

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

CARACTERIZACIÓN DE UNA TRIACILGLICEROL LIPASA DEL HONGO Trichoderma harzianum

Tesis que presenta:

RICARDO BARAHONA CORTÉS

En opción al título de:

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México

2020

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de Ricardo Barahona Cortés titulado "Caracterización de una triacilglicerol lipasa del hongo *Trichoderma harzianum*", fue fue realizado en la Unidad de Biotecnología, Laboratorio de Biotecnología Microbiana del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. realizado en la Unidad de Biotecnología, Laboratorio de Biotecnología Microbiana del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección de la Dra. Blondy Beatriz Canto Canché y el Dr. Lorenzo Felipe Sánchez Teyer, dentro de la opción de Maestría, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente.

Dra. Cecilia Hernández Zepeda

Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, 19 de octubre 2020.

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se regirán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma: Bicuydo Baruhona Co Asi

Nombre: Ricardo Barahona Cortés

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, bajo la dirección del Dra. Blondy Beatriz Canto Canché y el Dr. Felipe Sánchez Teyer.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por todo su apoyo.

Agradezco a CONACYT por haberme otorgado la beca 886122, la cual forma parte del proyecto "FOSEC-SEP 220957".

Al CICY por brindarme las instalaciones para llevar a cabo los experimentos para desarrollar mi tesis, al laboratorio #7 de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, al laboratorio de Biotecnología Microbiana de la Unidad de Biotecnología.

DEDICATORIAS

Dedico esta tesis a mis padres quienes siempre me apoyaron, a mis hermanos, a Laura y a Emily.

ÍNDICE

| INT | ROD | DUCCIÓN | 1 |
|------|------|-------------------------------------|----|
| CA | PÍTU | LO I | 2 |
| 1.1. | Lipa | asas | 2 |
| 1.2. | Fue | entes de lipasas | 3 |
| 1.3. | Rea | acciones catalizadas por lipasas | 4 |
| 1.3 | .1. | Reacción de hidrólisis | 5 |
| 1.3 | .2. | Reacción de síntesis | 6 |
| 1.4. | Esti | ructura y mecanismo catalítico | 6 |
| 1.4 | .1. | El pliegue α/β hidrolasa | 6 |
| 1.4 | .2. | La triada catalítica | 7 |
| 1.4 | .3. | El pozo oxianión | 8 |
| 1.4 | .4. | La Lid | 8 |
| 1.4 | .5. | Mecanismo catalítico | 9 |
| 1.5. | Sele | ectividad de las lipasas1 | 10 |
| 1.5 | .1. | Quimioselectividad | 10 |
| 1.5 | .2. | Regioselectividad1 | 11 |
| 1.5 | .3. | Enantioselectividad 1 | 11 |

| 1.6. | Pro | Producción de lipasas recombinantes | | | | | |
|------|--------------|---|------|--|--|--|--|
| 1.7. | Tric | choderma sp. como fuente de lipasas | . 12 | | | | |
| CA | APÍTU | ILO II | . 18 | | | | |
| 2.1. | Ana | álisis <i>in silico</i> de la lipasa 77338 | . 18 | | | | |
| 2.2. | Сер | oas y condiciones de cultivo | . 19 | | | | |
| 2.2 | 2.1. | Para el sistema Saccharomyces cerevisiae (S. cerevisiae) | . 19 | | | | |
| 2.2 | 2.2. | Para el sistema Pichia pastoris (P. pastoris) | . 19 | | | | |
| 2.2 | 2.3. | Para el sistema Escherichia coli (E. coli) | . 19 | | | | |
| 2.3. | Ais | lamiento y clonación del gen 77338 | . 20 | | | | |
| 2.3 | 3.1. | Para expresión en S. cerevisiae | . 20 | | | | |
| 2.3 | 3.2. | Para expresión en <i>E. coli</i> | . 20 | | | | |
| 2.3 | 3.3. | Para expresión en <i>P. pastoris</i> | . 22 | | | | |
| 2.4. | Exp | presión y purificación de la lipasa | . 23 | | | | |
| 2.4 | 4.1. | Expresión heteróloga en S. cerevisiae | . 23 | | | | |
| 2.4 | 1.2 . | Expresión heteróloga en <i>E. coli</i> | . 24 | | | | |
| 2.4 | 1.3. | Expresión heteróloga en <i>P. pastoris</i> | . 24 | | | | |
| 2.5. | Cua | antificación de proteínas | . 25 | | | | |
| 2.6. | Det | erminación de actividad lipolítica en placa | . 25 | | | | |
| 2.7. | Det | erminación de actividad lipolítica por espectrofotometría | . 25 | | | | |
| C/ | APÍTU | ILO III | . 27 | | | | |

| 3. | .1. | Aná | alisis in silico de la lipasa 77338 | 27 |
|----|------|------|---|----|
| 3. | .2. | Aisl | amiento y clonación del gen 77338 | 30 |
| | 3.2. | 1. | Sistema GATEWAY para expresión en S. cerevisiae | 30 |
| | 3.2. | 2. | Sistema pLATE para expresión en <i>E. coli</i> | 32 |
| | 3.2. | 3. | Sistema pPICZB para expresión en <i>P. pastoris</i> | 37 |
| 3. | .3. | Ехр | presión y purificación de la lipasa 77338 | 42 |
| | 3.3. | 1. | Expresión en S. cerevisiae | 42 |
| | 3.3. | 2. | Expresión en <i>E. coli</i> | 44 |
| | 3.3. | 3. | Expresión en <i>P. pastoris</i> | 46 |
| 3. | .4. | Cua | antificación de proteínas | 49 |
| 3. | .5. | Ens | sayo de actividad en placas | 51 |
| | 3.5. | 1. | En S. cerevisiae | 51 |
| | 3.5. | 2. | En <i>E. coli</i> | 52 |
| | 3.5. | 3. | En P. pastoris | 54 |
| 3. | .6. | Ens | sayo de actividad por espectrofotometría | 54 |
| | CAF | PÍTU | LO IV | 62 |
| | CAF | PÍTU | LO V | 66 |
| | BIBI | LIOC | SRAFÍA | 67 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| Figura 1 | 7 |
|-----------|----|
| Figura 2 | 8 |
| Figura 3 | 11 |
| Figura 4 | 13 |
| Figura 5 | 16 |
| Figura 6 | 30 |
| Figura 7 | 31 |
| Figura 8 | 33 |
| Figura 9 | 34 |
| Figura 10 | 35 |
| Figura 11 | 36 |
| Figura 12 | 37 |
| Figura 13 | 39 |
| Figura 14 | 41 |
| Figura 15 | 42 |
| Figura 16 | 43 |
| Figura 17 | 45 |
| Figura 18 | 46 |
| Figura 19 | 48 |

| Figura 20 | 48 |
|-----------|----|
| Figura 21 | 49 |
| Figura 22 | 51 |
| Figura 23 | 52 |
| Figura 24 | 53 |
| Figura 25 | 53 |
| Figura 26 | 54 |
| Figura 27 | 55 |
| Figura 28 | 56 |
| Figura 29 | 57 |
| Figura 30 | 58 |
| Figura 31 | 59 |
| Figura 32 | 61 |
| Figura 33 | 61 |
| Figura 34 | 62 |
| Figura 35 | 63 |
| Figura 36 | 64 |
| Figura 37 | 67 |
| Figura 38 | 68 |
| Figura 39 | 68 |

| Figura 40 | 70 |
|-----------|----|
| Figura 41 | 72 |

ÍNDICE DE CUADROS

| Cuadro 1 | 23 |
|----------|----|
| Cuadro 2 | 25 |
| Cuadro 3 | 32 |
| Cuadro 4 | 59 |
| Cuadro 5 | 64 |

ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico

ARN: ácido ribonucleico

ADNc: ADN complementario

LipC: lipasa con etiqueta de 6xHis en extremo carboxilo terminal

Pb: pares de bases

pH: potencial de hidrógeno

pLATE31-77338: vector recombinante que tiene clonada la lipasa 77338 para expresión heteróloga en *Escherichia coli*

pYESDEST52-LipC: vector recombinante que tiene clonada la lipasa 77338 para expresión heteróloga en *Saccharomyces cerevisiae*

pPICZB-M: vector recombinante que tiene clonada la versión madura de la lipasa 77338 para expresión heteróloga en *Pichia pastoris*

pPICZB-I: vector recombinante que tiene clonada la versión inmadura de la lipasa 77338 para expresión heteróloga en *Pichia pastoris*

RESUMEN

Las lipasas son enzimas ampliamente usadas a nivel industrial, jugando un papel primordial en la producción de alimentos, biodiesel, nutracéuticos y detergentes, con aplicaciones también en biorremediación, cosméticos, cuero y papel. En condiciones acuosas, estas enzimas catalizan la hidrólisis de enlaces éster en triacilgliceroles de cadena larga (>10 carbonos) para producir glicerol y ácidos grasos libres (FFAs). Por el contrario, bajo condiciones no acuosas, las lipasas llevan a cabo reacciones de síntesis (esterificación, transesterificación, aminólisis, alcohólisis), lo que las hace atractivas para explotación industrial. Las lipasas son enzimas ubicuas entre organismos y las más utilizadas a nivel industrial provienen de microorganismos. Las lipasas de hongos están recibiendo mucha atención debido a sus propiedades, como alta estabilidad térmica y alcalina, quimio, regio y enantio-selectividad. El hongo Trichoderma harzianum es un ascomiceto que ha sido reportado por diversos autores por ser un hongo que prolifera en ambientes con un alto contenido de grasas y aceites. En un trabajo previo, el análisis in silico del genoma de este hongo identificó siete presuntas lipasas. En el presente trabajo se realizó la expresión heteróloga y caracterización bioquímica de una de dichas lipasas. Para ello, se comparó la expresión heteróloga de la lipasa en una plataforma de expresión eucariótico (levadura) y un sistema procariota (E. coli) con el objetivo de seleccionar la plataforma más adecuada para la expresión heteróloga para producción futura de proteínas en nuestro grupo.

