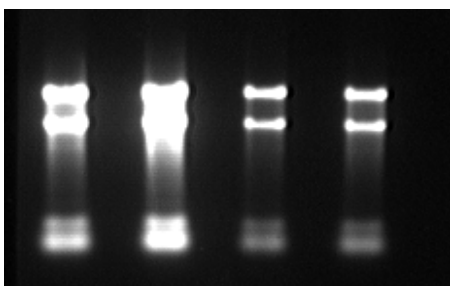


Figura 72 – ARN de *T. harzianum* Las dos primeras muestras se recogieron 6h después inducción, las dos últimas tras 24h.

4.6.2 En *P. pastoris*

En este estudio se cultivaron la levadura control (GS115-pIB2linKpn2I) y el clon pLJ4 en medio ADL al 3% de aceite de soja, inoculado con 50 μ l de una suspensión con una D.O. de 1,0. El crecimiento de se cogió al fin de 2, 5 y 7 días en pLJ4, y al fin de dos en GS115-pIB2linKpn2I, se extrajo el ARN de cada una de las muestras (Figura 72), y se cuantificó en espectrofotómetro. Se trataron las muestras de ARN con DNAsa y se procedió a la síntesis de ADNc.

En RT-qPCR se hicieron tres replicas por muestra. Los ensayos se hicieron en duplicado, y se hizo la confirmación de tamaños de los productos de amplificación, y de ausencia de amplificación en los controles NTC y NRT.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este caso se obtuvieron en pLJ4 valores de Cq de 28,6 al fin de 2 días; de 28,06 al fin de 5 días y de 28,44 al fin de 8 días. Así, verificase una mayor expresión de *lip1* al fin de 5 días ADL (se expresa 1,5 veces más que al fin de 2 días, y más 1,38 veces que al fin de 7 días), pero siempre menos que el gene de la actina de *P. pastoris* (Cq de 22,62 al fin de 2 días).

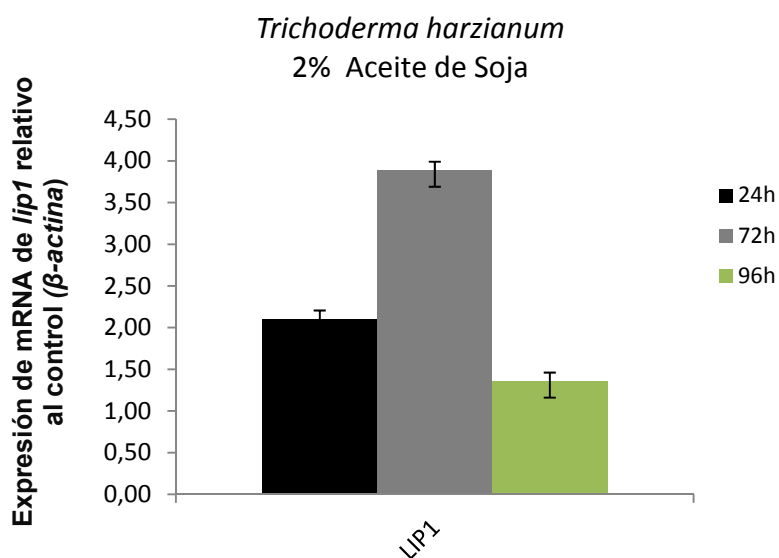


Figura 73 – Expresión de *lip1* en medio al 2% de aceite de soja.

Se tomó como gen referencia el gen de la β - actina. Se evaluaron los tiempos 24h, 72h y 96h después inducción.

24h	2,11
72h	3,89
96h	1,36

5. CONCLUSIONES

1. Tras varias etapas de secuenciación y comparación de las secuencias nucleotídicas contenidas en siete ESTs de *T. harzianum* T34 con las de proteínas existentes en las bases de datos de EMBL/NCBI, se identificaron las contenidas en las EST-1279 y EST-9632 como de interés potencial, por la semejanza que presentaban con lipasas.
2. En ambos casos se completaron por HE-TAIL PCR las secuencias nucleotídicas de los ORFs de los genes potenciales coincidentes con dichas ESTs, y se determinaron algunas bases más de las secuencias de los promotores y de los terminadores de esos genes.
3. Se identificaron dos genes potenciales involucrados en la actividad lipásica de *T. harzianum* T34, que se designaron *lip1* y *lip2*.
4. *Lip2*, con el número de acceso [AM774154.1](#) tiene un total de 1992 nucleótidos, que abarcan 548pb del promotor, 1215pb de la fase de lectura abierta y un terminador con 227pb. El número de acceso de la secuencia de aminoácidos codificada por *lip2* en la base de datos de UniProt es [B7ZET5 TRIHA](#). Su ORF traducido presentaba 59,09% de identidad y $3,2e^{-93}$ de homología con la proteína A8W609-GIBZE, una triacilglicerol lipasa de *Giberella zeae* (*Fusarium graminearum*), de acuerdo con el programa informático FASTA, y 61% de identidad y $1e^{-132}$ de homología para la misma proteína, de acuerdo con el programa BLASTx.
5. *Lip1*, con el número de acceso [AM180877.1](#), tiene un ORF de 1677pb y se han secuenciado cerca de 693pb del promotor, y más de 1000 pb en la secuencia del terminador. Después de procesado el intrón de 44pb, *Lip1* codifica una proteína deducida de 532 aminoácidos y 56,3KDa. Su número de acceso en la base de datos de UniProt es [B0B099 TRIHA](#). Es una carboxilesterasa (PROSITE PS00122), que presenta 55,7% de identidad y $1,3e^{-180}$ de homología con la proteína K1WRG1_MARBU, de *Marssonina brunnea* f. sp. *multigermtubi*, y una homología de 88% con la carboxilesterasa KKO98363.1 de *T. harzianum* T6776, publicada en GenBank en maio de 2015.
6. *Lip1* se encuentra como copia única en el genoma de *T. harzianum* T34, y no existe un gen homólogo en *T. atroviride*, *T. reesei* y *T. virens*.
7. *Lip1* presenta actividad lipolítica en tributirina, o en aceites vegetales como los de maíz, oliva o soja, pero especialmente en el último. No utiliza sustratos como el palmitato, lo que está de acuerdo con el hecho de ser una carboxilesterasa con preferencia por AGs de cadena corta. Su expresión en *T. harzianum* T34 es inducida por la presencia de sustrato.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdou, A. (2003). Purification and partial characterization of psychrotrophic *Serratia marcescens* lipase. *J Dairy Sci* **86**, 27–132.
- Adam, P. & Deploey, J. (1978). Enzymes produced by thermophilic fungi. *Mycologia* **70**, 906-910.
- Agilent Technologies (2010). *pBlueScript II Phagemid System. Instruction Manual*. 23pp.
- Akoh, C., Lee, G., Liaw, Y., Huang, T. & Shaw, J. (2004). GDSL family of serine esterases/lipases. *Prog Lipid Res* **43**, 534–552.
- Akoh, C., Chang, S., Lee, G. & Shaw, J. (2007). Enzymatic approach to biodiesel production. *J Agric Food Chem* **55**, 8995-9005.
- *Akshatha, K., Murthy, S. & Lakshmidevi, N. (2012). Purification and characterization of lipase from bacteria. *Abhinav-National Mon Refereed J Res Sci Tech* **1**, 19-27.
- Alfonso, I. & Gotor, V. (2004). Biocatalytic and biomimetic aminolysis reactions: useful tools for selective transformations on polyfunctional substrates. *Chem Soc Rev* **33**, 201-209.
- Alken-Murray Corporation (2001). *Preparation and use of rhodamine B lipase agar*. 4pp.
- Altschul, S., Madden, T., Schäffer, A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389-3402.
- Al-Zuhair, S. (2007). Production of biodiesel: possibilities and challenges. *Biofuels, Bioprod and Bioref* **1**, 57-66.
- Andualema, B. & Gessesse, A. (2012). Microbial lipases and their industrial applications: review. *Biotechnology* **11**, 100-118.
- Anobom, C., Pinheiro, A., De-Andrade, R., Agueiras, E., Andrade, G., Moura, M. & Freire, D. (2014). From structure to catalysis: recent developments in the biotechnological applications of lipases. *Biomed Res Int* Article ID 684506, 1-11.
- Antczak, M., Kubiak, A., Antczak, T. & Bielecki, S. (2009). Enzymatic biodiesel synthesis-key factors affecting efficiency of the process. *Renewable Energy* **34**, 1185-1194.
- Aravindan, R., Anbumathi, P. & Viruthagiri, T. (2007). Lipase applications in food industry. *Indian J Biotechnol* **6**, 141-158.
- Ariens, E. (1984). Stereochemistry, a basis for sophisticated nonsense in pharmacokinetics and clinical pharmacology. *Eur J Clin Pharmacol*, **26**, 663-668.
- Arkhipova, I. (1995). Promoter elements in *Drosophila melanogaster* revealed by sequence analysis. *Genetics* **139**, 1359–1369.
- Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J. & Schwede, T. (2006). The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* **22**, 195-201.
- Arpigny, J. & Jaeger, K. (1999). Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochem J* **343**, 177–183.
- Balcão, V., Kennippen, A., Malcata, F. & Kalo, P. (1998). Lipase catalyzed acidolysis of butter fat with oleic acid: characterization of process and product. *Enzyme Microb Technol* **33**, 118–128.

BIBLIOGRAFÍA

- Baldessari, A. (2012). Lipases as a catalyst in synthesis of fine chemical. In: G. Sandoval (Ed.). *Lipases and Phospholipases. Methods and protocols*. Humana Press, New Jersey, USA. pp 445-456.
- Ballance, D. (1986). Sequences important for gene expression in filamentous fungi. *Yeast* **2**, 229-236.
- Baranski, R., Klocke, E. & Nothnagel, T. (2008). Chitinase CHIT36 from *Trichoderma harzianum* enhances resistance of transgenic carrot to fungal pathogens. *J Phytopathol* **156**, 513–521.
- Barba, V., Prieto, A., Martínez, A. & Martínez, J. (2011). Acylation method for producing food and/or pharmaceutical compounds using fungal sterol esterases. Spanish Patent P201131098 20.
- Barbaro, S., Trevors, J. & Inniss, J. (2001). Effects of low temperature, cold shock, and various carbon sources on esterase and lipase activities and exopolysaccharide production by a psychrotrophic *Acinetobacter* sp. *Can J Microbiol* **47**, 194–205.
- Barberis, S., Guzmán, F., Illanes, A. & López-Santfín, J. (2008). Study cases of enzymatic processes. In: A. Illanes (Ed.). *Enzyme Biocatalysis. Principles and Applications*. Springer, New York, USA. pp. 253-256.
- Bárceñas, M., Haros, M. & Rosell, C. (2003). An approach to studying the effect of different bread improvers on the staling of pre-baked frozen bread. *Eur Food Res Technol* **218**, 56-61.
- Barriuso, J., Prieto, A. & Martínez, M. (2013). Fungal genomes mining to discover novel sterol esterases and lipases as catalysts. *BMC Genomics* **14**, 712-720.
- Barros, M., Fleuri, L. & Macedo, G. (2010). Seed Lipases: sources, applications and properties – a review. *Braz J Chem Eng* **27**, 15 - 29.
- Bashirullah, A., Cooperstock, R. & Lipshitz, H. (2001). Spatial and temporal control of RNA stability. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 7025–7028.
- Bassegoda, A., Javier Pastor, F. & Diaz., P. (2012). *Rhodococcus* sp. strain CR-53 LipR, the first member of a new bacterial lipase family (family X) displaying an unusual Y-type oxyanion hole, similar to the *Candida antarctica* lipase clan. *Appl Environ Microbiol* **78**, 1724–1732.
- Battaner, E. (2012). *Biomoléculas. Una introducción estructural a la bioquímica*. Universidad de Salamanca (Ed.). Salamanca, Spain. 582pp.
- Beer, H., McCarthy, J., Bornscheuer, U. & Schmid, R. (1998). Cloning, expression, characterization and role of the leader sequence of a lipase from *Rhizopus oryzae*. *Biochem Biophys Acta* **1399**, 173–180.
- Beisson, F., Tiss, A., Rivière, C. & Verger, R. (2000). Methods for lipase detection and assay: a critical review. *Eur J Lipid Sci Technol* **102**, 133-153.
- Belarbi, E., Molina, E. & Chisti, Y. (2000). A process for high yield and scaleable recovery of high purity eicosapentaenoic acid esters from microalgae an fish oil. *Enzyme Microb Technol* **26**, 516-529.
- Bendtsen, J., Nielsen, H., von Heijne, G. & Brunak, S. (2004). Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol* **340**, 783-795.
- Benkert, P., Biasini, M. & Schwede, T. (2011). Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinformatics* **27**, 343-350.