ABSTRACT

Lipases are enzymes used in industry, playing a key role in the production of food, biodiesel, nutraceuticals and detergents, and used also in bioremediation, cosmetics, leather and paper. Under aqueous conditions, these enzymes catalyze the hydrolysis of ester bonds on long chain triacylglycerols (> 10 carbons) to release glycerol and free fatty acids (FFA). On the other hand, under non-aqueous conditions, lipases carry out reactions of systhesis (esterification, transesterification, aminolysis, alcohololysis), which make them attractive for industrial exploitation. Lipases are ubiquitous enzymes in living organisms, and most of industrial lipases come from microorganisms. Fungal lipases are having much attention due to properties of their enzymes, such as high stability, chemo, regio and enantio-selectivity. The fungus Trichoderma harzianum is an ascomycete reported by various authors as growing in environments with high content of fats and oils. In a previous research, in silico analysis of T. harzianum genome identified seven putative lipases. In the present the heterologous expression of one of these lipases and its biochemical characterization were carried out. To achieve this goal, the expression of this lipase was performed both in a eukaryotic expression platform (yeast) as well as in prokaryotic system (E. coli) to compare efficiency of correct expression to select the most suitable expression platform for further works in our research group.

INTRODUCCIÓN

Las enzimas son importantes en distintas industrias, por ejemplo: medicina, agricultura, química y alimentos. Entre estas enzimas, las lipasas presentan un gran potencial de aplicaciones biotecnológicas, debido a las diversas reacciones que catalizan, además de la amplia variedad de sustratos que aceptan (Hasan et al., 2009). Dentro de las aplicaciones de las lipasas se encuentran el procesamiento de grasas y aceites, procesamiento de alimentos, cuero, textiles, detergentes, producción de biodiesel, fabricación de papel, síntesis de químicos, producción de fármacos, cosméticos, etc. La gran versatilidad de estas enzimas se debe a que aceptan un amplio rango de sustratos (ésteres alifáticos, alicíclicos, bicíclicos, aromáticos, tioésteres, aminas) mientras que mantienen alta regioquimio-y enantioselectividad (Andualema y Gessesse, 2012). Las lipasas son enzimas ubicuas, ampliamente distribuidas en la naturaleza, encontrándose en animales, plantas, bacterias y hongos. Sin embargo, las lipasas de origen fúngico son las más importantes industrialmente (Nwuche y Ogbonna 2011; Singh y Mukhopadhyay, 2011). Los hongos lipolíticos pueden encontrarse en distintos hábitats, incluyendo suelos contaminados con aceites, desechos domésticos con residuos aceitosos, desechos lácteos, desechos industriales etc. Esta habilidad de los hongos para subsistir y proliferar en estos hábitats da una idea de su gran poder de adaptación, que en gran parte se debe a la capacidad de producir y secretar enzimas lipolíticas que le permiten obtener su fuente de energía a partir de estos materiales. Además, la habilidad de las lipasas para llevar a cabo transformaciones químicas muy específicas (biotransformación) las ha hecho muy populares en la industria (Hasan et al., 2005; Gopinath et al., 2013;). Por otra parte, el rápido desarrollo de la biología molecular y la disponibilidad de métodos de alto rendimiento para detección lipolítica más confiables y rápidos, han mejorado la utilidad de las lipasas para síntesis orgánica. Por ejemplo, los sistemas de expresión heteróloga son cada vez más utilizados para sobreproducir lipasas recombinantes y mediante la ingeniería de proteínas (también llamado evolución molecular dirigida) han mejorado las propiedades de las enzimas, generando nuevas variantes de lipasas (y otras enzimas) con mejor actividad catalítica y estabilidad que se ajustan mejor a las necesidades industriales (Cen et al., 2019).

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

1.1. Lipasas

La mayoría de las enzimas (> 75 %) utilizadas actualmente en los procesos industriales son hidrolasas, entre estas, las lipasas son enzimas utilizadas para modificar lípidos (Borrelli y Trono, 2015). Las lipasas son enzimas que catalizan tanto reacciones de degradación (hidrólisis) como de síntesis (esterificación) y la mayoría son solubles en agua; actúan sobre sustratos insolubles y catalizan la hidrólisis de triglicéridos de cadena larga. Estas enzimas son serin-hidrolasas definidas como triacilglicerol acilhidrolasas (E.C. 3.1.1.3) y se diferencian de las esterasas por la naturaleza de sus sustratos. De hecho, el primer criterio que fue utilizado para distinguir entre estos dos tipos de enzimas (la activación de las lipasas en presencia de una interface) se encontró inadecuado para la clasificación de tales enzimas ya que algunas lipasas no requieren de la interface (Casas et al., 2012). Ejemplos de lipasas que no exhiben activación interfacial son Lip4 de Candida rugosa y Candida antartica. Por lo tanto, las lipasas fueron definidas como enzimas que hidrolizan ésteres carboxílicos de acilgliceroles de cadena larga (>10 carbonos), mientras las esterasas hidrolizan ésteres carboxílicos de acilgliceroles de cadena corta (< 10 carbonos) (Jaeger et al., 1999).

Las lipasas son enzimas muy versátiles en cuanto a uso y función, cumpliendo funciones importantes a nivel biológico e importantes aplicaciones a nivel industrial. Las lipasas representan las terceras enzimas más comercializadas, después de las proteasas y las carbohidrasas, y su producción se ha incrementado; de tal forma que ahora representan más de una quinta parte del mercado global de enzimas (https://www.marketwatch.com).

Las enzimas comercialmente disponibles son obtenidas de animales, plantas y microorganismos. La mayor parte de las enzimas industriales (más del 50 %) es, sin embargo, de origen microbiano, ya que, comparadas con las de origen animal o vegetal, son más estables y cubren una gran variedad de actividades catalíticas. Además, los microorganismos pueden crecer en medios baratos, alcanzando grandes rendimientos, y representan una fuente siempre disponible, ya que su crecimiento no se ve afectado por fluctuaciones estacionales (Borrelli y Trono, 2015; Prakash *et al.*, 2013).

Por mucho tiempo: las lipasas usadas comercialmente fueron de origen animal y se obtenían del páncreas de reses, ovejas y cerdos. Desafortunadamente, las lipasas extraídas de páncreas animal rara vez son suficientemente puras para ser utilizadas en la industria alimentaria. Por ejemplo, la lipasa de páncreas de cerdo está contaminada con trazas de tripsina, lo que generan un sabor amargo. Otras impurezas incluyen virus y hormonas animales (Casas et al., 2012). Por lo tanto, debido a la facilidad de producción y abundancia, las lipasas más estudiadas y actualmente usadas industrialmente son obtenidas de fuentes microbianas. Diversos estudios se han llevado a cabo para la identificación de microorganismos productores de lipasas con la finalidad de hallar nuevas fuentes de lipasas con características físico-químicas únicas. Por ejemplo, se han aislado lipasas de Pseudomonas spp. que son alcalófilas y termófilas (Jave et al., 2018). Choo et al., (1998) aislaron una cepa psicrotrófica de Pseudomonas sp. (cepa B11-1) del suelo de Alaska, la cual produce una lipasa adaptada a bajas temperaturas. En otro trabajo, se aisló una lipasa termoestable del hongo Geobacillus zalihae aislado de un efluente del efluente de un molino de aceite de palma. El hongo fue cultivado en medio líquido enriquecido con aceite de oliva como fuente de carbono (Shirazi et al., 1998). Por otra parte, las lipasas de origen fúngico han recibido mucha atención en las industrias debido a su estabilidad bajo condiciones químicas y físicas variadas. Adicionalmente, las enzimas fúngicas extracelulares pueden ser purificadas fácilmente, lo que reduce significantemente el costo y hace que esta fuente sea preferida sobre las bacterias (Singh y Mukhopadhyay, 2012).

1.2. Fuentes de lipasas

Se sabe que las lipasas son producidas por todos los organismos. Sin embargo, debido a su facilidad de producción y abundancia, la mayor parte de las lipasas más estudiadas y usadas industrialmente son obtenidas de fuentes microbianas. Las primeras lipasas microbianas fueron aisladas de *Serratia marcescens, Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas fluorescens* (Aravindan *et al.*, 2006). Comparadas con las lipasas bacterianas, las lipasas de hongos y levaduras (generalmente reconocidas como seguras) son ampliamente aceptadas y usadas en varias industrias, incluyendo procesamiento de alimentos.

Los microorganismos, siendo ubicuos en su distribución, son altamente exitosos en sobrevivir en un amplio rango de condiciones ambientales debido a su gran plasticidad y

versatilidad fisiológica. Debido a que poseen sistemas enzimáticos eficientes, los microbios prosperan bien incluso en ambientes inhóspitos. Para adaptarse a ambientes extremos y poder explotar los diferentes nichos, la habilidad de producir enzimas extracelulares es de gran valor para la supervivencia de los microorganismos. La secreción extracelular ha sido bien estudiada en hongos, principalmente zigomicetos, hiphomicetos, ascomicetos y levaduras (Shirazi et al., 1998). Los hongos están involucrados en la degradación de materiales o compuestos indeseables convirtiéndolos en productos menos dañinos, tolerables o útiles. Los materiales indeseables incluyen desechos de aguas residuales de zonas urbanas e industriales y desechos animales, vegetales y agrícolas, derrames de aceites y desechos lácteos. El papel de los hongos en el proceso de biorremediación en varios ambientes ha sido bien documentado (Gopinath et al., 2005).

Hay una conciencia creciente respecto a los efectos potencialmente dañinos del derrame mundial de aceites y grasas en aguas salinas y ríos. Los aceites son liberados tanto a nivel de producción como por los usuarios domésticos. Para mantener la limpieza del ambiente, estos aceites deben ser degradados usando tecnología eco-amigable. La degradación microbiana es una de las opciones más importantes para aminorar la contaminación por aceites del medio ambiente. Los hongos productores de lipasas pueden ser encontrados en distintos hábitats que incluyen suelos contaminados con aceites, desechos alrededor de fábricas procesadoras de aceites, puntos de desechos domésticos, residuos lácteos (Khan *et al.*, 2017), entre otros.

1.3. Reacciones catalizadas por lipasas

Las lipasas están involucradas en la hidrólisis de grasas y aceites para producir glicerol y ácidos grasos libres (FAAs). Además, catalizan la hidrólisis y transesterificación de otros ésteres, así como la síntesis de éstos y poseen propiedades enantio, regio y quimioselectivas. Bajo condiciones naturales, tal como en la presencia de agua, las lipasas actúan en una interfaz orgánica-acuosa (activación interfacial) para catalizar la hidrólisis de enlaces ésteres carboxílicos y liberar ácidos grasos y alcoholes orgánicos (Figura 1). Ya que el equilibrio entre la reacción delantera y reversa es controlado por la actividad del agua en la mezcla de reacción, bajo condiciones limitantes de agua, ocurre la reacción reversa, es decir, la esterificación, al igual que diferentes reacciones de transesterificación de acuerdo a las condiciones del medio de reacción (Casas et al., 2012).

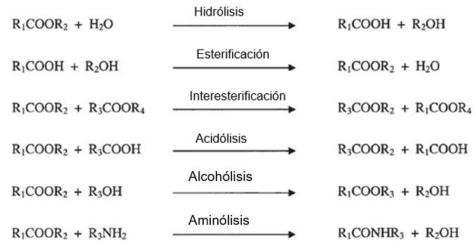


Figura 1. Reacciones catalizadas por lipasas. Las lipasas catalizan la hidrólisis de enlaces éster carboxilos en presencia de agua. En ausencia de agua, la reacción de síntesis prevalece.

Las lipasas tienen tres diferentes clases de selectividades hacia sus sustratos. Estas incluyen: (1) Quimio-especificidad. Las lipasas muestran especificidad de ácido graso (FA) y especificidad por clase de lípido. Su especificidad por ácido graso está relacionada a la liberación de FAAs con una longitud o grado de insaturación dentro de rangos bien definidos. Para la especificidad de clase de lípido, las lipasas catalizan no sólo la hidrólisis de triacilglicerol (TAG), sino también de diacilglicerol (DAG) y monoacilglicerol (MAG), (2) Regio-especificidad. Las lipasas pueden ser divididas en lipasas no específicas que catalizan la hidrólisis completa de TAGs en glicerol y FFAs de una forma aleatoria, generando DAGs y MAGs como intermediarios, y las lipasas específicas 1-3, que hidrolizan TAGs sólo en las posiciones *sn*-1 y *sn*-3, generando FAAs, 1,2-DAGs o 2,3-DAGs, y MAGs, (3) Enantio-especificidad. Hay lipasas que son capaces de distinguir entre enantiómeros en una mezcla racémica (Borrelli y Trono, 2015).

1.3.1. Reacción de hidrólisis

Las lipasas catalizan la hidrólisis del enlace éster carboxilo de los tri-, di-, y monoglicéridos liberando ácidos grasos libres y glicerol (Figura 1). No obstante, las lipasas presentan actividad sobre una amplia variedad de sustratos. En la mayoría de los casos, la reacción es llevada a cabo en la interfaz de un sistema de reacción bifásico. Este sistema bifásico

resulta de la presencia de una fase orgánica inmiscible, que contiene al sustrato hidrofóbico, en agua (Borreli & Tronos, 2015; Walker, 2012).

1.3.2. Reacción de síntesis

Bajo condiciones termodinámicamente favorables (baja actividad del agua), las lipasas también catalizan una gran variedad de reacciones de síntesis que pueden ser clasificadas en dos principales tipos de reacciones: la esterificación y la transesterificación. Como se muestra en la Figura 1, la esterificación es la reacción donde un ácido graso es unido a un alcohol mediante un enlace covalente, produciendo un éster y liberando una molécula de agua. El término transesterificación se refiere al intercambio de grupos entre un éster y un alcohol (alcohólisis), entre un éster y un ácido (acidólisis), entre un éster y una amina (aminólsis) y entre dos ésteres (interesterificación) (Borreli y Tronos, 2015; Casas *et al.*, 2012; Houde *et al.*, 2004).

1.4. Estructura y mecanismo catalítico

Las primeras estructuras de lipasas fueron obtenidas de *Rhizomocur miehei* y la lipasa pancreática humana. Actualmente, cientos de secuencias de lipasas están enlistadas en las bases de datos y alrededor de cien estructuras tridimensionales de lipasas están disponibles en la Base de Datos de Proteínas (http://www.rcsb.org/pdb/home).

A pesar de diferencias en tamaño y bajo porcentaje de identidad entre las secuencias primarias, las lipasas muestran patrones de plegamiento estructural muy similares. Esta estructura conforma un pliegue α/β hidrolasa, el cual es común en varias enzimas hidrolasas, tales como esterasas, proteasas, deshalogenasas, epóxido hidrolasas y peroxidasas (Figura 2).

1.4.1. El pliegue α/β hidrolasa

Tal como se muestra en la Figura 2, el pliegue canónico α/β hidrolasa está caracterizado por la presencia de una lámina central plegada en forma β que contiene ocho cadenas β paralelas (β 1- β 8), con excepción de la cadena β 2, que es antiparalela respecto a las otras. Las cadenas β 3 a β 8 están conectadas por hélices α , que se empaquetan en los dos lados de la cadena β central (Borreli yTronos, 2015; Gupta *et al.*, 2014; Jaeger *et al.*, 1999).

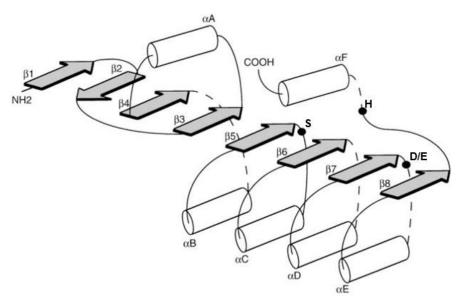


Figura 2. Plegamiento canónico de las α/β hidrolasas. Las α hélices están representadas con cilindros y las láminas β están representadas con las flechas sombreadas. La posición de la triada catalítica está mostrada por los círculos negros; el residuo nucleofílico (S) se encuentra localizado después de la lámina β 5, el residuo negativo (D/E) después de la lámina β 7 y el residuo de histidina (H) luego de la lámina β 8 (basado en Jaeger *et al.*, 1999).

1.4.2. La triada catalítica

El sitio activo de las α/β hidrolasas consiste en una triada catalítica altamente conservada: un residuo nucleofílico (serina), un residuo ácido catalítico (ácido aspártico o ácido glutámico) y una histidina, que actúa como residuo básico catalítico (Arpigni y Jaeger, 1999).

En el pliegue α/β hidrolasa, la serina catalítica está localizada después de la lámina $\beta 5$ y antes de la hélice αC , el aspartato o glutamato se encuentran después de la lámina $\beta 7$ y antes de la hélice αE y la histidina está localizada en un lazo después de la lámina $\beta 8$. El sitio activo de las lipasas también contiene un sitio de unión hidrofóbico para ácidos grasos que acomoda la cadena acilo del enlace éster que será hidrolizado (Casas *et al.*, 2012; Walker, 2012).

1.4.3. El pozo oxianión

Otra característica fundamental de las lipasas es el pozo oxianión, que es la "bolsa" que promueve la estabilización del intermediario cargado negativamente generado durante la hidrólisis del enlace éster. El intermediario tetraédrico formado durante la reacción es estabilizado por dos aminoácidos que forman el pozo de oxianión. Estos aminoácidos estabilizan el intermediario por medio de puentes de hidrógeno entre el protón del grupo amida y el oxígeno del grupo carbonilo del sustrato (Pleiss *et al.*, 2000).

El pozo de oxianión consiste en dos residuos, uno de los cuales siempre le sigue al residuo nucleofílico, mientras el otro tiene una posición variable (Casas *et al.*, 2012). El primer residuo del pozo oxianión está localizado en la parte amino terminal de las lipasas, en la vuelta entre la lámina $\beta 3$ y la hélice αA . Dependiendo de las secuencias alrededor de este primer residuo, Pleiss y colaboradores (2000) identificaron dos tipos de pozos oxianión: GX y GGGX. El segundo residuo es representado como X2 en la secuencia consenso G-X1-S-X2-G, localizado después de la lámina $\beta 5$ en el "codo" nucleofílico estructuralmente conservado en todas las lipasas.

El tipo de pozo oxianión juega un papel importante en la especificidad de las lipasas hacia sus sustratos. De hecho, las lipasas con el tipo GX usualmente hidrolizan sustratos de longitud de cadena carbonada larga y media, mientras el tipo GGGX es encontrado en lipasas específicas de cadena corta (Hasan *et al.*, 2006).

1.4.4. La Lid

La mayoría de las lipasas se caracterizan por tener en su estructura un dominio móvil, conocido como "lid", que puede consistir en una hélice única, de dos hélices o una región de lazo. La resolución de las primeras estructuras tridimensionales de lipasas de R. miehei y la lipasa pancreática humana permitieron la identificación de la lid sobre el sitio activo. El lid está compuesto de una o más α hélices, unidas a la estructura principal de la enzima por una estructura flexible (Khan $et\ al.$, 2017). Este es un elemento móvil que cubre el sitio activo en presencia de una interface lípido-agua, generando un cambio conformacional que permite el acceso del sustrato al sitio activo. Si la lid está en su conformación cerrada, el sitio activo es protegido del ambiente y es inaccesible a los sustratos, por tanto, la lipasa es

inactiva. En la conformación abierta, el sustrato puede acceder al sitio activo de la lipasa y ser convertido en producto. De acuerdo con la actividad catalítica muy baja de las lipasas en medios acuosos, se puede asumir que la conformación cerrada prevalece bajo estas condiciones. Por el contrario, en un medio más hidrofóbico (orgánico), o en la presencia de una interface orgánica-acuosa, la forma abierta es la estructura predominante (Hasan *et al.*, 2009).