BIBLIOGRAFÍA

- Berto, P., Belingheri, L. & Dehorter, B. (1997). Production and purification of a novel extracellular lipase from *Alternaria brassicicola*. *Biotechnol Lett* **19**, 533–536.
- Beuchat, L. (1982). Flavor chemistry of fermented peanuts. *Ind Eng Chem Prod Res Dev* **21**, 533–536.
- Biasini, M., Bienert, S., Waterhouse, A., Arnold, K., Studer, G., Schmidt, T. & Schwede, T. (2014). SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Res* **42**, 252-258.
- Birboim, H. & Doly, J. (1979). A rapide alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res* **7**, 1567-1578.
- Björling, F., Godtfredsen, S. & Kirk, O. (1991). The future-impact of industrial lipases. *Trends Biotechnol* **9**, 360-366.
- Błaszczuk, L., Siwulski, M., Sobieralski, K., Lisiecka, M. & Jędryczka, M. (2014). *Trichoderma* spp. – application and prospects for use in organic farming and industry. *J Plant Prot Res* **54**, 309-317.
- Blom, N., Gammeltoft, S. & Brunak, S. (1999). Sequence- and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J Mol Biol* **294**, 1351-1362.
- Bornscheuer, U., Bessler, C., Srinivas, R. & Krishna, S. (2002). Optimizing lipases and related enzymes for efficient application. *Trends Biotechnol* **20**, 433-437.
- Bornscheuer, U. & Kazlauskas, R. (2004). Catalytic promiscuity in biocatalysis: using old enzymes to form new bonds and follow new pathways. *Angew Chem* **43**, 6032-6040.
- Boyer, R. (2000). Lípidos, membranas biológicas y transporte celular. In: Internacional Thomson (Ed.). *Conceptos en bioquímica*. México. pp. 238–256.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Bradoo, S., Saxena, R. & Gupta, R. (1999). Two acidothermotolerant lipases from new variants of *Bacillus* spp. *World J Microbiol Biotechnol* **15**, 87–91.
- Brants, A. & Earle, E. D. (2001). Transgenic tobacco cell cultures expressing a *Trichoderma harzianum* endochitinase gene release the enzyme into the medium. *Plant Cell Rep* **20**, 73–78.
- Brocca, S., Secundo, F., Ossola, M., Alberghina, L., Carrea, G. & Lotti, M. (2003). Sequence of the lid affects activity and specificity of *Candida rugosa* lipase isoenzymes. *Protein Sci* **12**, 2312–2319.
- Brotman, Y., Briff, E., Viterbo, A. & Chet, I. (2008). Role of swollenin, an expansin-like protein from *Trichoderma* in plant root colonization. *Plant Physiol* **147**, 779–789.
- Brotman, Y., Kapuganti, J. & Viterbo, A. (2010). *Trichoderma*. *Current Biol* **20**, R390-R391.
- Brune, A. & Gotz, F. (1992). Degradation of lipids by bacterial lipases. In: G. Winkelmann (Ed.). *Microbial degradation of natural products*. VCH, Weinheim. pp. 243–266.
- Brzozowski, A., Derewenda, U., Derewenda, Z., Dodson, G., Lawson, D., Turkenburg, J. & Thim, L. (1991). A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. *Nat* **351**, 491-494.
- Burke, T. & Kadonaga, J. (1996). *Drosophila* TFIID binds to a conserved downstream basal promoter element that is present in many TATA-box-deficient promoters. *Genes Dev* **10**, 711–724.

BIBLIOGRAFÍA

- Butler, J. & Kadonaga, J. (2002). The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. *Genes Dev* **16**, 2583-2592.
- Calero-Rueda, O., Gutiérrez, A., del Río, J., Muñoz, C., Plou, F., Martínez, A. & Martínez, M. (2002). Method for the enzymatic control of pitch deposits formed during paper pulp production using an esterase that hydrolyses triglycerides and sterol esters. International Patent WO 02/075045 A1.
- Calero-Rueda, O., Barba, V., Rodríguez, E., Plou, F., Martínez, A. & Martínez, M. (2009). Study of a sterol esterase secreted by *Ophiostoma piceae*: sequence, model and biochemical properties. *Biochim Biophys Acta* **1794**, 1099-1106.
- Cao, L., Jiang, M., Zeng, Z., Du, A., Tan, H. & Liu, Y. (2008). *Trichoderma atroviride* F6 improves phytoextraction efficiency of mustard (*Brassica juncea* (L.) Coss. var. *foliosa* Bailey) in Cd, Ni contaminated soils. *Chemosphere* **71**, 1769-1773.
- Carrasco-López, C., Godoy, C., de las Rivas, B., Fernández-Lorente, G., Palomo, J., Guisán, J. & Hermoso, J. (2009). Activation of bacterial thermoalkalophilic lipases is spurred by dramatic structural rearrangements. *J Biol Chem* **284**, 4365-4372.
- Carvalho, C., Aires-Barros, M. & Cabral, J. (1998). Cutinase structure, function and biocatalytic applications. *Electron J Biotechnol* **1**, 160-173.
- Casas-Godoy, L. (2012). Lipase-catalyzed purification and functionalization of omega-3 polyunsaturated fatty acids and production of structured lipids. PhD. diss., Toulouse, INSA, 276pp.
- Casas-Godoy, L., Duquesne, S., Bordes, F., Sandoval, G. & Marty, A. (2012). Lipases: an overview. In: G. Sandoval (Ed.). *Lipases and Phospholipases. Methods and protocols*. Springer, New York, USA. pp 3-30.
- Chahinian, H., Vanot, G., Ibrik, A., Rugani, N., Sarda, L. & Comeau, L. (2000). Production of extracellular lipases by *Penicillium cyclopium* purification and characterization of partial acylglycerol lipase. *Biosci Biotechnol Biochem* **64**, 215-222.
- Chahinian, H., Fantini, J., Garmy, N., Manco, G. & Sarda, L. (2010). Non-lipolytic and lipolytic sequence-related carboxylesterases: a comparative study of the structure-function relationships of rabbit liver esterase 1 and bovine pancreatic bile-salt-activated lipase. *Biochim Biophys Acta* **1801**, 1195-1204.
- Chandel, C., Kumar, A. & Kanwar, S. (2011). Enzymatic synthesis of butyl ferulate by silica-immobilized lipase in a non-aqueous medium. *J Biomat Nanobiotechnol* **2**, 400-408.
- Chapus, C., Rovey, M., Sarda, L. & Verger, R. (1988). Minireview on pancreatic lipase and colipase. *Biochimie* **70**, 1223-1234.
- Chartrain, M., Katz, L., Marcin, C., Thien, M., Smith, S., Fisher, E., Goklen, K., Salmon, P., Brix, T., Price, K. & Greasham, R. (1993). Purification and characterization of a novel bioconverting lipase from *Pseudomonas aeruginosa* MB 5001. *Enzyme Microb Technol* **15**, 575-580.
- Chaverri, P., Samuels, G. & Stewart, E. (2001). *Hypocrea virens* sp. nov., the teleomorph of *Trichoderma virens*. *Mycologia* **93**, 1113-1124.
- Chaverri, P. & Samuels, G. (2002). *Hypocrea lixii*, the teleomorph of *Trichoderma harzianum*. *Mycol Prog* **1**, 283-286.

BIBLIOGRAFÍA

- Chaverri, P., Castlebury, L., Samuels, G. & Geiser, D. (2003a). Multilocus phylogenetic structure within the *Trichoderma harzianum/Hypocrea lixii* complex. *Mol Phyl Evol* **27**, 302-313.
- Chaverri, P., Castlebury, L., Overton, B. & Samuels, G. (2003b). *Hypocrea/Trichoderma*: species with conidiophore elongations and green conidia. *Mycologia* **95**, 1100–1140.
- Chen, H., Hsiao, K., Wu, S. & Wang, K. (1995). Regioselectivity enhancement by partial purification of lipase from *Aspergillus niger*. *Biotechnol Lett* **17**, 305–308.
- Chen, L., Yang, X., Raza, W., Li, J., Liu, Y., Qiu, M. & Shen, Q. (2011). *Trichoderma harzianum* SQR-T037 rapidly degrades allelochemicals in rhizospheres of continuously cropped cucumbers. *Appl Microbiol Biotechnol* **89**, 1653–1663.
- Chinworrungsee, M., Wiyakrutta, S., Sriubolmas, N., Chuailua, P. & Suksamram, A. (2008). Cytotoxic activities of trichothecenes isolated from an endophytic fungus belonging to order *Hypocreales*. *Arch Pharm Res* **31**, 611-616.
- Choupina, A. (2001). Contributo para a caracterização do sistema de lipases em *Yarrowia lipolytica*. PhD Thesis. Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa, Portugal.
- Cipinyte, V., Grigiskis, S. & Baskys, E. (2009). Select ion of fat degrading microorganisms for the treatment of lipid contaminated ambient. *Biologija* **55**, 84–92.
- Ciriacy, M. (1979). Isolation and characterization of further cis- and trans-acting regulatory elements involved in the synthesis of glucose-repressible alcohol dehydrogenase (ADHII) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **176**, 427-431.
- Coenen, T., Aughton, P. & Verhagan, H. (1997). Safety evaluation of lipase derived from *Rhizopus oryzae*: summary of toxicological data. *Food Chem Toxicol* **35**, 315–322.
- Coleman, M. & Macrae, A. (1980). Fat process and composition. UK Patent 1577933.
- Combet, C., Blanchet, C., Geourjon, C. & Deleage, G. (2000). NPS@: network protein sequence analysis. *Trends Biochem Sci* **25**, 147-150.
- Commenil, P., Belingheri, L., Sancholle, M. & Dehorter, B. (1995). Purification and properties of an extracellular lipase from the fungus *Botrytis cinerea*. *Lipids* **30**, 351–356.
- Contreras-Cornejo, H., Macías-Rodríguez, L., Cortés-Penagos, C. & López-Bucio, J. (2009). *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **149**, 1579–1592.
- Costa, M. & Peralta, R. (1999). Production of lipase by soil fungi and partial characterization of lipase from a selected strain (*Penicillium wortmanii*). *J Basic Microbiol* **39**, 11–15.
- Cui, Y., Wei, D. & Yu, J. (1997). Lipase-catalyzed esterification in organic solvent to resolve racemic naproxen. *Biotechnol Lett* **19**, 865-868.
- Cygler, M., Schrag, J., Sussman, J., Harel, M., Silman, I., Gentry, M. & Doctor, B. (1993). Relationship between sequence conservation and three-dimensional structure in a large family of esterases, lipases, and related proteins. *Prot Sci* **2**, 366–382.
- Dana, M., Pintor-Toro, J. & Cubero, B. (2006). Transgenic tobacco plants overexpressing chitinases of fungal origin show enhanced resistance to biotic and abiotic stress agents. *Plant Physiol* **142**, 722-730.

BIBLIOGRAFÍA

- Daudi, A., Cheng, A., O'Brien, J., Mammarella, N., Khan, S., Ausubel, F. & Bolwell, G. (2012). The apoplastic oxidative burst peroxidase in *Arabidopsis* is a major component of pattern triggered immunity. *Plant Cell* **24**, 275-287.
- Davidson, B. & Cantrill, R. (1985). Fatty acid nomenclature. A short review. *S Afr Med J* **67**, 633-634.
- Davranov, K. (1994). Microbial lipases in biotechnology (review). *Appl Biochem Microbiol* **30**, 527-534.
- De Castro, E., Sigrist, C., Gattiker, A., Bulliard, V., Langendijk-Genevaux, P., Gasteiger, E. & Hulo, N. (2006). ScanProsite: detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins. *Nucleic Acids Res* **34**, W362-W365.
- De Felice, B., Pontecorvo, G. & Carfagna, M. (1997). Degradation of waste waters from olive oil mills by *Yarrowia lipolytica* ATCC 20255 and *Pseudomonas putida*. *Acta Biotechnol* **17**, 231-239.
- De María, P., Carboni-Oerlemans, C., Tuin, B., Bargeman, G., van der Meer, A. & van Gemert, R. (2005). Biotechnological applications of *Candida antarctica* lipase A: state-of-the-art. *J Mol Catal B: Enzym* **37**, 36-46.
- Degenkolb, T., Berg, A., Gams, W., Schlegel, B. & Grafe, U. (2003). The occurrence of peptaibols and structurally related peptaibiotics in fungi and their mass spectrometric identification via diagnostic fragment ions. *J Pept Sci* **9**, 666-678.
- Dellamora-Ortiz, G., Martins, R., Rocha, W. & Dias, A. (1997). Activity and stability of a *Rhizomucor miehei* lipase in hydrophobic media. *Biotechnol Appl Biochem* **26**, 31-37.
- Derewenda, U., Brzozowski, A., Lawson, D. & Derewenda, Z. (1992). Catalysis at the interface: the anatomy of a conformational change in a triglyceride lipase. *Biochemistry* **31**, 1532-1541.
- Devlin, T. (2004). Bioquímica: libro de texto con aplicaciones clínicas. Ed. Reverté, Barcelona, España. 1216pp.
- Dharmshiti, S. & Ammaranond, P. (1997). Purification and characterization of lipase from a raw-milk yeast (*Trichosporon asteroides*). *Biotechnol Appl Biochem* **26**, 111-116.
- Dheeman, D. (2011). Microbial lipases of potential in biocatalysis: screening, purification, molecular cloning and heterologous expression of actinomycete lipases in *Escherichia coli*. Dublin Institute of Technology. PhD Thesis.
- *Díaz, B., Rubio, V. & Fereres, A. (2005). Control biológico de plagas y enfermedades de los cultivos. In: I. Marín, J. Sanz & R. Amils (Eds.). Biotecnología y medio ambiente. Ephemera, Madrid, España. 376pp.
- Díaz-Puentes, N. (2012). Resistencia sistémica adquirida mediada por el ácido salicílico. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial* **10**, 257-267.
- Dodd, S., Lieckfeldt, S. & Samuels, G. (2003). *Hypocrea atroviridis* sp nov., the teleomorph of *Trichoderma atroviride*. *Mycologia* **95**, 27-40.
- Drabløs, F. & Petersen, S. (1997). Identification of conserved residues in family of esterase and lipase sequences. *Methods Enzymol* **284**, 28-61.
- Druzhinina, I., Seidl-Seiboth, V., Herrera-Estrella, A., Horwitz, B., Kenerley, C., Monte, E., Mukherjee, P., Zeilinger, S., Grigoriev, I. & Kubicek, C. (2011). *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nature Rev Microbiol* **9**, 749-759.