La lid es una estructura anfipática, en la conformación cerrada, su lado hidrofílico enfrenta al solvente, mientras el lado hidrofóbico está dirigido hacia la bolsa catalítica. Conforme la enzima cambia a la conformación abierta, la cara hidrofóbica se expone y contribuye a la unión del sustrato. Por lo tanto, no solo la naturaleza anfipática del lid sino también su secuencia específica de aminoácidos son necesarios para la actividad y especificidad de las lipasas (Hasan *et al.*, 2009).

1.4.5. Mecanismo catalítico

La catálisis de las lipasas sigue el mecanismo clásico de las serinas hidrolasas. La hidrólisis del sustrato empieza con la unión del lípido y la serina catalítica ataca al átomo de carbono del grupo carbonilo del enlace éster susceptible (Figura 3a). Esto genera un intermediario tetraédrico que es caracterizado por la formación de una carga negativa en el átomo de oxígeno del grupo carbonilo, y la unión de cuatro átomos al átomo de carbono del carbonilo reordenados como un tetraedro (Figura 3b) (Borrelli y Tronos, 2015).

El intermediario es estabilizado por dos enlaces de hidrógeno entre el átomo de oxígeno del carbonilo cargado negativamente y los grupos NH- de la cadena principal de los dos residuos aminoácidos del pozo oxianión. La nucleofilicidad del residuo de serina es aumentada por la histidina catalítica, a la que un protón del grupo hidroxilo de la serina es transferido. Esta transferencia es facilitada por el residuo ácido catalítico, que orienta el anillo de imidazol de la histidina en tal forma que neutraliza la carga que se genera. Subsecuentemente, el protón es donado al átomo de oxígeno del enlace éster susceptible, que es cortado, con la liberación consecuente del producto alcohol, mientras que la cadena acilo es esterificada en la serina nucleofílica (Figura 3c). La siguiente etapa es la

desacilación, en la que una molécula de agua hidroliza el enlace covalente, liberando el producto acilo y la regeneración de la enzima (Figura 3d).

Figura 3. Mecanismo de la reacción de hidrólisis de enlaces éster catalizado por lipasas. Aspartato e histidina son mostrados en azul y verde, respectivamente; la serina, el sustrato y el agua se muestran en negro, los residuos del pozo oxianión se muestran en magenta. (a) Ataque nucleofílico del hidroxilo de la serina al carbono carbonilo del enlace éster susceptible; (b) Intermediario tetraédrico; (c) Intermediario acil-enzima, se libera alcohol y ataque nucleofílico por una molécula de agua; (d) enzima libre y producto acilo liberado (Borrelli y Tronos, 2015).

1.5. Selectividad de las lipasas

La selectividad de las lipasas está relacionada a su preferencia por sustratos específicos para llevar a cabo reacciones dadas. Se pueden distinguir tres tipos de selectividad: quimio-selectividad, regioselectividad y enantioselectividad.

1.5.1. Quimioselectividad

La quimioselectividad está asociada a la preferencia por un tipo de sustrato dado, es decir, triglicéridos, diglicéridos o monoglicéridos. Por ejemplo, una monoacilglicerol lipasa aislada de eritrocitos humanos hidroliza solo monoacilglicerol (Sommadelpero *et al.*, 2005). Esta selectividad también se refiere a la preferencia de las lipasas por ácidos grasos de cadena larga, media o corta y al grado de insaturación y substituciones potenciales del sustrato. La preferencia de una lipasa por grupos acilo de diferentes tamaños está influenciado directamente por la forma de su sitio de unión, y de la naturaleza de los aminoácidos que componen este sitio.

1.5.2. Regioselectividad

La regioselectividad es definida como el ataque preferencial de las lipasas hacia algún enlace éster en los triglicéridos, es decir; enlace éster primario o secundario. La regioselectividad puede ser sn-1 (3) o sn-2 (Figura 4). La mayoría de las lipasas microbianas hidrolizan las posiciones sn-1 (3) de los triglicéridos y solo unas pocas son capaces de hidrolizar la posición sn-2 (Borrelli y Tronos, 2015; Lotti y Alberghina, 2007).

1.5.3. Enantioselectividad

Una molécula quiral es una molécula con un centro asimétrico, que puede adoptar dos formas enantioméricas, R y S. Los enantiómeros R y S son imágenes especulares no superponibles entre sí, cuyas propiedades químicas, tal como punto de fusión, solubilidad y reactividad son muy similares. Sin embargo, en cuanto a función biológica son muy diferentes. La enantioselectividad se refiere a la preferencia de las lipasas por un enantiómero particular de una molécula quiral, en una reacción química que implica una mezcla racémica.

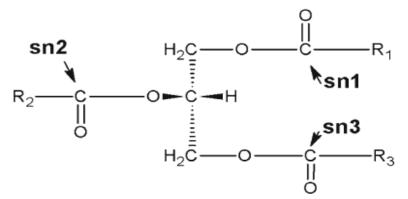


Figura 4. Representación de los enlaces éster hidrolizables por las lipasas en una molécula de triacilglicerol (Walker, 2012).

1.6. Producción de lipasas recombinantes

Los grandes avances de la tecnología del ADN recombinante han contribuido enormemente en la producción de compuestos valiosos para el ser humano; entre los cuales destacan las vacunas, los fármacos, alimentos, antibióticos y enzimas.

La secreción de proteínas recombinantes generalmente es dirigida por un péptido señal de secreción en el extremo amino terminal. Los péptidos señal pueden diferir ampliamente en su eficiencia para secretar proteínas recombinantes, por tanto, es necesario identificar múltiples señales de secreción disponibles y encontrar la señal de secreción óptima para una proteína (Akatsuka et al., 1995; Liang et al., 2013). El péptido señal y los segmentos transmembranales están involucrados en el transporte de proteínas desde su sitio de síntesis, mayormente el citoplasma, a otros destinos ya sea dentro o fuera de la célula (Masomian et al., 2017). Los péptidos señal de diferentes proteínas u organismos tienen secuencias distintas, sin embargo, todas consisten de tres regiones distintivas; aminoácidos básicos en la región amino terminal, seguido por una región hidrofóbica en medio y aminoácidos polares en la región carboxilo terminal (Masomian et al., 2017).

1.7. Trichoderma sp. como fuente de lipasas

Gopinath y colaboradores (2005) aislaron 34 especies fúngicas de suelos contaminados con derrames de aceites en las principales ciudades de India y encontraron que *Trichoderma viride* mostró gran actividad lipolítica. Ogugua y Ogbonna (2011) aislaron veinte especies de hongos de un efluente de una fábrica de aceite en Nsukka y encontraron que el género *Aspergillus* spp, es el más común, sin embargo, los mayores productores de lipasas fueron hongos del género *Trichoderma*. La primera caracterización de actividad lipolítica de *Trichoderma harzianum* la realizaron Ulker y colaboradores en 2011, y encontraron que la enzima presenta una actividad óptima a 40°C y pH 8.5 (Ülker *et al.*, 2011).

En el estudio realizado por Canseco *et al.* (2018), a partir de desechos de plantaciones de banano, se identificaron hongos con actividad lipolítica. Dentro de los hongos aislados, *Trichoderma harzianum* (cepa B13-1) fue el que presentó mayor actividad lipolítica extracelular en medio PDA adicionado con 1% de aceite de oliva y 0.001% de rodamina B. Adicionalmente realizaron un estudio del genoma completo en búsqueda de genes codificantes para esta lipasa y mediante un análisis bioinformático y descripciones funcionales en diferentes bases de datos se estudiaron siete posibles genes candidatos de lipasas (Canseco-Pérez *et al.*, 2018). En el presente trabajo se decidió trabajar con el gen 77338, el cual codifica para una lipasa clase 3, que presuntamente pertenece a una familia de lipasas verdaderas de este hongo.

La región codificante del gen 77338 en marco de lectura abierto fue clonado en nuestro grupo por Canseco-Pérez M. mediante tecnología Gateway en el vector de expresión pYES-DEST52 (no publicado), para transformar *S. cerevisiae* (cepa INVSc1).

En el presente trabajo se planteó llevar a cabo la expresión *in vitro* de la proteína 77338 así como su caracterización bioquímica determinando la preferencia por sustratos y los valores de pH y temperatura óptimos de esta lipasa.Paralelamente, se planteó comparar la expresión heteróloga de la lipasa usando dos plataformas eucariotas (*S. cerevisiae* y *P.* pastoris) y una plataforma procariota (*E. coli*).

JUSTIFICACIÓN

La necesidad de lipasas novedosas con características que se puedan adaptar mejor a los requerimientos industriales ha disparado la búsqueda de nuevas fuentes microbianas. Aunado a esta necesidad, la amenaza de la contaminación del medio ambiente con desechos de grasas y aceites provenientes de complejos industriales y domésticos es una problemática que debe solucionarse con tecnología eco-amigable. Los hongos son una excelente fuente de lipasas, gracias a su capacidad de adaptación en diferentes tipos de hábitats y su habilidad de biosintetizar enzimas extracelulares. Estas características apoyan la elección de los hongos lipolíticos como fuente de búsqueda de lipasas. *Trichoderma harzianum* ha sido repetidamente reportado entre los hongos con mayor actividad lipolítica y la predicción bioinformática indica que varias de sus lipasas son triacilglicerol lipasas que actúan sobre sustratos de cadena larga. Es por ello que en este trabajo se realizará la expresión y caracterización de una lipasa identificada *in silico* en *T. harzianum* usando tres plataformas de expresión diferentes; *S. cerevisiae, P. pastoris y E. coli.*

HIPÓTESIS

La proteína 77338 está anotada en el genoma del ascomiceto *Trichoderma harzianum* como triacilglicerol lipasa, por lo que es posible que sea una lipasa verdadera y por lo tanto actúe sobre triacilgliceroles de cadena larga.

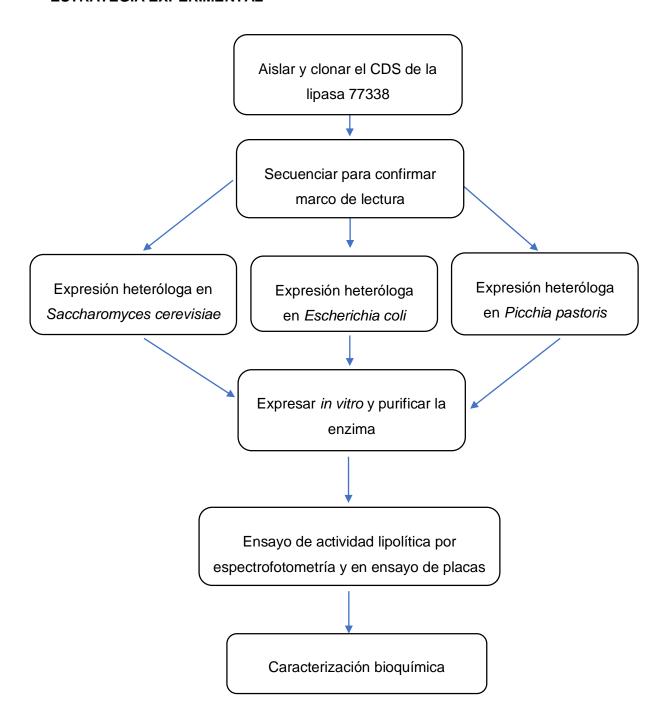
OBJETIVO GENERAL

Expresar de manera heteróloga la triacilglicerol lipasa 77338 del hongo *Trichoderma harzianum*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Clonar la secuencia codificante de la lipasa 77338 para los sistemas *Sacharomyces* cerevisiae, Escherichia coli y Pichia pastoris.
- Expresar de manera recombinante la lipasa 77338 del hongo *Trichoderma harzianum*.
- Determinar la preferencia por sustratos.
- Determinar las condiciones de pH y temperatura óptimos para la máxima actividad catalítica.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Análisis in silico de la lipasa 77338

Se utilizaron diferentes programas bioinformáticos para inferir dominios funcionales, presencia de péptido señal de secreción, puentes disulfuro y sitios de glicosilación. La proteína 77338 fue identificada *in silico* en el genoma de *T. harzianum* depositado en la base de datos del portal JGI (https://genome.jgi.doe.gov/Triha1/Triha1.home.html) para confirmar su marco de lectura y composición de aminoácidos. El gen 77338 se encuentra ubicado en el scaffold_3:1045025-1046239 y se infiere que no posee intrones.

La estructura tridimensional de la proteína fue modelada con el software I-TASSER (https://zhanglab.ccmb med.umich.edu/I-TASSER/) y SWISS-MODEL (https://swissmodel.expasy.org/) usando la secuencia de la proteína 77338 descargada del portal JGI del genoma de *T. harzianum*.

Para la búsqueda de dominios funcionales; la secuencia se sometió a la base de datos Pfam (https://pfam.xfam.org/), ampliamente usada para buscar dominios funcionales ya que reúne una enorme colección de familias de proteínas representadas por dominios funcionales.

Se usó el software SignalP-5.0 (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/) para buscar señales de secreción (péptido señal) en la proteína. Con ayuda del programa Expasy (https://www.expasy.org/) se infirió estabilidad de la proteína, su punto isoeléctrico (IP) y composición de aminoácidos y otros parámetros físicoquímicos.

Para deducir si la proteína posee sitios de glicosilación, se usó el programa Glycosylation Predictor (https://comp.chem.nottingham.ac.uk/glyco/) y para infligir posibles puentes disulfuro dentro de la estructura secundaria se usó el programa DiANNA 1.1 Web Server (http://clavius.bc.edu/~clotelab/DiANNA/).

2.2. Cepas y condiciones de cultivo

2.2.1. Para el sistema Saccharomyces cerevisiae (S. cerevisiae)

Para la expresión heteróloga de la lipasa 77338 en el sistema *S. cerevisiae* se utilizó la cepa INVSc1, la cual posee el siguiente genotipo: *MATa his3D1 leu2 trp1-289 ura3-52 MAT his3D1 leu2 trp1-289 ura3-52*, que hace a esta cepa auxotrófica para histidina, leucina, triptófano y uracilo. Se usó como medio de mantenimiento medio YPD (peso/volumen: 10% extracto de levadura, 20% peptona y 20% dextrosa) y como medio de selección de transformantes el medio SC-U (peso/volumen: 0.67% de base de nitrógeno para levadura, 2% de glucosa, 0.01% de leucina, triptófano y 0.005% de histidina) cultivando a 30°C. Como medio de inducción para la expresión de la lipasa 77338 se usó medio SC-U Gal+, el cual contiene los mismos componentes que el medio SC-U excepto que en vez de 2% de glucosa contiene 2% de galactosa (Cuadro1).

2.2.2. Para el sistema Pichia pastoris (P. pastoris)

Se usó la levadura metilotrófica *Pichia pastoris* como segundo sistema de expresión eucariota. Este sistema puede utilizar metanol como única fuente de carbono además de que la producción de la proteína de interés es inducida por este alcohol. Se usó la cepa GS115 (genotipo: *His4*) para la producción de la lipasa 77338. Esta cepa se mantiene en medio YPD (peso/volumen: 10% de extracto de levadura, 20% de peptona y 20% de dextrosa) y las células transformantes se seleccionan en YPD con 100µg/µl de zeocina, cultivando a 30°C (Cuadro 1). Para la expresión de la lipasa se usó medio BMGY/BMMY (10% extracto levadura, 20% peptona, 100Mm de fosfato de potasio pH 6 y 1% glicerol/metanol). Las fermentaciones fueron realizadas a 30°C y 220 rpm.

2.2.3. Para el sistema Escherichia coli (E. coli)

Como sistema de expresión procariota se utilizó la cepa Rosetta-gamiB de la bacteria *E. coli* (Cam^R, Kan^R, Tet^R). El medio de mantenimiento usado fue medio LB (15.5 g/L) con kanamicina (15 µg/ml), cloranfenicol (34 µg/ml) y para seleccionar las transformadas se agregó ampicilina (100 µg/ml); los cultivos se crecieron a 37°C. La cepa *E. coli* Top10 se usó para manipulación y propagación de los vectores y se cultivó en medio LB (15.5 g/L) con ampicilina (100 µg/ml) para escrutinio de las transformantes (Cuadro1).

| Cuadro 1. Cepas, | cuadro 1. Cepas, vectores y medios de cultivos usados en este estudio. | | | | | | |
|------------------|--|------------|--------------------|-------------------|--|--|--|
| Sistema de | Сера | Vector de | Tipo de promotor | Medios de cultivo | | | |
| expresión | | expresión | | | | | |
| S. cerevisiae | INVSc1 | pYESDEST52 | Inducible con | Medio SC-U, | | | |
| | | | galactosa | YPD | | | |
| P. pastoris | GS115 | pPICZB | Inducible con | YPDS, YPD, MM | | | |
| | | | metanol | | | | |
| E. coli | Rosetta-gami B | pLATE31 | Inducible con IPTG | LB | | | |

2.3. Aislamiento y clonación del gen 77338

2.3.1. Para expresión en *S. cerevisiae*

El diseño para la clonación y expresión por Gateway fue realizado por el Dr. Miguel Canseco. La clonación del CDS de la proteína 77338 se realizó mediante clonación Gateway, usando el vector de expresión pYESDEST52 (Invitrogen). Se usaron los cebadores con adaptadores para Gateway 77338HisCF y 77338HisCR (Cuadro 2) para que la etiqueta 6xHis quedase en el extremo carboxilo de la proteína (LipC) para no interferir con el péptido señal de secreción. La etiqueta 6xHis permite la purificación empleando cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC, por sus siglas en inglés). Esta construcción fue clonada en el vector de expresión Gateway pYESDEST52; dando como resultado el plásmido pYESDEST52-LipC. La expresión del gen 77338 está bajo la dirección del promotor Gal 1 inducible con galactosa. El vector se mandó a secuenciar a LANBAMA, IPICYT; para descartar errores en el ORF de la lipasa 77338. Una vez analizada la secuencia y confirmado el ORF, el plásmido pYESDEST52-LipC se utilizó para transformar la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (cepa INVSc1) usando el paquete comercial S. c. EasyCompTMTransformation Kit (INVITROGEN) y siguiendo las indicaciones del fabricante.

2.3.2. Para expresión en *E. coli*

A partir de ADNc de *Trichoderma harzianum* (100 ng/µl) se amplificó por PCR la región codificante del gen 77338; usando los cebadores liptrichFW y liptrichRV (Cuadro 2). Se

utilizó la polimerasa de alta fidelidad Herculase II Fusion Enzyme (Agilent Technologies) por 30 ciclos bajo las siguientes condiciones de reacción: 95°C por 2 minutos; 95°C por 20 segundos; 60°C por 20 segundos; 72°C por 45 segundos; 72°C por 3 minutos. Después se visualizó el amplicón por electroforesis en gel de agarosa al 0.8% y se corroboró que el tamaño del fragmento amplificado sea el correspondiente del gen 77338 de *T. harzianum* (1215 pb).

Posteriormente el producto de PCR se purificó del gel con el paquete comercial QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN). El producto purificado se reamplificó por PCR con los cebadores con adaptadores aLICator FwpL31 y RvpL31 (Cuadro 2) necesarios para clonar en pLATE31. Estos cebadores están diseñados para que la proteína quede en marco de lectura con una etiqueta de 6xHis en el extremo C terminal de la lipasa. La expresión del gen está regulada por el promotor T7 inducible con IPTG (Isopropil-tio-galactopiranósido).