BIBLIOGRAFÍA

- Eggert, T., Brockmeier, U., Droge, M., Quax, W. & Jaeger, K. (2003). Extracellular lipases from *Bacillus subtilis*: regulation of gene expression and enzyme activity by amino acid supply and external pH. *FEMS Microbiol Lett* **225**, 319–224.
- Eggert, T., van Pouderooyen, G., Pancreac'h, G., Douchet, I., Verger, R., Dijkstra, B. & Jaeger, K. (2002). Biochemical properties and three-dimensional structures of two extracellular lipolytic enzymes from *Bacillus subtilis*. *Colloids Surf, B* **26**, 37–46.
- Egmond, M. & Vlieg, J. (2000). *Fusarium solani pisi* cutinase. *Biochimie* **82**, 1015–1021.
- Einerhand, A., Kos, W., Distel, B. & Tabak, H. (1993). Characterization of a transcriptional control element involved in proliferation of peroxisomes in yeast in response to oleate. *Eur J Biochem* **214**, 323–331.
- Elble, R. & Tye, B. (1991). Both activation and repression of a-mating-type-specific genes in yeast require transcription factor Mcm1. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 10966–10970.
- Elferink, V. (1995). Progress in the application of biocatalysis in the industrial scale manufacture of chiral molecules. In: Chiral USA 96, 11th International Spring Innovations Chirality Symposium. Boston, USA. pp. 79–80.
- Elibol, M. & Ozer, D. (2001). Influence of oxygen transfer on lipase production by *Rhizopus arrhizus*. *Process Biochem* **36**, 325–329.
- Eppendorf (2004). *Pichia pastoris* transformation protocol. 1pp.
- Ericsson, D., Kasrayan, A., Johansson, P., Bergfors, T., Sandström, A., Bäckvall, J. & Mowbray, S. (2008). X-ray structure of *Candida antarctica* lipase A shows a novel lid structure and a likely mode of interfacial activation. *J Mol Biol* **376**, 109–119.
- Essamri, M., Valerie, D. & Louis, C. (1998). Optimization of lipase production by *Rhizopus oryzae* and study on the stability of lipase activity in organic solvents. *J Biotechnol* **60**, 97–103.
- Estruch, F. (2000). Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiol Rev* **24**, 469–486.
- *Faber, K. (2011). *Biotransformations in Organic Chemistry*. Springer, New York, USA. 423pp.
- Facchin, S., Alves, P., Siquiera, F., Barocca, T., Victoria, J. & Kalapothakis, E. (2013). Biodiversity and secret ion of enzymes with potential utility in wastewater treatment. *Open J Ecol* **3**, 34–47.
- Fadile, A., Hassani, F., Aisam, H., Merzouki, M. & Benlemih, M. (2011). Aerobic treatment of lipid-rich wastewater by a bacterial consortium. *Afr J Microbiol* **5**, 5333–5342.
- Farrell, R., Hata, K. & Wall, M. (1997). Solving pitch problems in pulp and paper processes by the use of enzymes or fungi. *Adv Biochem Eng/Biotechnol* **57**, 197–212.
- Faulkner, C., & Robatzek, S. (2012). Plants and pathogens: putting infection strategies and defence mechanisms on the map. *Curr Opin Plant Biol* **15**, 699–707.
- Feng, J. (2007). Molecular characterization of a *Fusarium graminearum* lipase gene and its promoter. PhD Thesis. University of Saskatchewan. Saskatoon, Canada.
- Fernandez-Lafuente, R. (2010). Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst. *J Mol Catal B: Enzym* **62**, 197–212.

BIBLIOGRAFÍA

- Fernández-Lorente, G., Palomo, J., Cabrera, Z., Guisán, J. & Fernández-Lafuente, R. (2007). Specificity enhancement towards hydrophobic substrates by immobilization of lipases by interfacial activation on hydrophobic supports. *Enzyme Microb Technol* **41**, 565-569.
- Ferrè, F. & Clote, P. (2005a). Disulfide connectivity prediction using secondary structure information and diresidue frequencies. *Bioinformatics* **21**, 2336-2346.
- Ferrè, F. & Clote, P. (2005b). DiANNA: a web server for disulfide connectivity prediction. *Nucleic Acids Res* **33**, W230-232.
- Ferrè, F. & Clote, P. (2006). DiANNA 1.1: an extension of the DiANNA web server for ternary cysteine classification. *Nucleic Acids Res* **34**, W182-185.
- Ferreira-Dias, S., Sandoval, G., Plou, F. & Valero, F. (2013). The potential use of lipases in the production of fatty acid derivatives for the food and nutraceutical industries. *Electron J Biotechnol* **16**.
- Fickers, P., Destain, J. & Thonart, P. (2008). Les lipases sont des hydrolases atypiques: principales caractéristiques et applications. *Biotechnol Agron Soc Environ* **12**, 119-130.
- Filipits, M., Simon, M., Rapatz, W., Hamilton, B. & Ruis, H. (1993). A *Saccharomyces cerevisiae* upstream activating sequence mediates induction of peroxisome proliferation by fatty acids. *Gene* **132**, 49-55.
- Fischer, M. & Pleiss, J. (2003). The Lipase Engineering Database: a navigation and analysis tool for protein families. *Nucleic Acids Res* **31**, 319-321.
- Fischer, M., Thai, Q., Grieb, M. & Pleiss, J. (2006). DWARF—a data warehouse system for analyzing protein families. *BMC Bioinformatics* **7**, 495-504.
- Fjerbaek, L., Christensen, K. & Norddahl, B. (2009). A review of the current state of biodiesel production using enzymatic transesterification. *Biotechnol Bioeng* **102**, 1298-1315.
- Fleige, S. & Pfaffl, M. (2006). RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Mol Aspects Med* **27**, 126-139.
- Fojan, P., Jonson, P., Petersen, M. & Petersen, S. (2000). What distinguishes an esterase from a lipase: a novel structural approach. *Biochimie* **82**, 1033-1041.
- Fonteyn, F., Blecker, C., Lognay, G., Marlier, M., & Severin, M. (1994). Optimization of lipase-catalyzed synthesis of citronellyl acetate in solvent-free medium. *Biotech Lett* **16**, 693-696.
- Fukuda S, Hayashi S, Ochiai H, Iizumi T, Nakamura K. (1990). Improvers for deinking of wastepaper. Japanese Patent 2229290.
- Fukue, Y., Sumida, N., Nishikawa, J. & Ohyama, T. (2004). Core promoter elements of eukaryotic genes have a highly distinctive mechanical property. *Nucl Acids Res* **32**, 5834-5840.
- Furmanek, A. & Hofsteenge, J. (2000). Protein C-mannosylation: facts and questions. *Acta Biochim Pol* **47**, 781-789.
- Garcia-Salcedo, R., Lubitz, T. & Beltran, G. (2014). Glucose de-repression by yeast AMP-activated protein kinase SNF1 is controlled via at least two independent steps. *FEBS J* **281**, 1901-1917.
- Garlapati, V. & Banerjee, R. (2013). Solvent-free synthesis of flavour esters through immobilized lipase mediated transesterification. *Enzyme Res*, Article ID 367410, 6 pages.

BIBLIOGRAFÍA

- Gavrilescu, M. & Chisti, Y. (2005). Biotechnology—a sustainable alternative for chemical industry. *Biotechnol Adv* **3**, 471–499.
- Gentile, A., Deng, Z., La Malfa, S., Distefano, G., Domina, F., Vitale, A., Polizzi, G., Lorito, M. & Tribulato, E. (2007). Enhanced resistance to *Phoma tracheiphila* and *Botrytis cinerea* in transgenic lemon plants expressing a *Trichoderma harzianum* chitinase gene. *Plant Breed* **126**, 146–151.
- Ghanem, E., Al-Sayeed, H. & Saleh, K. (2000). An alkalophilic thermostable lipase produced by a new isolate of *Bacillus alcalophilus*. *World J Microbiol Biotechnol* **16**, 459–464.
- Ghosh, P., Saxena, T., Gupta, R., Yadav, R. & Davidson, S. (1996). Microbial lipases: production and applications. *Sci Prog* **79**, 119–157.
- Ghosh, D., Erman, M., Sawicki, M., Lala, P., Weeks, D., Li, N. & Eyzaguirre, J. (1999). Determination of a protein structure by iodination: the structure of iodinated acetylxylan esterase. *Acta Crystallog, sect D* **55**, 779-784.
- Gilham, D. & Lehner, R. (2005). Techniques to measure lipase and esterase activity in vitro. *Methods* **36**, 139–147.
- Gill, I. & Valivety, R. (1997a). Polyunsaturated fatty acids: Part 1. Occurrence, biological activities and applications. *Trends Biotechnol* **15**, 401-409.
- Gill, I. & Valivety, R. (1997b). Polyunsaturated fatty acids: Part 2. Biotransformations and biotechnological applications. *Trends Biotechnol* **15**, 470-478.
- Gillies, B., Yamazaki, H. & Armstrong, D. (1987). Production of flavour ester by immobilized lipase. *Biotechnol Lett* **9**, 709-714.
- Gingrich, J., Rubio, T. & Karlak, C. (2008). Effect of RNA degradation on the data quality in quantitative PCR and microarray experiments. *Bio-Rad Bulletin*, 5452.
- Godtfredsen, S. (1993). Lipases. In: T. Nagodawithana & G. Reed (Eds.). *Enzymes in Food Processing*. Academic Press Inc., London, UK. pp. 205-219.
- González-Bacerio, J., Hernández, J. & Martínez, A. (2010). Las lipasas: enzimas con potencial para el desarrollo de biocatalizadores inmovilizados por adsorción interfacial. *Rev Colomb Biotechnol* **12**, 124-140.
- González-Ramos, F. (1997). Aislamiento y caracterización de dos genes que codifican para enzimas enantioselectivas de interés industrial: lipasa de *Yarrowia lipolytica* y D-aminoácido oxidasa de *Trigonopsis variabilis*. PhD Thesis. Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain.
- Goto, M., Noda, S., Kamiya, N. & Nakashio, F. (1996). Enzymatic resolution of racemic ibuprofen by surfactant-coated lipases in organic media. *Biotechnol Lett* **18**, 839–844.
- Gotor, V., Astorga, C. & Rebolledo, F. (1990). An improved method for the preparation of acylhydrazines: the 1st example of an enzymatic hydrazinolysis reaction. *Synlett* 387-388.
- Gotor-Fernández, V., Brieva, R. & Gotor, V. (2006). Lipases: useful biocatalysts for the preparation of pharmaceuticals. *J Mol Catal B: Enzym* **40**, 111.
- *Granados-Baeza, M. & Riveramuñoz, G. (1997). Abstr Gen Meet Am Soc Microbiol Meeting pp. 428.
- Grbavčić, S., Bezbradica, D., Izrael-Živković, L., Avramović, N., Milosavić, N., Karadž, I. & Knežević-Jugović, Z. (2011). Production of lipase and protease from an indigenous *Pseudomonas*

BIBLIOGRAFÍA

- aeruginosa* strain and their evaluation as detergent additives: compatibility study with detergent ingredients and washing performance. *Bioresour Technol* **102**, 11226-11233.
- Grochulski, P., Li, Y., Schrag, J., Bouthillier, F., Smith, P., Harrison, D. & Cygler, M. (1993). Insights into interfacial activation from an open structure of *Candida rugosa* lipase. *J Biol Chem* **268**, 12843–12847.
- Grochulski, P., Schrag, J. & Cygler, M. (1994). Two conformational states of *Candida rugosa* lipase. *Protein Sci* **3**, 82-91.
- Gunasekaran, V. & Das, D. (2005). Lipase fermentation: progress and prospects. *Indian J Biotechnol* **4**, 437-445.
- Guncheva, M. & Zhiryakova, D. (2011). Catalytic properties and potential applications of *Bacillus* lipases. *J Mol Catal B: Enzym* **68**, 1–21.
- Gunstone, F. (1999). Enzymes as biocatalysts in the modification of natural lipids. *J Sci Food Agric* **79**, 1535–1549.
- Gupta, R., Gupta, N. & Rathi, P. (2004). Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl Microbiol Biotechnol* **64**, 763-781.
- Gupta, R., Rathi, P. & Bradoo, S. (2003). Lipase mediated upgradation of dietary fats and oils. *Crit Rev Food Sci Nutr* **43**, 635-644.
- Gurvitz, A., Wabnegger, I., Rottensteiner, H., Dawes, I., Hartig, A., Ruis, H. & Hamilton, B. (2000). Adr1p-dependent regulation of the oleic acid-inducible yeast gene *SPS19* encoding the peroxisomal β -oxidation auxiliary enzyme 2,4-dienoyl-CoA reductase. *Mol Cell Biol Res Commun* **4**, 81-89.
- Gutiérrez, A., Del Río, J. & Martínez, A. (2009). Microbial and enzymatic control of pitch in the pulp and paper industry. *Applied Microbiology and Biotechnology* **82**, 1005– 1018.
- Gutiérrez-Fernández, J., Vaquero, M., Prieto, A., Barriuso, J., Martínez, M. & Hermoso, J. (2014). Crystal structures of *Ophiostoma piceae* sterol esterase: structural insights into activation mechanism and product release. *J Struct Biol* **187**, 215-222.
- Gyarmati, Z., Liljeblad, A., Rintola, M., Bernath, G. & Kanerva, L. (2003). Asymmetry lipase-catalyzed kinetic resolution of 7-, 8- and 12-membered alicyclic β -amino esters and N-hydroxymethyl- β -lactam enantiomers. *Tetrahedron* **14**, 3805-3814.
- Gyarmati, Z., Liljeblad, A., Argay, G., Kalman, A., Bernath, G. & Kanerva, L. (2004). Chemoenzymatic preparation of enantiopure homoadamantyl β -amino acid and β -lactam derivatives. *Adv Synth Catal* **346**, 566-572.
- *Haalck, L., Hedrich, H., Hassink, J. & Spener, F. (1992). *Prog Biotechnol* **8**, 505-572.
- Hadibarata, T., Tachibana, S. & Itoh, K. (2007). Biodegradation of phenanthrene by fungi screened from nature. *Pak J Biol Sci* **10**, 2535-2543.
- Hamam, F., & Shahidi, F. (2005). Enzymatic incorporation of capric acid into a single cell oil rich in docosahexaenoic acid and docosapentaenoic acid and oxidative stability of the resultant structured lipid. *Food Chem* **91**, 583-591.
- Hampsey, M. (1998). Molecular genetics of the RNA polymerase II general transcriptional machinery. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**, 465–503.

BIBLIOGRAFÍA

- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-580.
- Handelsman, J. (2005). Sorting out metagenomes. *Nat Biotechnol* **23**, 38-39.
- Harman, G., Herrera-Estrella, A., Horwitz, B. & Lorito, M. (2012). Special issue: *Trichoderma* – from basic biology to biotechnology. *Microbiology* **158**, 1–2.
- Harman, G., Howell, C., Viterbo, A., Chet, I. & Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. *Microbiology* **2**, 43- 56.
- Hasan, F., Shah, A. & Hameed, A. (2006). Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme Microb Technol* **39**, 235-251.
- Hassing, G. (1971). Partial purification and some properties of a lipase from *Corynebacterium acnes*. *Biochem Biophys Acta* **242**, 381-394.
- Haurie, V. (2001). The transcriptional activator Cat8p provides a major contribution to the reprogramming of carbon metabolism during the diauxic shift in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **276**, 76-85.
- Hawkey, P. & Bergogne-Berezin, E. (2006). *Acinetobacter* spp. In: S. Gillespie & P. Hawkey (Eds.). Principles and Practice of Clinical Bacteriology. John Wiley & Sons, London, UK. pp. 231-244.
- Heid, C., Stevens, J., Livak, K. & Williams, P. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Res* **6**, 986-994.
- Hein, M., Best, L., Pattison, S. & Arena, S. (2013). Introduction to General, Organic and Biochemistry. Wiley., London, UK. 1088pp.
- Helisto, P. & Korpela, T. (1998). Effect of detergents on activity of microbial lipases as measured by the nitrophenyl alkonate esters method. *Enzyme Microb Technol* **23**, 113-117.
- Hermosa, R., Botella, L., Keck, E., Jiménez, J. A., Montero-Barrientos, M., Arbona, V., Gómez-Cadenas, A., Monte, E. & Nicolás, C. (2011). The overexpression in *Arabidopsis thaliana* of a *Trichoderma harzianum* gene that modulates glucosidase activity, and enhances tolerance to salt and osmotic stresses. *J Plant Physiol* **168**, 1295–1302.
- Hermosa, R., Viterbo, A., Chet, I. & Monte, E. (2012). Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology* **158**, 17-25.
- Hermosa, R., Rubio, B., Cardoza, R., Nicolás, C., Monte, E. & Gutiérrez, S. (2013). The contribution of *Trichoderma* to balancing the costs of plant growth and defense. *Int Microbiology* **16**, 69-80.
- Hernaiz, M. (2012). Biotatálisis aplicada a la síntesis de fármacos (I) Enzimas hidrolíticas. In: J. Sánchez Montero, F. Ortiz Apodaca, J. Doadrio Villarejo & A. Doadrio Villarejo (Eds.). Monografía XXXV: Biotatálisis aplicada a la obtención de fármacos y productos de alto valor añadido. Real Academia Nacional de Farmacia, Madrid, Spain. pp. 194-237.
- Hiesinger, M., Roth, S., Meissner, E. & Schüller, H. (2001). Contribution of Cat8 and Sip4 to the transcriptional activation of yeast gluconeogenic genes by carbon source-responsive elements. *Curr Genet* **39**, 68-76.
- Hinnebusch, A. & Natarajan, K. (2002). Gcn4p, a master regulator of gene expression, is controlled at multiple levels by diverse signals of starvation and stress. *Eukaryot Cell* **1**, 22-32.

BIBLIOGRAFÍA

- Hiol, A., Jonzo, M., Rugani, N., Druet, D., Sarda, L. & Comeau, L. (2000). Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit. *Enzyme Microb Technol* **26**, 421–430.
- Hirohara, H., Mitsuda, S., Ando, E. & Komak, R. (1985). Enzymatic preparation of optically active alcohols related to synthetic pyrethroids insecticides. *Stud Org Chem* **22**, 119-134.
- Hjort, A., Carrière, F., Cudrey, C., Wöldike, H., Boel, E., Lawson, D., et al. (1993). A structural domain (the lid) found in pancreatic lipases is absent in guinea pig (phospho)lipase. *Biochemistry* **32**, 4702-4707.
- Hoffman, C. & Winston, F. (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* **57**, 267-272.
- Holland, M., Yokoi, T., Holland, J., Myambo, K. & Innis, M. (1987). The *GCR1* gene encodes a positive transcriptional regulator of the enolase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene families in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **7**, 813-20.
- Holmquist, M. (2000). Alpha/beta-hydrolase fold enzymes: structures, functions and mechanisms. *Curr Protein Pept Sci* **1**, 209-235.
- Horchani, H., Aissa, I., Ouertani, S., Zarai, Z., Gargouri, Y. & Sayari, A. (2012). Staphylococcal lipases: biotechnological applications. *J Mol Catal B: Enzym* **76**, 125–132.
- Hou, C. (1994). pH dependence and thermostability of lipases from cultures from ARS culture collection. *J Ind Microbiol* **13**, 242–248.
- Houde, A., Kademi, A. & Leblanc, D. (2004). Lipases and their industrial applications - an overview. *Appl Biochem Biotechnol* **118**, 155-170.
- Hu, B., Pan, J., Yu, H., Liu, J. & Xu, J. (2009). Immobilization of *Serratia marcescens* lipase onto amino-functionalized magnetic nanoparticles for repeated use in enzymatic synthesis of diltiazem intermediate. *Process Biochem* **44**, 1019-1024.
- Huge-Jensen, I. & Gormsen, E. (1989). Enzymatic detergent additive. USA Patent 4810414.
- Hulo, N., Bairoch, A., Bulliard, V., Cerutti, L., De Castro, E., Langendijk-Genevaux, P. & Cerutti, L. (2006). The PROSITE database. *Nucleic Acids Res* **34**, D227-30.
- Hulshof, L. & Roskam, J. (1989). Phenylglycidate stereoisomers, conversion products thereof with e.g. 2-nitrophenol and preparation of diltiazem. European Patent EP0343714.
- Hutt, A. & Caldwell, J. (1984). The importance of stereochemistry in the clinical pharmacokinetics of the 2-arylpropionic acid nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Clin Pharmacokinet* **9**, 371-373.
- Ihara, Y., Manabe, S., Kanda, M., Kawano, H., Nakayama, T., Sekine, I., Ito, Y. (2005). Increased expression of protein C-mannosylation in the aortic vessels of diabetic Zucker rats. *Glycobiology* **15**, 383-392.
- Invitrogen (2002). *Pichia* Expression Kit. A Manual of Methods for Expression of Recombinant Proteins in *Pichia pastoris*. 84pp.
- Ishihara, H., Okumura, H., Ikezawa, H. & Tejima, S. (1975). Studies on lipase from *Mucor javanicus*. *Biochim Biophys Acta* **388**, 413–417.
- Iso, M., Chen, B., Eguchi, M., Kudo, T. & Shrestha, S. (2001). Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. *J Mol Cat B* **16**, 53–58.

- Jaeger, K., Ransac, S., Dijkstra, B., Colson, C., van Heuvel, M., & Misset, O. (1994). Bacterial lipases. *FEMS Microbiol Rev* **15**, 29-63.
- Jaeger, K. & Reetz, M. (1998). Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnol* **16**, 396-403.
- Jaeger, K., Dijkstra, B. & Reetz, M. (1999). Bacterial biocatalytics: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Ann Rev Microbiol* **53**, 315-351.
- Jaeger, K. & Eggert, T. (2002). Lipases for biotechnology. *Curr Opin Biotechnol* **13**, 390-397.
- Jansen, R. (2001). mRNA localization: message on the move. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 247-256.
- Jensen, R. (1983). Detection and determination of lipase (acylglycerol hydrolase) activity from various sources. *Lipids* **18**, 650-657.
- Jensen, R., DeJong, F. & Clark, R. (1983). Determination of lipase specificity. *Lipids* **18**, 239-252.
- Jiménez-Díaz, I., Ballesteros, O., Zafra-Gómez, A., Crovetto, G., Vilchez, J., Navalón, A. & Ferrer, J. (2010). New sample treatment for the determination of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates in agricultural soils. *Chemosphere* **80**, 2.
- Kaminishi, Y., Tanie, H. & Kimimoto, M. (1999). Purification and characterization of lipases from *Aspergillus repens* and *Eurotrium herbariorum* NU-2 used in "Katsuobushi" molding. *Fish Sci* **65**, 274-278.
- Kanwar, L. & Goswami, P. (2002). Isolation of a *Pseudomonas* lipase produced in pure hydrocarbon substrate and its applications in the synthesis of isoamyl acetate using membrane-immobilized lipase. *Enzyme Microb Technol* **31**, 727-735.
- Kar, M., Ray, L. & Chattopadhyay, P. (1996). Isolation and identification of alkaline thermostable lipase producing microorganism and some properties of crude enzyme. *Ind J Exp Biol* **34**, 535-538.
- Karigar, S. & Rao, S. (2011). Role of microbial enzymes in the bioremediation of pollutants: a review. *Enzyme Res*, Article ID 805187, 11 pages.
- Karpichev, I. & Small, G. (1998). Global regulatory functions of Oaf1p and Pip2p (Oaf2p), transcription factors that regulate genes encoding peroxisomal proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **18**, 6560-6570.
- Karunanithi, S., & Cullen, P. (2012). The filamentous growth MAPK pathway responds to glucose starvation through the Mig1/2 transcriptional repressors in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **192**, 869-887.
- Kazlauskas, R. & Bornscheuer, U. (1998). Biotransformations with lipases. In: H. R. Rehm (Ed.). *Biotechnology*. Wiley-VCH, New York, USA. pp. 37-192.
- Kazlauskas, R., Weissfloch, A., Rappaport, A. & Cuccia, L. (1991). A rule to predict which enantiomer of a secondary alcohol reacts faster in reactions catalyzed by cholesterol esterase, lipase from *Pseudomonas cepacia*, and lipase from *Candida rugosa*. *J Org Chem* **56**, 2656-2665.
- Kelley, L. & Sternberg, M. (2009). Protein structure prediction on the web: a case study using the Phyre server. *Nat Protoc* **4**, 363-371.