Se analizó el amplicón por electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % para verificar que el tamaño del producto esperado sea el correcto (~1250 pb). Cabe mencionar que los adaptadores agregan 35 pb al amplicón. Luego, se clonó el producto con los adaptadores en el vector pLATE31 (Thermoscientific) de acuerdo con las indicaciones en el Manual aLICator Ligation Independent Cloning and Expression Kit 3, #K1261 (Thermoscientific). La clonación dio como resultado el plásmido pLATE31-77338. Este constructo se usó para transformar por choque térmico células competentes de *E. coli* Top10. Las transformantes se seleccionaron en placas de Petri con medio LBA (15.5 g/L) con ampicilina (100 µg/ml).

Las colonias que crecieron (seis en total) se inocularon respectivamente en 3 ml de LB con ampicilina y se incubaron a 37°C con agitación toda la noche y se realizó una miniprep con el paquete comercial QIAprep Spin Miniprep Kit (250) para obtener el plásmido para análisis posteriores. Para verificar la clonación del gen de la lipasa, se realizó una prueba de PCR con los cebadores específicos para la lipasa usando como templado los plásmidos extraídos. Para confirmar que el gen se clonó en orientación correcta y en marco de lectura, el plásmido pLATE31-77338 se envió al servicio de secuenciación LANBAMA (IPICYT) y los resultados de secuenciación se analizaron con el programa Geneious y manualmente. Una vez confirmado el marco de lectura del gen 77338 en el plásmido pLATE31-77338, se procedió a transformar por choque térmico células competentes de *E. coli* cepa RosettagamiB. Después se realizó una PCR en colonia para confirmar los transformantes.

2.3.3. Para expresión en *P. pastoris*

El sistema *Pichia pastoris* ha sido utilizado para expresión de una gran diversidad de proteínas, entre las que se encuentran las lipasas (Jungo *et al.*, 2006; Jiao *et al.*, 2018), además de que posee la maquinaria enzimática para realizar modificaciones postraduccionales y puede crecer en metanol como única fuente de carbono. Para el aislamiento del gen 77338 se utilizó PCR punto final, para lo cual se diseñaron dos pares de cebadores: FLip-I, RLip-I, FLip-M y RLip-M (Cuadro 2). Un par para amplificar la enzima madura (sin péptido señal) y otro para la forma inmadura (con péptido señal). Se utilizaron 50 ng de ADNc del hongo *T. harzianum* como templado (0.5 µM de cada cebador) y 10 µl de Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix 2X (ThermoScientific) en un volumen de reacción de 20 µl (aforado con agua libre de nucleasas). Las condiciones de reacción fueron las siguientes: 1 ciclo a 98°C por 10 segundos, 30 ciclos a 98°C por 1 segundo, 68°C por 5 segundos, 72°C por 20 segundos y 1 ciclo a 72°C por 1 minuto y 4°C por tiempo indeterminado. Posteriormente, se analizó el producto en una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% y el amplicón fue purificado usando el paquete comercial QlAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN).

| Cuadro 2. Cebadores utilizados en este estudio. | | | | |
|---|--|---------|--------------------|--|
| Cebador | Secuencia | ТМ | Tamaño amplicón | |
| 77338HiscF | 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAG GCTTCACCATGGGGTGGACATTTCTGGG-3' | 57°C | 1212pb | |
| 77338HiscR | 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGC TGGGTGCAACTCTTCGTCATGAGGCGCATACG-3' | 60°C | | |
| FwpL31 | 5'AGAAGGAGATATAACTATGGGGTG GACATTTCTGGGCCGCTTCG-3' | 63.8 °C | 1218pb | |
| RvpL31 | 5'GTGGTGGTGATGGTGATGGCCCA ACTCTTCGTCATGAGGCGCATACGGA-3' | 65.2 °C | | |
| FLip-l | 5'- AAA TAT GCG GCC GCT ATA AAA TGG GGT GGA CAT TTC TGG GCC GCT -3' | 70°C | 1215pb | |
| RLip-I | 5'- GCT CTA GAG CCA ACT CTT CGT CAT GAG GCG CAT ACG GAG GCC -3' | 70°C | .2.000 | |
| FLip-M | 5'TAT GCGGCCGC TATATGCTGTCTTTGTCGAGGCC'3 | 67°C | 1149pb | |
| RLip-M | 5'GC TCTAGA GCCAACTCTTCGTCATGAGGCGCA'3 | 67°C | ΠΑΟΡΟ | |

2.4. Expresión y purificación de la lipasa

2.4.1. Expresión heteróloga en S. cerevisiae

Para inducir la expresión de la proteína 77338, se inocularon 50 ml de medio SC-U (peso/volumen: 0.67% de base de nitrógeno de levadura, dextrosa 2%, leucina y triptófano 0.01%, histidina 0.005%) con una colonia de *S. cerevisiae* transformada con el constructo pYESDEST5-LipC y se dejó incubando por 24 horas a 30°C y 250 rpm. Para colectar las células, se centrifugó el cultivo a 3200 x g por 10 minutos a 20°C y la pastilla se resuspendió en 5 ml de medio SC-U, y se usó para inocular 500 ml de medio de inducción (SC-U con 2% de galactosa en lugar de dextrosa); se incubó a 30°C y 250 rpm y se tomaron alícuotas de 50 ml a las 24, 48, 72 y 96 horas. Los tiempos de colecta fueron basados en Morka *et al.*, (2014) quienes expresaron la lipasa CAL-A de *Candida antartica* en *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 con resultados positivos.

En cada caso la muestra se centrifugó a 3200 x g por 10 minutos a 4°C, se colectaron de manera independiente el medio de cultivo y la pastilla celular. El medio de cultivo se almacenó a -20°C hasta su uso. La pastilla de células se disolvió en 1ml de amortiguador de lisis (8% de sacarosa, EDTA a 1mM, Tris-HCI 100mM, PMSF a 1mM) y se agregó 1ml de perlas de vidrio acidificadas y se aplicó vórtex por 5 minutos. Se recuperó el líquido de las perlas por pipeteo, evitando tomar las perlas de vidrio. Posteriormente, se centrifugó el lisado de células a 3200 x g por 30 minutos a 4°C. Se separaron las fracciones soluble e insoluble en tubos distintos. Las diferentes fracciones fueron analizadas mediante electroforesis disociante en gel de poliacrilamida al 12 % (SDS-PAGE, por sus siglas en inglés). El gel se resolvió a 100 voltios durante 3 horas, posteriormente fue teñido con 20 ml de una solución de azul de Coomassie, agitando a 30 rpm durante toda la noche. Se retiró el azul de Coomassie y el exceso fue lavado con una solución de desteñido (10 % de metanol y 25 % de ácido acético).

Para la purificación de la lipasa 77338, se utilizaron columnas empaquetadas con la resina Ni-NTA (Ni-NTA Agarose 25 ml Cat. No. 30210, QIAGEN), la cual es una metodología basada en la técnica cromatográfica IMAC (del inglés Immobilized Metal Affinity Chromatography). Se agregó 1 ml de la fracción soluble a la columna y se dejó incubar 5 minutos para permitir la unión de la proteína a la resina y hasta que la resina Ni-NTA

sedimentase. Después se recuperó el filtrado en un tubo Eppendorf de 1.5 ml limpio. Se eluyó la proteína agregando 1 ml de amortiguador de elución (TrisHCl a 100mM y NaCl a 350mM) con concentraciones crecientes de imidazol a 10mM, 50mM, 100mM y 250mM. El imidazol compite por los sitios de la esfera de coordinación de los iones Ni provocando el desplazamiento de las proteínas recombinantes. Los eluatos fueron almacenados a -20°C para su posterior análisis. Cada elución fue recuperada en tubos Eppendorf independientes para su posterior análisis por SDS-PAGE.

2.4.2. Expresión heteróloga en *E. coli*

Se recuperó una única colonia de *Rosetta-gami* transformada con el plásmido pLATE31-77338. La colonia fue inoculada en 500 ml de medio LB (15.5 g/l) suplementado con kanamicina (15 μg/ml), cloranfenicol (35 μg/ml) y ampicilina (100 μg/ml). Se cultivó a 37°C y 180 rpm hasta llegar a OD₆₀₀ de 0.5-0.8. Posteriormente se indujo con 1 mM de IPTG y se incubó a tres temperaturas diferentes: 16, 25 y 37°C. Se tomaron alícuotas de 50 ml a las 4, 8, 16 y 24 horas de cultivo. Para cada muestra, se colectaron las células por centrifugación a 3200 x g por 10 minutos a 4°C y se recuperaron el medio de cultivo y la pastilla celular en tubos independientes. El medio de cultivo se almacenó a -20°C para posteriormente analizar su perfil proteico. Los perfiles proteicos fueron analizados mediante SDS-PAGE en gel de 12 % de acrilamida, como se ha descrito anteriormente.

2.4.3. Expresión heteróloga en *P. pastoris*

En este caso se decidió expresar tanto la versión inmadura (con péptido señal) como madura (libre del péptido señal). Se inoculó (de manera independiente) una colonia por la clona con región codificante de la proteína madura y una colonia por la clona con región codificante de la proteína inmadura en 50 ml de medio BMGY y se incubó a 30°C a 250 rpm hasta que la OD600 alcanzó valores entre 2-3. Se tomaron alícuotas de 10 ml a las 24, 48, 72 y 96 horas para extraer las proteínas y así determinar el tiempo óptimo de expresión. Para cada punto de colecta se centrifugaron las células a 3200 x g por 10 minutos a temperatura ambiente y el sobrenadante se separó de la pastilla celular en un tubo independiente y fue almacenado a -20°C. Las muestras se procesaron como se ha descrito con anterioridad.

La purificación se realizó usando la resina Ni-NTA Agarose (QIAGEN). Para eluir la proteína, se agregaron 500 µl de amortiguador de elución (50 mM de fosfato de sodio, pH 7.5) con concentraciones crecientes de imidazol (10, 50, 100, 250 mM).