BIBLIOGRAFÍA

- Kilara, A. (2011). Enzymes exogenous to milk in dairy technology: lipases. In: J. Fukuai (Ed.). *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Academic Press Inc., London, UK. pp. 284-288.
- Kim, H. & Song, W. (2006). Lipase treatment of polyester fabrics. *Fibers Polym* **7**, 339-343.
- Kim, K., Song, H., Shin, D., Hwuang, K. & Suh, S. (1997). The crystal structure of a triacylglycerol lipase from *Pseudomonas cepacia* reveals a highly open conformation in the absence of a bound inhibitor. *Structure* **5**, 173-185.
- Kitamura, M., Nagaoka, H., Naoshima, Y., Kamezawa, M., Tachibana, H. & Ohtani, T. (1996). Chemoenzymatic synthesis of (R)-(+)-patulolide A, a macrolide antibiotic isolated from *Penicillium urticae*. *Liebigs Ann* **2**, 167-170.
- Knight, K., Pimentel, M., Morais, M., Ledingham, W., Filho, J., & Maia, M. (2000). Immobilization of lipase from *Fusarium solani* FS1. *Braz J Microbiol* **31**, 220-222.
- Ko, W., Wang, I. & Ann, P. (2005). A simple method for detection of lipolytic microorganisms in soils. *Soil Biol Biochem* **37**, 597-599.
- Kohno, M., Kugimiya, W., Hashimoto, Y. & Morita, Y. (1994). Purification, characterization and crystallization of two types of lipases from *Rhizopus niveus*. *Biosci Biotechnol Biochem* **58**, 1007-1112.
- Kohno, M., Enatsu, M., Yoshiizumi, M. & Kugimiya, W. (1999). High-level expression of *Rhizopus niveus* lipase in yeast *Saccharomyces cerevisiae* and structural properties of the expressed enzyme. *Protein Expression Purif* **15**, 327-335.
- Koritala, S., Hesseltine, C., Pryde, E., & Mounts, T. (1987). Biochemical modification of fats by microorganisms: a preliminary study. *J Am Oil Chem Soc* **64**, 509-513.
- Koutz, P., Davis, G., Stillman, C., Barringer, K., Cregg, J., & Thill, G. (1989). Structural comparison of the *Pichia pastoris* alcohol oxidase genes. *Yeast* **5**, 167-177.
- Kratzer, S. & Schuller, H. (1997). Transcriptional control of the yeast acetyl-CoA synthetase gene, ACS1, by the positive regulators CAT8 and ADR1 and the pleiotropic repressor UME6. *Mol Microbiol* **26**, 631-641.
- Krieger, N., Taipa, M., Melo, E., Lima, F. & Cabral, J. (1997). Kinetic characterization of *Penicillium citrinum* lipase in AOT/Isooctane-reversed micelles. *Appl Microbiol Biotechnol* **67**, 85-87.
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G. & Sonnhammer, E. (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol* **305**, 567-580.
- Kubicek, C., Mikus, M., Schuster, A., Schmoll, M. & Seiboth, B. (2009). Metabolic engineering strategies for the improvement of cellulase production by *Hypocrea jecorina*. *Biotechnol Biofuels* **1**, 2-19.
- Kubicek, C., Herrera-Estrella, A., Seidl-Seiboth, V., Martinez, D., Druzhinina, I., Thon, M., et al. (2011). Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of *Trichoderma*. *Genome Biology* **12**, R40.
- Kumar, A. & Kanwar, S. (2011). Synthesis of ethyl ferulate in organic medium using celite-immobilized lipase. *Bioresour Technol* **102**, 2162-2167.

BIBLIOGRAFÍA

- Kumar, S., Mathur, A., Singh, V., Nandy, S., Khare, S. & Negi, S. (2012). Bioremediation of waste cooking oil using a novel lipase produced by *Penicillium chrysogenum* SNP5 grown in solid medium containing waste grease. *Bioresour Technol* **120**, 300-304.
- Kutach, A., & Kadonaga, J. (2000). The downstream promoter element DPE appears to be as widely used as the TATA box in *Drosophila* core promoters. *Mol Cell Biol* **20**, 4754-4764.
- Kwon, C., Lee, J., Kim, S. & Kang, J. (2009). Lipase-catalyzed esterification of (S)-naproxen ethyl ester in supercritical carbon dioxide. *J Microbiol Biotechnol* **19**, 1596-1602.
- Kwon, M., Kim, H., Yang, T., Song, B. & Song, J. (2009). High-level expression and characterization of *Fusarium solani* cutinase in *Pichia pastoris*. *Protein Express Purif* **68**, 104-109.
- Kyte, J. & Doolittle, R. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* **157**, 105-132.
- Lacointe, C., Dubreucq, E. & Galzy, P. (1996). Ester synthesis in aqueous media in the presence of various lipases. *Biotechnol Lett* **18**, 869-874.
- Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nat* **227**, 680-685.
- Lagrange, T., Kapanidis, A. A., Tang, H., Reinberg, D. & Ebright, R. (1998). New core promoter element in RNA polymerase II-dependent transcription: Sequence-specific DNA binding by transcription factor IIB. *Genes Dev* **12**, 34-44.
- Larkin, M., Blackshields, G., Brown, N., Chenna, R., McGettigan, P., McWilliam, H. & Higgins, D. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinf* **23**, 2947-2948.
- Larriba, G. (1993). Translocation of proteins across the membrane of the endoplasmic reticulum: a place for *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **9**, 441-463.
- Lawrence, R., Fryer, T. & Reiter, B. (1967). The production and characterization of lipases from a *Micrococcus* and *Pseudomonas*. *J Gen Microbiol* **48**, 401-418.
- Lawson, D., Brzozowski, A., Dodson, G., Hubbard, R., Huge-Jensen, B., Boel, E. & Derewenda, Z. (1994). In: P. Woolley & S. Petersen (Eds.). Lipases: their structure, biochemistry and application. Cambridge University Press, London, UK. pp. 77-94.
- Lazniewski, M., Steczkiewicz, K., Knizewski, L., Wawer, I. & Ginalski, K. (2011). Novel transmembrane lipases of alpha/beta hydrolase fold. *FEBS Letters* **585**, 870-874.
- Lee, O., Koh, Y., Kim, K., Kim, B., Choi, H., Kim, D. & Pyun, Y. (1999). Isolation and characterization of a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1. *FEMS Microbiol Lett* **179**, 393-400.
- Lenfant, N., Hotelier, T., Velluet, E., Bourne, Y., Marchot, P. & Chatonnet, A. (2013). ESTHER, the database of the a/b-hydrolase fold superfamily of proteins: tools to explore diversity of functions. *Nucleic Acids Res* **41**, D423-D429.
- Lesuisse, E., Schanck, K., & Colson, C. (1993). Purification and preliminary characterization of the extracellular lipase of *Bacillus subtilis* 168, an extremely basic pH-tolerant enzyme. *Eur J Biochem* **216**, 155-160.
- Li, Q. & Yan, Y. (2008). Production of biodiesel catalyzed by immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase from *Sapium sebiferum* oil in micro-aqueous phase. *Appl Energ* **87**, 3148-3154.

BIBLIOGRAFÍA

- Litthauer, D., Ginster, A. & Skein, E. (2002). *Pseudomonas luteola* lipase: a new member of the 320-residue *Pseudomonas* lipase family. *Enzyme Microb Technol* **30**, 209–215.
- Liu, I. & Tsai, S. (2003). Improvements in lipase production and recovery from *Acinetobacter radioresistens* in presence of polypropylene powders filled with carbon sources. *Appl Biochem Biotechnol* **104**, 129–140.
- Liu, M., Sun, Z. X., Zhu, J., Xu, T., Harman, G. & Lorito, M. (2004). Enhancing rice resistance to fungal pathogens by transformation with cell wall degrading enzyme genes from *Trichoderma atroviride*. *J Zhejiang Univ Sci* **5**, 133–136.
- Liu, R., Jiang, X., Mou, H., Guan, H., Hwang, H. & Li, X. (2009). A novel low-temperature resistant alkaline lipase from a soda lake fungus strain *Fusarium solani* N4-2 for detergent formulation. *Biochem Eng J* **46**, 265–270.
- Liu, Y. & Whittier, R. (1995). Thermal asymmetric interlaced PCR: automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking. *Genomics* **25**, 674–681.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S., Matsudaira, P., Baltimore, D. & Darnell, J. (2000). *Molecular Cell Biology*. W. H. Freeman and Company, New York, USA.
- Long, K., Ghazali, H., Ariff, A., Ampon, K. & Bucke, C. (1996). In-situ crosslinking of *Aspergillus flavus* lipase: improvement of activity, stability and properties. *Biotechnol Lett* **18**, 1169–1174.
- Long, K., Ghazal, H., Ariff, A., Man, Y. & Bucke, C. (1998). Substrate preference of mycelium-bound lipase from a strain of *Aspergillus flavus* Link. *Biotechnol Lett* **20**, 369–372.
- Long, Z., Xu, J., Zhao, L., Pan, J., Yang, S. & Hua, L. (2007). Overexpression of *Serratia marcescens* lipase in *Escherichia coli* for efficient bioresolution of racemic ketoprofen. *J Mol Catal B Enzym* **27**, 105–110.
- Lopes, M., Leitão, A., Regalla, M., Marques, J., Carrondo, M., & Crespo, M. (2002). Characterization of a highly thermostable extracellular lipase from *Lactobacillus plantarum*. *Int J Food Microbiol* **76**, 107–115.
- Lorito, M., Woo, S., García, I., Colucci, G., Harman, G., Pintor-Toro, J., Filippone, E., Muccifora, S., Lawrence, C., Zoina, A., Tuzun, S. & Scala, F. (1998). Genes from mycoparasitic fungus as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 7860–7865.
- Lorito, M., Woo, S., Harman, G. & Monte, E. (2010). Translational research on *Trichoderma*: from omics to the field. *Annu Rev Phytopathol* **48**, 395–417.
- Lotti, M. & Alberghina, L. (2007). Lipases: molecular structure and function. In: J. P. MacCabe (Ed.), *Industrial Enzymes: structure, function and applications*. Springer, Dordrecht, Netherlands. pp. 263–282.
- Loughlin, W. (2000). Biotransformations in organic synthesis. *BioresourTechnol* **74**, 49–62.
- Luković, N., Knežević-Jugović, Z. & Bezbradica, D. (2011). Biodiesel fuel production by enzymatic transesterification of oils: recent trends, challenges and future perspectives. In: M. Manzanera (Ed.). *Alternative Fuel*. InTech, Belgrado, Serbia. pp. 47–71.
- Lund, H. (2001). Process for combined desizing and “stone-washing” of dyed denim. USA Patent 6261828.

BIBLIOGRAFÍA

- Macauley-Patrick, S., Fazenda, M., McNeil, B. & Harvey, L. (2005). Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast* **22**, 249–270.
- Macrae, A. (1985). Enzyme-catalysed modification of oils and fats. *Phil Trans R Soc Lond B* **310**, 227-233.
- Macrae, A., & Hammond, R. (1985). Present and Future application of lipases. *Biotechnol Genet Eng Rev* **3**, 193-217.
- Macrae, A. (1986). Process for the preparation of esters. European Patent 0274798.
- Mahadik, N., Puntambekar, U., Bastawde, K., Khire, J. & Gokhale, D. (2002). Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. *Process Biochem* **38**, 715–721.
- Mancheño, J., Pernas, M., Martínez, M., Ochoa, B., Rúa, M. & Hermoso, J. (2003). Structural insights into the lipase/esterase behavior in the *Candida rugosa* lipases family: crystal structure of the lipase 2 isoenzyme at 1.97 Å. *J Mol Biol* **332**, 1059-1069.
- Marchetti, J., Miguel, V., & Erazzu, A. (2007). Possible methods for biodiesel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **11**, 1300-1311.
- Margesin, R., Schinner, F. & Zimmerbauer, A. (1999). Soil lipase activity – a useful indicator of oil biodegradation. *Biotechnol Tech* **13**, 859–863.
- Margesin, R., Schinner, F. & Zimmerbauer, A. (2000). Monitoring of bioremediation by soil biological activities. *Chemosphere* **40**, 339-345.
- Martinez, C., De Geus, P., Lauwereys, M., Matthysens, G., & Cambillau, C. (1992). *Fusarium solani* cutinase is a lipolytic enzyme with a catalytic serine accessible to solvent. *Nat* **356**, 615–618.
- *Maruha (1996). Japanese Patente JP-J08089265.
- Masse, L., Kennedy, K. & Chou, S. (2001). Testing of alkaline and enzymatic hydrolysis pretreatments for fat particles in slaughterhouse wastewater. *Bioresour Technol* **77**, 145–155.
- Masunaka, A., Hyakumachi, M., & Takenaka, S. (2011). Plant growth promoting fungus, *Trichoderma koningi* suppresses isoflavonoid phytoalexin vestitol production for colonization on/in the roots of *Lotus japonicus*. *Microbes Environ* **26**, 128–134.
- *Mathews, C., van Holde, K. & Ahern, K. (2000). *Biochemistry*. Benjamin Cummings, UK. 2464pp.
- Matsumae, H., Furul, M. & Shibatani, T. (1993). Lipase-catalyzed asymmetric hydrolysis of 3-phenylglycidic acid ester, the key intermediate in the synthesis of diltiazem hydrochloride. *J Ferment Bioeng* **75**, 93–98.
- Matsumae, H., Furul, M., Shibatani, T. & Tosa, T. (1994). Production of optically active 3-phenylglycidic acid ester by the lipase from *Serratia marcescens* on a hollow-fiber membrane reactor. *J Ferment Bioeng* **78**, 59–63.
- Matsuoka, J., Miora, A. & Hori, K. (2009). Symbiotic effects of a lipase-secreting bacterium, *Burkholderia arboris* SL1B1, and a glycerol-assimilating yeast, *Candida cylindracea* SL1B2, on triacylglycerol degradation. *J Biosci Bioeng* **107**, 401–408.
- Maugard, T., Rejasse, B. & Legoy, M. (2002). Synthesis of water-soluble retinol derivatives by enzymatic method. *Biotechnology Progress* **18**, 424–428.
- Mayordoma, I., Randez-Gil, F. & Prieto, J. (2000). Isolation, purification and characterization of a cold active lipase from *Aspergillus nidulans*. *J Agric Food Chem* **48**, 105-109.

BIBLIOGRAFÍA

- *McGee, H. (1986). On food and cooking – the science and lore of the kitchen. Unwin Hyman Ltd, London, UK.
- Mehlhorn, H. (2011). Progress in Parasitology. H. Mehlhorn (Ed.). Springer, New York, USA.
- Merek, A. & Bednasski, W. (1996). Some factors affecting lipase production by yeast and filamentous fungi. *Biotechnol Lett* **18**, 1155–1160.
- Mhetras, N., Bastawde, K. & Gokhale, D. (2009). Purification and characterization of acidic lipase from *Aspergillus niger* NCIM 1207. *Bioresour Technol* **100**, 1486–1490.
- Michiels, A., Tucker, M., Van Den Ende, W. & Van Laere, A. (2003). Chromosomal walking of flanking regions from short known sequences in GC-Rich plant genomic DNA. *Plant Mol Biol Rep* **21**, 295-302.
- Mignone, F., Gissi, C., Liuni, S., & Pesole, G. (2002). Untranslated regions of mRNAs. *Genome Biology* **3**, 1-10.
- Mitsuda, S., Unemura, T. & Hirohara, H. (1988). Preparation of an optically pure secondary alcohol of synthetic pyrethroids using microbial lipases. *Appl Microbiol Biotechnol* **29**, 310-315.
- Monte, E. (2001). Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology. *Int Microbiol* **4**, 1-4.
- Montero-Barrientos, M., Hermosa, R., Cardoza, R., Gutiérrez, S., Nicolás, C. & Monte, E. (2010). Transgenic expression of the *Trichoderma harzianum hsp70* gene increases *Arabidopsis* resistance to heat and other abiotic stresses. *J Plant Physiol* **167**, 659-665.
- Morán-Diez, E., Hermosa, R., Ambrosino, P., Cardoza, R., Gutiérrez, S., Lorito, M. & Monte, E. (2009). The ThPG1 endopolygalacturonase is required for the *Trichoderma harzianum*–plant beneficial interaction. *Mol Plant Microbe Interact* **22**, 1021–1031.
- Morinaga, N., Maeda, A., Mizuno, T., Bunya, M., Sugihara, S. & Sugihara, A. (2011). Synthesis of fatty acid sterol esters using cholesterol esterase from *Trichoderma* sp. AS59. *Enzyme Microb Technol* **48**, 498-504.
- Mosbah, H., Sayari, H., Mejdoub, H., Dhouib, H. & Gargouri, Y. (2005). Biochemical and molecular characterization of *Staphylococcus xylosus* lipase. *Biochim Biophys Acta* **25**, 282-291.
- Mukherjee, M., Hadar, R., Mukherjee, P. & Horwitz, B. (2003). Homologous expression of a mutated-tubulin gene does not confer benomyl resistance on *Trichoderma virens*. *J Appl Microbiol* **95**, 861-867.
- Mukherjee, M. (2012). *Trichoderma* genes involved in interactions with fungi and plants. In: V. Gupta & M. Ayyachamy (Eds.). Biotechnology of fungal genes. CRC Press, USA. pp. 153-171.
- Muralidhar, R., Chirumamilla, R., Ramachandran, V., Marchant R., & Nigam, P. (2001). Racemic resolution of RS-baclofen using lipase from *Candida cylindracea*. *Meded Rijksuniv Gent Fak Landbouwkd Toegep Biol Wet* **66**, 227–232.
- Nagarajan, J., Nawawi, N. & Ibrahim, A. (2014). *Rhodococcus* UKMP -5M, an endogenous lipase producing actinomycete from Peninsular Malaysia. *Biologia* **69**, 123—132.
- Nagoaka, K. & Yamada, Y. (1969). Studies on *Mucor* lipases. *Agric Biol Chem* **33**, 986-993.
- Nagoaka, K. & Yamada, Y. (1973). Purification of *Mucor* lipases and their properties. *Agric Biol Chem* **37**, 2791-2796.

BIBLIOGRAFÍA

- Naik, S., Basu, A., Saikia, R., Madan, B., Paul, P., Chatterjee, R. & Svendsen, A. (2010). Lipases for use in industrial biocatalysis: specificity of selected structural groups of lipases. *J Mol Catal B: Enzym* **65**, 18-23.
- Nakashima, T., Fukuda, H., Kyotani, S. & Morikawa, H. (1988). Culture conditions for intracellular lipase production by *Rhizopus chinensis* and its immobilization within biomass support particles. *J Ferment Technol* **66**, 441–448.
- Namoodiri, V. & Chattopadhyaya, R. (2000). Purification and biochemical characterization of a novel thermostable lipase from *Aspergillus niger*. *Lipids* **35**, 495–502.
- Nardini, M. & Dijkstra, B. (1999). α - β -Hydrolase fold enzymes: the family keep growing. *Curr Opin Struct Biol* **9**, 732-737.
- Nardini, M., Lang, D., Liebeton, K., Jaeger, K. & Dijkstra, B. (2000). Crystal structure of *Pseudomonas aeruginosa* lipase in the open conformation. The prototype for family I.1 of bacterial lipases. *J Biol Chem* **275**, 31219-31225.
- Nawani, N. & Kaur, J. (2000). Purification, characterization and thermostability of a lipase from a thermophilic *Bacillus* sp. J33. *Mol Cell Biochem* **206**, 91–96.
- Nawrocka, J. & Małolepsza, U. (2013). Diversity in plant systemic resistance induced by *Trichoderma*. *Biol Control* **67**, 149–156.
- Nelson, D. & Cox, M. (2000). *Lehninger Principles of Biochemistry*. Worth Publishers, New York, USA. 1255 pp.
- Ngooi, T., Guo, Z. & Sih, C. (1990). Enantioselective biocatalysis—optically-active intermediates for venturicidin synthesis. *Biocatalysis* **3**, 119-128.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S. & von Heijne, G. (1997). Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng* **10**, 1-6.
- *Nippon-Oil & Fats (1986). Japanese Patent JP-J61149099.
- O' Brien, P. (2006). Catalytic promiscuity and the divergent evolution of DNA repair enzymes. *Chem Rev* **106**, 720-752.
- Odera, M., Takeuchi, K. & Tohe, A. (1986). Molecular cloning of lipase genes from *Alcaligenes denitrificans* and their expression in *Escherichia coli*. *J Ferment Technol* **64**, 363–371.
- Ogbolosingha, A., Essien, E., & Ohiri, R. (2015). Variation of lipase, catalase and dehydrogenase activities during bioremediation of crude oil polluted soil. *J Environ Earth Sci* **5**, 128-141.
- Ohnishi, K., Yoshida, Y. & Sekiguchi, J. (1994a). Lipase production of *Aspergillus oryzae*. *J Ferment Bioeng* **77**, 490–495.
- Ohnishi, K., Yoshida, Y., Toita, J. & Sekiguchi, J. (1994b). Purification and characterization of a novel lipolytic enzyme from *Aspergillus oryzae*. *J Ferment Bioeng* **78**, 413–419.
- Okeke, C. & Okolo, B. (1990). The effect of cultural conditions on the production of lipase by *Acremonium strictum*. *Biotechnol Lett* **12**, 747–750.
- Oliver, S. & Warmington, J. (1989). Transcription. In: A. Rose & J. Harrison (Eds.). *The yeasts* (vol. 3). Academic Press Inc., London, UK. pp. 117-160.
- Ollis, D., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S. & Schrag, J. (1992). The alpha/beta hydrolase fold. *Protein Eng* **5**, 197-211.

BIBLIOGRAFÍA

- Ortiz-Vazquez, E., Granados-Baeza, M. & Riveramuñoz, G. (1993). Effect of culture conditions on lipolytic enzyme production by *Penicillium candidum* in a solid state fermentation. *Biotechnol Adv* **11**, 409–416.
- Osborn, H. & Akoh, C. (2002). Structured lipids – novel fats with medical, nutraceutical, and food applications. *Compr Rev Food Sci Food Safety* **3**, 93-103.
- Ota, Y., Sawamoto, T. & Hasuo, M. (2000). Tributyrin specifically induces a lipase with a preference for the *sn*-2 position of triglyceride of *Geotrichum* sp. FO401B. *Biosci Biotechnol Biochem* **64**, 2497-2499.
- Pabai, F., Kermasha, S. & Morin, A. (1995a). Interesterification of butter fat by partially purified extracellular lipases from *Pseudomonas putida*, *Aspergillus niger* and *Rhizopus oryzae*. *World J Microbiol Biotechnol* **11**, 669-677.
- Pabai, F., Kermasha, S. & Morin, A. (1995b). Lipase from *Pseudomonas fragi* CRDA323: partial purification, characterization and interesterification of butter fat. *Appl Microbiol Biotechnol* **43**, 42-51.
- Päiviö, M. (2014). Lipase and Ω -transaminase catalysis in preparation of alcohol and amine enantiomers. MSci Thesis. University of Turku, Turku, Finland.
- Pandey, A., Benjamin, S., Soccol, C., Nigam, P., Krieger, N. & Soccol, V. (1999). The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnol Appl Biochem* **29**, 119-131.
- Papagianni, M., Avramidis, N. & Filioussis, G. (2007). High efficiency electrotransformation of *Lactococcus lactis* spp. *lactis* cells pre-treated with lithium acetate and dithiothreitol. *BMC Biotechnol* **7**, 15-20.
- Papaparaskevas, D., Christakopoulos, P., Kekos, D. & Macris, B. (1992). Optimizing production of extracellular lipase from *Rhodotorula glutinis*. *Biotechnol Lett* **14**, 397–402.
- Passmore, S., Elble, R. & Tye, B. (1989). A protein involved in minichromosome maintenance in yeast binds a transcriptional enhancer conserved in eukaryotes. *Genes Dev* **3**, 921-935.
- Patel, M., Nagarajan, R. & Kilara, A. (1996). Interactive influence and optimization of reaction parameters in the hydrolysis of olive and coconut triacylglycerols by *Candida cylindracea* and *Rhizopus javanicus* lipases in reverse micellar media. *Appl Biochem Biotechnol* **59**, 109–124.
- Patil, K., Chopda, M. & Mahajan, R. (2011). Lipase biodiversity. *Indian J Sci Technol* **4**, 971-982.
- Pavlik, P., Simon, M., Schuster, T., & Ruis, H. (1993). The glycerol kinase (GUT1) gene of *Saccharomyces cerevisiae*: cloning and characterization. *Curr Genet* **24**, 21-25.
- Pearson, W. & Lipman, D. (1988). Improved tools for biological sequence comparison. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**, 2444-2448.
- Penttilä, M., Nevalainen, H., Rättö, M., Salminen, E. & Knowles, J. (1987). A versatile transformation system for the cellulolytic filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Gene* **61**, 155-162.
- Petersen, M., Fojan, P. & Petersen, S. (2001). How do lipases and esterases work: the electrostatic contribution. *J Biotechnol* **85**, 115–147.
- Petrovic, S., Skrinjar, M., Becarevic, I. & Banka, L. (1990). Effect of various carbon sources on microbial lipases biosynthesis. *Biotechnol Lett* **12**, 299–304.

BIBLIOGRAFÍA

- Pieterse, C., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S. & Van Wees., S. (2009). Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nat Chem Biol* **5**, 308 - 316.
- Pignede, G., Wang, H., Fudalej, F., Gaillardin, C., Seman, M. & Nicaud, J. (2000). Characterization of an extracellular lipase encoded by *LIP2* in *Yarrowia lipolytica*. *J Bacteriol* **182**, 2802–2810.
- Pleiss, J., Fischer, M. & Schmid, R. (1998). Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site. *Chem. Phys. Lipids* **93**, 67-80.
- Pleiss, J., Fischer, M., Peiker, M., Thiele, C. & Schmid, R. (2000). Lipase engineering database. Understanding and exploiting sequence–structure–function relationships. *J Mol Catal B: Enzym* **10**, 491-508.
- Plou, F., Ferrer, M., Nuero, O., Calvo, M., Alcalde, M., Reyes, F. & Ballesteros, A. (1998). Analysis of Tween 80 as an esterase/lipase substrate for lipolytic activity assay. *Biotechnol Tech* **12**, 183–186.
- Porsgaard, T., Xu, X., Gottsche, J. & Mu, H. (2005). Differences in the intramolecular structure of structured oils do not affect pancreatic lipase activity in vitro or the absorption by rats of (n-3) fatty acids. *J Nutr* **135**, 1705–1711.
- Porter, S. & Smith, M. (1986). Homoeo-domain homology in yeast MAT alpha 2 is essential for repressor activity. *Nat* **320**, 766-768.
- Pouderoyen, G., Eggert, T., Jaeger, K. & Dijkstra, B. (2001). The crystal structure of *Bacillus subtilis* lipase: a minimal a/b hydrolase fold enzyme. *J Mol Biol* **309**, 215-226.
- Prasad, M. & Manjunath, K. (2011). Comparative study on biodegradat ion of lipid rich wastewater using lipase produc producing bacterial species. *Indian J Biotechnol* **10**, 121–124.
- Pratt, J., Cooley, J., Purdy, C. & Straus, D. (2000). Lipase activity from strains of *Pasteurella multocida*. *Curr Microbiol* **40**, 306–309.
- Promega (2010). Technical Manual: pGEM-T and p-GEMT easy Vector Systems. 27pp.
- Promega (2011). <http://worldwide.promega.com/products/pm/discontinued-vectors>
- Promega (2013). Applications and reaction conditions for restriction enzymes.
- Quax, W. (2006). Bacterial enzymes. In: M. Dworkin & S. Falkow (Eds.). *The prokaryotes* (vol.1). Springer, New York, USA. pp. 777-796.
- Rahman, Z., Shida, Y., Furukawa, T., Suzuki, Y., Okada, H., Ogasawara, W. & Morikawa, Y. (2009). Application of *Trichoderma reesei* cellulase and xylanase promoters through homologous recombination for enhanced production of extracellular β -glucosidase I. *Biosci Biotechnol Biochem* **73**, 1083-1089.
- Rantakyla, M., Alkio, M. & Paltonen, O. (1996). Stereospecific hydrolysis of 3-(4-methoxyphenyl) glycosidic ester in super-critical carbon dioxide by immobilized lipase. *Biotechnol Lett* **18**, 1089–1094.
- Rapp, P. (1995). Production, regulation and some properties of lipase activity from *Fusarium oxysporum* sp. *vasinfectum*. *Enzyme Microb Technol* **17**, 832–838.
- Ray, A. (2012). Application of lipase in industry. *Asian J Pharm Technol* **2**, 33–37.
- Razafindralambo, H., Blecker, C., Lognay, G., Marlier, M., Wathelet, J. & Severin, M. (1994). Improvement of enzymatic synthesis yields of flavour acetates: the example of isoamyl acetate. *Biotechnol Lett* **16**, 247-250.