2.5. Cuantificación de proteínas

La concentración de proteínas en las fracciones proteicas fue cuantificada con el método de Bradford linearizado (Ernst & Zor, 2010) usando albúmina sérica bovina como estándar (ABS). La curva estándar de calibración de ABS (0.1 µg/µl) se estableció usando 0, 1, 2, 3, 4 y 5 µg/µl de la proteína. Para preparar las muestras, se mezclaron 100 µl de cada muestra con 100 µl de agua desionizada estéril y 500 µl de reactivo Bradfrod recién preparado. Todos los ensayos tuvieron tres réplicas. Se aplicó vórtex por unos segundos y se procedió a leer las absorbancias en un espectrofotómetro a 595nm y 450nm. Para calcular la gráfica de calibración de ABS, se dividió el valor de absorbancia de 595nm entre el de 450nm (Ernst & Zor, 2010) y se promediaron los triplicados. La concentración de las muestras se calculó con la ecuación de la recta (y= mx + b).

2.6. Determinación de actividad lipolítica en placa

Se utilizaron placas de Petri con medio mínimo conteniendo aceite de oliva (1 % v/v) como única fuente de carbono y adicionado con Rodamina B (0.001 % v/v). Este sustrato es un buen modelo para la detección de lipasas verdaderas debido a que el aceite de oliva está constituido de ácidos grasos de cadena larga (Gopinath *et al.*, 2013). La hidrólisis del sustrato causa la formación de halos claros alrededor de las colonias, visible bajo radiación UV (410 nm) (Kouker & Jaeger, 1987), identificando así, la actividad lipolítica.

2.7. Determinación de actividad lipolítica por espectrofotometría

La actividad lipolítica se determinó usando p-nitrofenilpalmitato como sustrato. Se preparó solución madre de la mezcla de reacción mezclando 2.5 ml de isopropanol con 15 mg de p-nitrofenilpalmitato y se adicionó a 22.5 ml de amortiguador Sörensen (0.1 M de KH₂PO₄, 0.1 M de Na₂HPO₄) a 0.05 M, pH 8 con 103.5 mg de desoxicolato de sodio (DOC) y 50 mg de goma arábiga. Por cada reacción se precalentó 1 ml de esta solución y se agregó 100 μl de las muestras a analizar y la actividad fue medida después de 15 minutos a 410 nm (Hasan *et al.*, 2009; Villela *et al.*, 2015). Para determinar la temperatura óptima se precalentó a 60,

50, 40, 30 y 20 °C, 1 ml de la solución amortiguadora previamente descrita. Para la determinación de pH óptimo se usó el amortiguador Sörensen ajustado a pH 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 y 9.0. La preferencia de sustrato se determinó usando p-nitrofenilésteres de diferentes longitudes de cadenas acilo (C4, C8, C12, C16). Una unidad de actividad de lipasa se define como la cantidad de enzima que libera 1 μmol de p-nitrofenol por minuto bajo las condiciones de ensayo (Liu *et al.*, 2017).

CAPÍTULO III. RESULTADOS

3.1. Análisis in silico de la lipasa 77338

Con base en los análisis bioinformáticos, esta proteína posee estructuras y motivos típicos de la mayoría de las lipasas que se conocen. Tal es el caso de un dominio lid en su estructura, con una longitud de once aminoácidos (TYITNTIIDLS), además de una triada catalítica (SHD) y el "codo nucleofílico" (GHSLG). También fue determinada la localización in silico de estas estructuras: el codo nucleofílico (Gly214-Gly218), el dominio lid (Thr137-Tyr154), la triada catalítica (Ser216, Asp282, His343) y el pozo oxianión (Thr137-Leu217), visualizadas en la Figura 5. Esta proteína tiene una longitud de 404 aminoácidos, con un peso molecular predicho de aproximadamente 44.5 kDa, además posee una señal de secreción por lo que se espera sea una proteína extracelular. De igual manera, en el trabajo reportado por Canseco et al., (2018) se construyó un árbol filogenético usando 66 secuencias de lipasas, incluyendo 35 ya caracterizadas en otros reportes y las 13 secuencias de las lipasas de su reporte; como referencia, se utilizaron lipasas caracterizadas de Ascomicetos y Basidiomicetos. La proteína 77338 se agrupó en el clado de LipA de Acremonium alcalophilum, una proteína con actividad lipasa/acetilxilan esterasa que trabaja sobre ésteres de p-nitrofenil de cadena larga y xilanos, lo que apoya que la proteína 77338 sea una lipasa verdadera.

MGWTFLGRFGLLLLVQLAAAVFVEAAYINQQEPLGVKEPAAVSTIPVSLFADLERLARLVDVSYCLGTTGIRKPFQCVSRCDEFPNVTLAST
WSTGFLFGDSCGFIAVDHGSDQQRQNDVLIGDDEQGAIVVAFRGTYSITNTIIDLSTMPQKYVPYPSPDHGGELPEKPSHECTNCTVHSGF
LESWKSARESVLPELKALRAKYPSHPIHLIGHSLGGAVACLAALELKVSLGWDDVTVTTFGEPRVGNSEFAHFVDDVFDLDGIIDLEKRTYRR
VTHADDPPVPLLPPGEFGYQSHGGEIFISKSALSPSETDVQLCVGDADPNCSARDDSSVEGLLNRLLFFWGTTASLEEYTERMSFPARFKLW
QLFFAHRDYFWRLGLCVPGGDPTNWGRPPYAPHDEEL

Figura 5. Secuencia de aminoácidos de la proteína 77338. Azul: Péptido señal; amarillo: lid; verde: codo nucleofílico; rojo: triada catalítica; subrayado se encuentra el pozo oxianión.

El modelamiento de la lipasa se realizó con los programas I-TASSER y SWISS MODEL (Figura 6), usando la secuencia de aminoácidos de la proteína 77338 depositada en el JGI portal del genoma de T. harzianum. Los modelos obtenidos con el software I-TASSER reveló que el plegamiento tridimensional de la proteína está conformado por 11 láminas β plegadas y 6 α hélices, el cual es un plegamiento característico de la familia de proteínas

 α/β hidrolasas a la que pertenecen las lipasas. El modelo generado con el programa SWISS-MODEL predice 14 láminas β plegadas y 6 α hélices en la estructura tridimensional de la lipasa. La diferencia de 3 láminas β más detectadas con SIWSS MODEL, posiblemente se deba a que cada programa realiza el modelamiento con base en proteínas diferentes registradas en sus bases de datos. En cuanto a función molecular, se define como una enzima con actividad de triacilglicerol lipasa, anotada con participación en el metabolismo de lípidos.

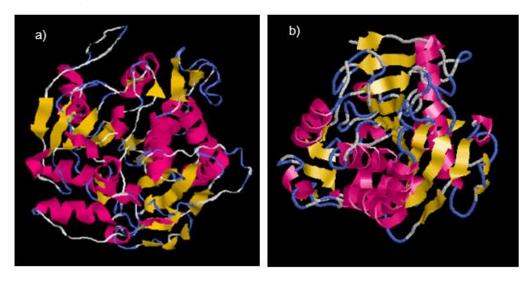


Figura 6. Modelamiento tridimensional de la lipasa 77338. a) Modelo de la proteína 77338 deducido por el programa I-TASSER. En color naranja se observan las láminas β plegadas y en color fucsia las α hélices. b) Modelo de la proteína 77338 deducido por el programa SWISS MODEL. En color naranja se observan las láminas β plegadas y en color rosa las α hélices.

Con el fin de saber si la proteína es extracelular (y, por tanto, secretarse al medio de cultivo) se utilizó el software SignalP 5.0 para identificar si posee péptido señal de secreción (Figura 7). El programa reveló que la proteína tiene un péptido señal con una longitud de 25 aminoácidos (MGWTFLGRFGLLLLVQLAAAVFVEA), por lo que posiblemente se trata de una enzima extracelular, lo que coincide con las anotaciones en el portal JGI del genoma de *T. harzianum*. Se utilizó el servidor ExPASy (https://web.expasy.org/protparam/) para deducir los principales parámetros físicos y químicos de la proteína 77338 (Cuadro 3). El peso molecular calculado *in silico* fue de 44.5 kDa, un PI predicho de 4.9 y un índice de inestabilidad de 35.11, que la clasifica como estable. Los aminoácidos más abundantes de

esta proteína son leucina (10.6 %), glicina (8.4 %), valina (7.4 %) y serina (7.4 %). También contiene 10 residuos de cisteína representando el 2.5 % del contenido total de la lipasa, y de acuerdo al programa DiANNA 1.1 Web Server (http://clavius.bc.edu/~clotelab/DiANNA/) posee 5 puentes disulfuro en su estructura.