BIBLIOGRAFÍA

- Reetz, M. (2002). Lipases as practical biocatalysts. *Curr Op Chem Biol* **6**, 145-150.
- Rehm, S., Trodler, P. & Pleiss, J. (2010). Solvent-induced lid opening in lipases: A molecular dynamics study. *Protein Sci.*, *19*(11), 2122–2130.
- Reino, J., Guerrero, R., Hernandez-Galan, R. & Collado, I. (2008). Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. *Phytochem Rev* **7**, 89–123.
- Reis, P., Holmberg, K., Watzke, H., Leser, M. & Miller, R. (2009). Lipases at interfaces: a review. *Adv Colloid Interface Sci* **147**, 237–250.
- Remmert, M., Biegert, A., Hauser, A., & Soding, J. (2012). HHblits: lightning-fast iterative protein sequence searching by HMM-HMM alignment. *Nat Methods* **9**, 173-175.
- Roberts, R. & Fink, G. (1994). Elements of a single MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae* mediate two developmental programs in the same cell type: mating and invasive growth. *Genes Dev* **8**, 2974-2985.
- Robles-Medina, A., González-Moreno, P., Esteban-Cerdan, L. & Molina-Grima, E. (2009). Biocatalysis: towards ever greener biodiesel production. *Biotechnol Adv* **27**, 398-408.
- Roche (2005). Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments.
- Roche (2007). CDP-Star, ready to use.
- Roche (2008a). PCR DIG Probe Synthesis Kit.
- Roche (2008b). Techniques for hybridization of DIG-labeled probes to a blot. DIG Application Manual for Filter Hybridization, 94-114.
- *Rohm (1992). German Patent DE-4119889.
- Rosgaard, L., Pedersen, S., Langston, J., Akerhielm, D., Cherry, J. & Meyer, A. (2007). Evaluation of minimal *Trichoderma reesei* cellulase mixtures on differently pretreated Barley straw substrates. *Biotechnol Prog* **23**, 1270-1276.
- Rottensteiner, H., Palmieri, L., Hartig, A., Hamilton, B., Ruis, H., Erdmann, R. & Guvritz, A. (2002). The peroxisomal transporter gene *ANT1* is regulated by a deviate response element (ORE): characterization of the signal for fatty acid induction. *Biochem J* **365**, 109-117.
- Ruis, H. & Schüller, C. (1995). Stress signaling in yeast. *BioEssays* **17**, 959–965.
- Ruiz, C., Pastor, F. & Diaz, P. (2005). Isolation of lipid- and polysaccharide-degrading microorganisms from subtropical forest soil, and analysis of lipolytic strain *Bacillus* sp. CR-179. *Lett Appl Microbiol* **40**, 218–227.
- Ruiz-Rueda, C. (2005). Microbial lipases with interest in biotechnology and infectious diseases: isolation, characterization and inhibition by natural substances. PhD Thesis. Universidad de Barcelona, Barcelona, Spain.
- Salis, A., Pinna, M., Monduzzi, M., & Solina, V. (2008). Comparison among immobilised lipases on macroporous polypropylene toward biodiesel synthesis. *J Mol Catal B: Enzym* **54**, 19-26.
- Salleh, A., Musani, R. & Razak, C. (1993). Extra and intracellular lipases from a thermophilic *Rhizopus oryzae* and factors affecting their production. *Can J Microbiol* **39**, 978–981.
- Salleh, A., Rahman, R. & Basri, M. (2006). Lipases: introduction. In: A. Salleh, R. Rahman & M. Basri (Eds.). *New Lipases and Proteases*. Nova Science Publishers, New York, USA. pp1-22.

BIBLIOGRAFÍA

- Sambrook, J., Fritsch, E. & Maniatis, T. (1989). Molecular cloning. A laboratorial manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.
- Samuels, G., Chaverri, P., Farr, D. & McCray, E. (sd). *Trichoderma* online, systematic mycology and microbiology laboratory, ARS, USDA.
- Sandström, A., Engström, K., Nyhlén, J., Kasrayan, A. & Bäckvall, J. (2009). Directed evolution of *Candida antarctica* lipase A using an episomally replicating yeast plasmid. *Protein Eng Des Sel* **22**, 413–420.
- Sangeetha, R., Arulpandi, I. & Geetha, A. (2011). Bacterial lipases as potential industrial biocatalysts: an overview. *Res J Microbiol* **6**, 1-24.
- Santangelo, G. (2006). Glucose signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**, 253-282.
- Sarada, R. & Joseph, R. (1993). Profile of hydrolases acting on major macromolecules of tomato processing waste during anaerobic digestion. *Enzyme Microb Technol* **15**, 339-342.
- Satyanarayan, T. & Johri, B. (1981). Lipolytic activity of thermophilic fungi of paddy straw compost. *Curr Sci* **50**, 680–682.
- Savitha, J., Srividya, S., Jagat, R., Payal, P., Priyanki, S., Rashmi, G. & Shantala, Y. (2007). Identification of potential fungal strain(s) for the production of inducible, extracellular and alkalophilic lipase. *Afr J Biotechnol* **6**, 564-568.
- Savoia, D., Avanzini, C., Allice, T., Callone, E., Guella, G. & Dini, F. (2004). Antimicrobial activity of euplotin C, the sesquiterpene taxonomic marker from the marine ciliate *Euplotes crassus*. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 3828-3833.
- *Saxena, R., Malhotra, B. & Batra, A. (2003a). Commercial importance of some fungal enzymes. In: D. K. Arora (Ed.). Handbook of fungal biotechnology. CRC Press, USA. 600pp.
- Saxena, R., Sheoran, A., Giri, B. & Davidson, W. (2003b). Purification strategies for microbial lipases. *J Microbiol Methods* **52**, 1-18.
- Schmid, R. & Verger, R. (1998). Lipases: interfacial enzymes with attractive applications. *Angew Chem* **37**, 1608-1633.
- Schrag, J. & Cygler, M. (1997). Lipases and the α/β hydrolase fold. *Methods Enzymol* **284**, 85-107.
- Schrag, J., Li, Y., Cygler, M., Lang, D., Burgdorf, T., Hecht, H. & McPherson, A. (1997). The open conformation of a *Pseudomonas* lipase. *Structure* **5**, 187-202.
- Schuepp, C., Kermasha, S., Michalski, M. & Morin, A. (1997). Production, partial purification and characterization of lipases from *Pseudomonas fragi* CRDA 037. *Process Biochem* **32**, 225–232.
- Sears, I., O'Connor, J., Rossanese, O. & Glick, B. (1998). A versatile set of vectors for constitutive and regulated gene expression in *Pichia pastoris*. *Yeast* **14**, 783-790.
- Seidl, V., Seibel, C., Kubicek, C. & Schmoll, M. 2009. Sexual development in the industrial workhorse *Trichoderma reesei*. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 13909–13914
- Shaban, G. & El-Komy, H. (2001). Survival and proliferation of alginate encapsulated *Trichoderma* spp. in Egyptian soil in comparison with allyl alcohol soil fumigation. *Mycopathologia* **151**, 139-146.
- Shah, S., Sharma, S. & Gupta, M. (2004). Biodiesel preparation by lipase catalysed transesterification of *Jatropha* oil. *Energy Fuels* **18**, 154-159.

BIBLIOGRAFÍA

- Shah, J., Raghupathy, V. & Veluthambi, K. (2009). Enhanced sheath blight resistance in transgenic rice expressing an endochitinase gene from *Trichoderma virens*. *Biotechnol Lett* **31**, 239–244.
- Sharma, R., Chisti, Y. & Banerjee, U. (2001). Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnol Adv* **19**, 627–662.
- Sharma, R., Soni, S., Vohra, R., Gupta, L. & Gupta, J. (2002). Purification and characterization of a thermostable alkaline lipase from a new thermophilic *Bacillus* sp. RSJ-1. *Process Biochem* **37**, 1075–1084.
- Sharma, D., Sharma, B. & Shukla, K. (2011). Biotechnological Approach of Microbial Lipases. *Biotechnol* **10**, 23–40.
- Sharma, S. & Kanwar, S. (2013). Properties and stability of celite immobilized lipase of a thermophilic *Bacillus* sp. STL-7. *Int J Biochem* **108**, 173–182.
- Sharon, E., Bar-Eyal, M., Chet, I., Herrera-Estrella, A., Kleifeld, O. & Spiegel, Y. (2001). Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology* **91**, 687–693.
- Shoresh, M., Harman, G. & Mastouri, F. (2010). Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annu Rev Phytopathol* **48**, 21–43.
- Sidhu, P., Sharma, R., Soni, S. & Gupta, J. (1998a). Effect of cultural conditions on extracellular alkaline lipase production from *Bacillus* sp. RS-12 and its characterization. *Ind J Microbiol* **38**, 9–14.
- Sidhu, P., Sharma, R., Soni, S. & Gupta, J. (1998b). Production of extracellular alkaline lipase by a new thermophilic *Bacillus* sp. *Folia Microbiol* **43**, 51–54.
- Sigrist, C., Cerutti, L., Hulo, N., Gattiker, A., Falquet, L., Pagni, M. & Bucher, P. (2002). PROSITE: a documented database using patterns and profiles as motif descriptors. *Brief Bioinform* **3**, 265–274.
- Sigrist, C., De Castro, C., Cerutti, L., Cuče, B., Hulo, N., Bridge, A. & Xenarios, I. (2012). New and continuing developments at PROSITE. *Nucleic Acids Res* **41**, D344–347.
- Simons, J., Adams, H., Cox, R., Dekker, N., Gotz, F., Slotboom, A. & Verheij, H. (1996). The lipase from *Staphylococcus aureus*: expression in *Escherichia coli*, large-scale purification and comparison of substrate specificity to *Staphylococcus hyicus* lipase. *Eur J Biochem* **242**, 760–769.
- Singer, V., Wobbe, C. & Struhl, K. (1998). A wide variety of DNA sequences can functionally replace a yeast TATA element for transcriptional activation. *Genes Dev* **4**, 636–645.
- Singh, A. & Mukhopadhyay, M. (2012). Overview of fungal lipase: a review. *Appl Biochem Biotechnol* **166**, 486–520.
- Singh, L., Maurya, M., Ramana, K. & Alam, S. (1995). Production of biogas from night soil at psychrophilic temperature. *Biores Technol* **53**, 147–149.
- Smale, S. & Baltimore, D. (1989). The 'initiator' as a transcription control element. *Cell* **57**, 103–113.
- Smith, W. (1995). Forest occurrence of *Trichoderma* species: emphasis on potential organochlorine (Xenobiotic) degradation. *Ecotoxicol Environ Saf* **32**, 179–183.
- Snellman, E., Sullivan, E. & Colwell, R. (2002). Purification and properties of the extracellular lipase, LipA, of *Acinetobacter* sp. RAG-1. *FEBS J.* **269**, 5771–5779.

BIBLIOGRAFÍA

- Sommer, P., Bormann, C. & Gotz, F. (1997). Genetic and biochemical characterization of a new extracellular lipase from *Streptomyces cinnamomeus*. *Appl Environ Microbiol* **63**, 3553–3560.
- Sonnhammer, E., von Heijne, G. & Krogh, A. (1998). A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol* **6**, 175-182.
- Stanke, M., Diekhans, M., Baertsch, R. & Haussler, D. (2008). Using native and syntenically mapped cDNA alignments to improve de novo gene finding. *Bioinformatics* **24**, 637-644.
- Stergiopoulos, I. & de Wit, P. (2009). Fungal effector proteins. *Annu Rev Phytopathol* **47**, 233–263.
- Strakowska, J., Błaszczuk, L. & Chełkowski, J. (2014). The significance of cellulolytic enzymes produced by *Trichoderma* in opportunistic lifestyle of this fungus. *J Basic Microbiol* **54**, S2-S13.
- Sugihara, A., Senoo, T., Enoki, A., Shimada, Y., Nagao, T. & Tominaga, Y. (1995). Purification and characterization of a lipase from *Pichia burtonii*. *Appl Microbiol Biotechnol* **43**, 277–81.
- Sugiura, M. & Isobe, M. (1975). Studies on the lipase of *Chromobacterium viscosum*. IV. Substrate specificity of a low molecular weight lipase. *Chem Pharm Bull* **23**, 1226-1230.
- Surinenaite, B., Bendikiene, V., Juodka, B., Bachmatova, I. & Marcinke-Vichiene, L. (2002). Characterization and physicochemical properties of a lipase from *Pseudomonas mendocina* 3121-1. *Biotechnol Appl Biochem* **36**, 47–55.
- Svendsen, A. (2000). Lipase protein engineering. *Biochim Biophys Acta* **1543**, 223-238.
- Sztajer, H. & Maliszewska, I. (1989). The effect of culture conditions on lipolytic productivity of *Penicillium citrinum*. *Biotechnol Lett* **11**, 895–898.
- Sztajer, H. & Zboinska, E. (1982). Microbial lipases in biotechnology. *Acta Biotechnol* **8**, 169-175.
- Sztajer, H., Lunsdorf, H., Erdman, H., Menge, U. & Schmid, R. (1992). Purification and properties of *Penicillium simplicissimum*. *Biochim Biophys Acta* **1124**, 253–61.
- Sztajer, H., Maliszewska, I. & Wiczorek, J. (1988). Production of exogenous lipase by bacteria, fungi and actinomycetes. *Enzyme Microb Technol* **10**, 492–497.
- Sztajer, H., Menge, U. & Schmid, R. (1993). Purification and properties of a lipase from *Penicillium expansum*. *Biochim Biophys Acta* **1168**, 181–189.
- Tahoun, M., E-Kady, I. & Wahba, A. (1985). Production of lipases from microorganisms. *Microbiol Lett* **28**, 133–139.
- Takahashi, S., Ueda, M., Atomi, H., Beer, H., Borncheuer, U., Schmid, R. & Tanka, A. (1998). Extracellular production of active *Rhizopus oryzae* lipase by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Ferment Bioeng* **86**, 164-168.
- Takamoto, T., Shirasaka, H., Uyama, H., & Kobayash, S. (2001). Lipase-catalyzed hydrolytic degradation of polyurethane in organic solvent. *Chem Lett* **6**, 492–493.
- Tanaka, K., Yoshida, K., Sasaki, C. & Osano, Y. (2002). Practical asymmetric synthesis of the herbicide (S)-indanofan via lipase-catalyzed kinetic resolution of a diol and stereoselective acid-catalyzed hydrolysis of a chiral epoxide. *J Org Chem* **67**, 3131-3133.
- Tang, S., Shaw, J., Sun, K., Sung, G., Chang, T., Lin, C. & Lee, G. (2001). Recombinant expression and characterization of the *Candida rugosa* lip4 lipase in *Pichia pastoris*: Comparison of glycosylation, activity and stability. *Arch Biochem Biophys* **387**, 93–98.

BIBLIOGRAFÍA

- Taylor, S., Wakem, M., Dijkman, G., Alsarraj, M. & Nguyen, M. (2010). A practical approach to RT-qPCR—Publishing data that conform to the MIQE guidelines. *Methods* **50**, S1-S5.
- Thakur, S. (2012). Lipases, its sources, properties and applications:a review. *Int J Sci Eng Res* **3**, 1-29.
- Thapa, B., Kumar, K. & Ghimire, A. (2012). A review on bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in soil. *J Sci Eng Technol* **8**, 164-170.
- Toida, J., Arikawa, Y., Kondou, K., Fukuzawa, M. & Sekiguchi, J. (1998). Purification and characterization of triacylglycerol lipase from *A. oryzae*. *Biosci Biotechnol Biochem* **62**, 759-763.
- Toyo-Jozo. (1988). Japanese Patent JP-J63137687.
- Trombetta, D., Castelli, F., Sarpietro, M., Venuti, V., Cristani, M., Daniele, C. & Bisignano, G. (2005). Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 2474-2478.
- Tsai, F. & Sigler, P. (2000). Structural basis of preinitiation complex assembly on human Pol II promoters. *EMBO J* **19**, 25–36.
- Ukaegbu-Obi, K. & Mbakwem-Aniebo, C. (2014). Bioremediation potentials of bacteria isolated from rhizosphere of some plants of oil contaminated soil of Niger delta. *J Appl Environ Microbiol* **2**, 194-197.
- Undurraga, D., Markovits, A. & Erazo, S. (2001). Cocoa butter equivalent through enzymic interesterification of palm oil mid fraction. *Process Biochem* **36**, 933-939.
- UniProt (2015) <http://www.uniprot.org/help/carbohydr>.
- Uppenberg, J., Hansen, M., Patkar, S. & Jones, T. (1994). The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. *Structure* **2**, 293-308.
- Vadehra, D. & Harmon, L. (1967). Isolation and purification of staphylococcal lipase. *Appl Microbiol* **15**, 292-295.
- Vakhlu, J. & Kour, A. (2006). Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. *Electron J Biotechnol* **9**, 1–17.
- van der Velden, A., & Thomas, A. (1999). The role of the 5' untranslated region of an mRNA in translation regulation during development. *Int J Biochem Cell Biol* **31**, 87–106.
- van Kampen, M., Rosenstein, R., Götz, F. & Egmond, M. (2001). Cloning, purification and characterization of *Staphylococcus warneri* lipase 2. *Biochim Biophys Acta* **1544**, 229–241.
- Van Oort, M., Deveer, A., Dijkman, R., Tjeenk, M., Verheij, H., De Haas, G. & Goetz, F. (1989). Purification and substrate specificity of *Staphylococcus hyicus* lipase. *Biochem* **28**, 9278-9285.
- van Pouderoyen, G., Eggert, T., Jaeger, K. & Dijkstra, B. (2001). The crystal structure of *Bacillus subtilis* lipase: a minimal alpha/beta hydrolase fold enzyme. *J Mol Biol* **309**, 215-226.
- Vargas, W., Djonovic, S., Sukno, S. & Kenerley, C. (2008). Dimerization controls the activity of fungal elicitors that trigger systemic resistance in plants. *J Biol Chem* **283**, 19804–19815.
- Vath, G., Earhart, C., Monie, D., Iandolo, J., Schlievert, P. & Ohlendorf, D. (1999). The crystal structure of exfoliative toxin B: a superantigen with enzymatic activity. *Biochem* **38**, 10239–10246.
- Verger, R. (1997). Interfacial activation of lipases: facts and artifacts. *Trends Biotechnol* **15**, 32-38.

BIBLIOGRAFÍA

- Verger, R. & Haas, G. (1973). Enzyme reactions in a membrane model. 1. A new technique to study enzyme reactions in monolayers. *Chem Phys Lipids* **10**, 127-136.
- Verhé, R., Echim, C., De Greyt, W. & Stevens, C. (2011). Production of biodiesel via chemical catalytic conversion. In: R. Luque, J. Campelo & J. Clark (Eds.). Handbook of biofuels production: processes and technologies. Woodhead Publishing Series on Energy (online). pp97-133.
- Verma, M. L., Azmi, W. & Kanwar, S. (2008). Microbial lipases: at the interface of aqueous and non-aqueous media. A review. *Acta Microbiol Immunol Hung* **55**, 265-293.
- Verma, N., Thakur, S. & Bhatt, A. (2012). Microbial lipases: Industrial applications and properties (a review). *Int Res J Biol Sci* **1**, 88-92.
- Vieira-Pires, R. & Morais-Cabral, J. (2010). 3^{10} helices in channels and other membrane proteins. *J Gen Physiol* **136**, 585–592.
- Villeneuve, P., Barouh, N., Barea, B., Piombo, G., Figueroa-Espinoza, M., Turon, F. & Lago, R. (2007). Chemoenzymatic synthesis of structured triacylglycerols with conjugated linoleic acids (CLA) in central position. *Food Chem* **100**, 1443–1452.
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E., Marra, R., Woo, S. & Lorito, M. (2008a). *Trichoderma* – plant – pathogen interactions. *Soil Biol Biochem* **40**, 1-10.
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E., Marra, R., Barbetti, M., Li, H. & Lorito, M. (2008b). A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. *Physiol Mol Plant Pathol* **72**, 80-86.
- Viterbo, A. & Chet, I. (2006). *TasHyd1*, a new hydrophobin gene from the biocontrol agent *Trichoderma asperellum*, is involved in plant root colonization. *Mol Plant Pathol* **7**, 249–258.
- Viterbo, A., Harel, M. & Chet, I. (2004). Isolation of two aspartyl proteases from *Trichoderma asperellum* expressed during colonization of cucumber roots. *Microbiol Lett* **238**, 151–158.
- Viterbo, A., Ramot, O., Chernin, L. & Chet, I. (2002). Significance of lytic enzymes from *Trichoderma* spp. in the biocontrol of fungal plant pathogens. *Antonie van Leeuwenhoek* **81**, 549–556.
- Wakelin, N., & Forster, C. (1997). An investigation into microbial removal of fats, oils and greases. *Bioresour Technol* **59**, 37–43.
- Walsh, C. (2006). Posttranslational modification of proteins: expanding nature's inventory. Roberts and Co. Publishers. Greenwood Village, USA. 576 pp
- Walters, D. & Heil, M. (2007). Costs and trade-offs associated with induced resistance. *Physiol Mol Plant P* **71**, 3–17.
- Walters, D., Ratsep, J. & Havis, N. (2013). Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. *J Exp Bot* **64**, 1263–1280.
- Wang, H., Shao, J., Wei, Y., Zhang, J. & Qi, W. (2011). A novel low-temperature alkaline lipase from *Acinetobacter johnsonii* LP28 suitable for detergent formulation. *Food Technol. Biotechnol* **49**, 96-102.
- Waterham, H., Digan, M., Koutz, P., Lair, S. & Cregg, J. (1997). Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and characterization of its promoter. *Gene* **186**, 37-44.

BIBLIOGRAFÍA

- Weber, N., Klein, E. & Mukerjee, K. (1999). Long chain acyl thioesters prepared by solvent free thioesterification and transesterification catalyzed by microbial lipases. *Appl Microbiol Biotechnol* **51**, 401-404.
- Weis, L. & Reinberg, D. (1992). Transcription by RNA polymerase II: initiator-directed formation of transcription-competent complexes. *FASEB J* **6**, 3300-3309.
- Weis, L. & Reinberg, D. (1997). Accurate positioning of RNA polymerase II on a natural TATA-less promoter is independent of TATA-binding-protein-associated factors and initiator-binding proteins. *Mol Cell Biol* **17**, 2973-2984.
- Widmann, M., Juhl, P. & Pleiss, J. (2010). Structural classification by the Lipase Engineering Database: a case study of *Candida antarctica* Lipase A. *BMC Genomics* **11**, 123-130.
- Willis, W., Lencki, R. & Marangoni, A. (1998). Lipid modification strategies in the production of nutritionally functional fats and oils. *Crit Rev Food Sci Nutr* **38**, 639-674.
- Wiseman, A. (1995). Introduction to principles. In: A. Wiseman (Ed.). Handbook of enzyme biotechnology. T.J. Press Ltd, Cornwall, UK. pp3-8.
- Wong, H. & Schotz, J. (2002). The lipase gene family. *J Lipid Res* **43**, 993-999.
- Wu, S. & Letchworth III, G. (2004). High efficiency transformation by electroporation of *Pichia pastoris* pretreated with LiAc and DTT. *Biotechniques* **36**, 152-154.
- Xie, B., Qin, Q., Shi, M., Chen, L., Shu, Y., Luo, Y. & Song, X. (2014). Comparative genomics provide insights into evolution of *Trichoderma* nutrition style. *Genome Biol Evol* **6**, 379-390.
- Xu, Y., Liu, H., Du, W., Sun, Y., Ou, X. & Liu, D. (2009). Integrated production of biodiesel and 1,3-propanediol with lipase catalysed transesterification and fermentation. *Biotechnol Lett* **39**, 1335-1341.
- Yamamoto, A., Mizukami, Y. & Sakurai, H. (2005). Identification of a novel class of target genes and a novel type of binding sequence of heat shock transcription factor in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **280**, 11911-11919.
- Yokozei, K., Tanaka, T., Yamanaka, S., Takinami, T., Hirose, Y., Sonomoto, K. & Fukui, S. (1982). Ester exchange of triglycerides by entrapped lipase in organic solvent. *Enzyme Eng* **6**, 151-152.
- Yoshinan, K., Aoki, M., Ontsuka, T., Nakayama, N., Itezono, Y., Mutoh, M. & Yokuse, K. (1994). *Antibiotics* **47**, 1376-1384.
- Young, E., Dombek, K., Tachibana, C. & Ideker, T. (2003). Multiple pathways are co-regulated by the protein kinase Snf1 and the transcription factors Adr1 and Cat8. *J Biol Chem* **278**, 26146-26158.
- Zalacain, I., Zapelena, M., Astiasaran, I. & Bello, J. (1995). Dry fermented sausages elaborated with lipase from traditional formulations. *Meat Sci* **40**, 55-61.
- Zarevúcka, M. & Wimmer, Z. (2008). Plant products for pharmacology: application of enzymes in their transformations. *Int J Mol Sci* **9**, 2447-2473.
- Zarevúcka, M., Rejzek, M., Wimmer, Z., Streinz, L. & Demnerová, K. (1993). Enzyme mediated hydrolysis of acetates. *Biotechnol Lett* **15**, 1139-1144.
- Zhang, Y., Dub, M., McLean, D. & Kates, M. (2003). Biodiesel production from waste cooking oil: 1. process design and technological assessment. *BioresourTechnol* **89**, 1-16.

BIBLIOGRAFÍA

Zhou, X. & O'Shea, E. (2011). Integrated Approaches Reveal Determinants of Genome-wide Binding and Function of the Transcription Factor Pho4. *Mol Cell* **42**, 826-836.

NOTA:

Las referencias señaladas con un asterisco (*) se dan incompletas, en muchos casos, por no haber sido posible consultarlas directamente, sino a través de otros autores. Sin embargo, se ha considerado de interés mencionarlas por ser las referencias originales.