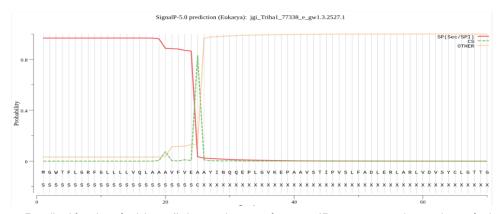


Figura 7. Predicción de péptido señal para la proteína con ID 77338 en el portal genómico de *T. harzianum*. Línea roja: secuencia de un péptido señal; línea amarilla: secuencia que no contiene características de péptido señal; línea verde punteada: sitio de corte.

| Cuadro 3. Pa | rámetros pri | ncipales de la _l | oroteína 77338. | | |
|-----------------------|-------------------|-----------------------------|-----------------|----------------|-------------------------|
| Número de aminoácidos | Peso molecular | Punto isoeléctrico | Composición | en aminoácidos | Índice de inestabilidad |
| | | (IP) | | | |
| 404 | 44.54 kDa | 4.9 | Ala (A) 29 | 7.2% | El índice de |
| | | | Arg (R) 20 | 5.0% | inestabilidad fue |
| | | | Asn (N) 9 | 2.2% | de 35.11, lo que |
| | | | Asp (D) 28 | 6.9% | clasifica la |
| | | | Cys (C) 10 | 2.5% | proteína como |
| | | | Gln (Q) 12 | 3.0% | estable |
| | | | Glu (E) 25 | 6.2% | |
| | | | Gly (G) 34 | 8.4% | |
| | | | His (H) 13 | 3.2% | |
| | | | lle (I) 15 | 3.7% | |
| | | | Leu (L) 43 | 10.6% | |
| | | | Lys (K) 11 | 2.7% | |
| | | | Met (M) 3 | 0.7% | |
| | | | Phe (F) 23 | 5.7% | |
| | | | Pro (P) 27 | 6.7% | |
| | | | Ser (S) 30 | 7.4% | |
| | | | Thr (T) 23 | 5.7% | |
| | | | Trp (W) 8 | 2.0% | |
| | | | Tyr (Y) 11 | 2.7% | |
| | | | Val (V) 30 | 7.4% | |

En cuanto a modificaciones postraduccionales se investigó si la proteína 77338 tiene sitios de glicosilación putativos. El programa Glycosilation Predictor (https://comp.chem.nottingham.ac.uk/glyco/) predice 29 sitios probables de glicosilación, de los cuales 6 son de tipo "N glicosilados" y 23 son "O glicosilados". Los residuos N glicosilados fueron las asparaginas 29, 86, 118, 142, 176 y 325, mientras que la treonina 4, 44, 68, 88, 92, 95, 137, 143, 149, 178, 242, 273, 355 y serina 43, 63, 91, 148, 193, 207, 216, 306, 311, 327 fueron los residuos O glicosilados.

Los análisis *in silico* apoyan que la proteína 77338 es una triacilglicerol lipasa, además de que en estudios previos se demostró su expresión con aceite de oliva (Ulker *et al.*, 2010; Canseco *et al.*, 2018), lo que fortalece la hipótesis de que sea una lipasa verdadera. Sobre expresión heteróloga, purificación y caracterización bioquímica de lipasas de *T. harzianum*, actualmente no hay reportes, por lo que se decidió continuar con la clonación y caracterización de la lipasa 77338.

3.2. Aislamiento y clonación del gen 77338

3.2.1. Sistema GATEWAY para expresión en S. cerevisiae

Las clonas transformadas con el plásmido pYESDEST52-LipC fueron obtenidas en nuestro grupo por el Dr. Miguel Canseco. El constructo utilizado contiene una etiqueta de 6xHis en el extremo carboxilo terminal (LipC), Se procedió a realizar una PCR en colonia para confirmar las transformantes (Figura 8).

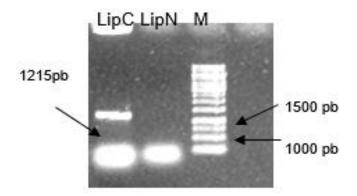


Figura 8. Confirmación por PCR en colonia de transformantes *S. cerevisiae* con pYESDEST52LipC o pYESDEST52LipN. LipC: constructo que etiqueta de 6xHis en C terminal; LipN: etiqueta de 6xHis en N terminal; M: marcador de peso molecular.

En la Figura 8 se observa una banda de amplificación con el tamaño esperado en la clona LipC, pero no se confirmó la presencia de la región codificante de la enzima en la clona LipN. De manera paralela, el vector pYESDEST52-LipC se envió a LANBAMA (IPICYT) para su secuenciación de nucleótidos, el análisis de la secuencia confirmó que el inserto se encuentra en marco de lectura. Se secuenciaron 1,115 pb y se observó que la secuencia nucleotídica obtenida a partir de ADNc de *T. harzianum* presenta algunos cambios respecto a la de la base de datos. Se realizó un análisis Blastn (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) usando la secuencia obtenida experimentalmente, dando como primero homólogo ("hit") con el gen de la proteína 77338 depositado en la base de datos JGI con el que presenta 95 % de identidad (1054 pb). El 5 % restante (58 pb) fueron cambios en los que el 80 % (41 pb) fueron por transición y el 20 % (17 pb) de transversión (Figura 9).

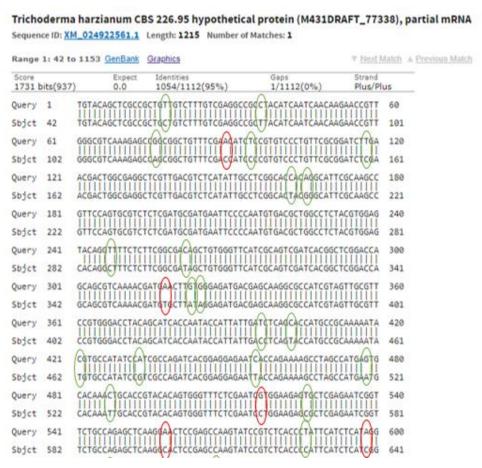


Figura 9. Alineamiento de la secuencia obtenida a partir de ADNc de *T. harzianum* y clonada en pYESDEST52 y la secuencia codificante de la proteína 77338. datos. Algunas mutaciones de transición (verde) y transversión (rojo) son resaltadas en óvalos.

En la figura 10 se muestra el alineamiento con el primer homólogo obtenido en blastx de la secuencia obtenida y traducida a proteína. La secuencia proteica muestra 99% de identidad en un fragmento de 257 aminoácidos de la proteína 77338, variando en tres cambios de aminoácidos resaltados en óvalos rojos.

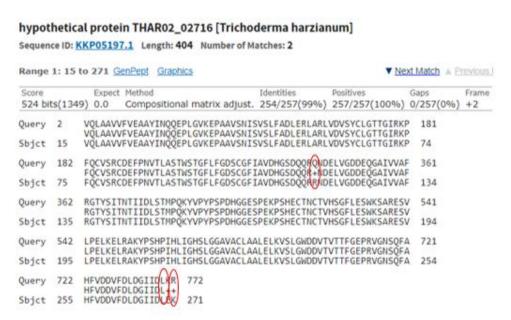


Figura 10. Alineamiento de aminoácidos de la proteína deducida a partir de la secuencia clonada en pYESDEST52 y la proteína 77338 de *T. harzianum*. Se muestra el resultado del análisis blastx (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).

Los 3 cambios son: una arginina (R) de la proteína deducida en la base de datos está cambiada por una glutamina (Q), un ácido glutámico (E) por una lisina (K) y una lisina (K) por una arginina (R). Dos de los cambios son conservativos, ya que fueron sustituidos por aminoácidos de similar propiedad fisicoquímica (R, Q; L, R).

Otro sistema utilizado para la expresión heteróloga fue el sistema pLATE que se describe a continuación.

3.2.2. Sistema pLATE para expresión en E. coli

Las clonas en Rosetta-gami fueron obtenidas completamente durante este trabajo de tesis. Se inició buscando la región codificante del gen 77338 en el portal del genoma de Trichoderma harzianum (https://genome.jgi.doe.gov/Triha1/Triha1.home.html). El gen 77338 se encuentra ubicado en el scaffold_3:1045025-1046239 con una longitud de 1215 pb. Para aislar la región codificante se usó ADNc de *T. harzianum* (50 ng/μl) y mediante PCR se amplificó la región codificante (1215 pb). En la figura 11 se observa la amplificación del producto con el tamaño esperado (1215 pb); se usó una polimerasa de alta fidelidad (Herculase Fusion Enzyme); como testigo negativo se usó agua.

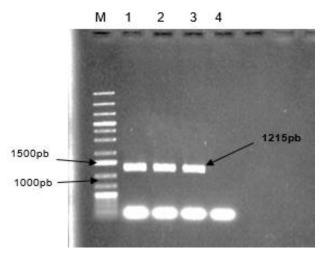


Figura 11. Amplificación de la secuencia codificante de la lipasa 77338 a partir de ADNc de *T. harzianum* para clonar en pLATE31. M: Marcador de peso molecular; Carriles 1-3: Gen 77338 y carril 4: Testigo negativo.

El producto amplificado de la PCR se purificó con el paquete comercial QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante. El producto purificado se reamplificó por PCR usando los cebadores con adaptadores aLICator. Se verificó el producto de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8 %. En la Figura 12, se observa el producto con el tamaño esperado (1250pb, porque el tamaño aumenta por la adición de los 35 pb de los adaptadores), confirmando la ligación de los adaptadores aLICator al gen 77338.

Una vez incorporados los adaptadores aLICator al producto de interés, éste se clonó en el vector pLATE31 siguiendo las indicaciones del fabricante aLICator Ligation Independent Cloning and Expression Kit 3, #K1261 (Thermoscientific). De esta clonación resultó el constructo pLATE31-77338.

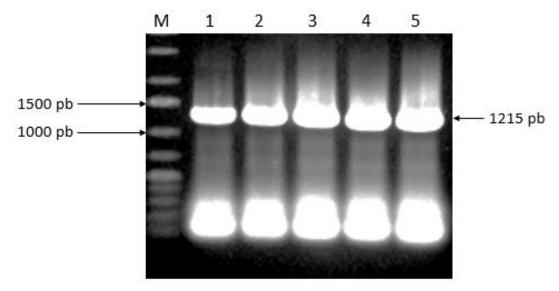


Figura 12. Amplificación de la región codificante del gen 77338 incorporando los adaptadores para clonación en pLATE31. M: Marcador de peso molecular; carriles 1-5: Productos de PCR empleando los cebadores que tienen incorporados los adaptadores.

Para obtener suficiente plásmido para usos posteriores, se transformaron células competentes de *E. coli* (Top10) con el vector recombinante y las transformantes (clonas que crecieron en presencia de 100ng/µl de ampicilina) fueron sometidas a extracción de plásmido con el paquete comercial QIAprep Spin Miniprep Kit (250). La presencia del inserto en los plásmidos extraídos de las clonas (6 en total) se confirmó mediante PCR (Figura 13). La clona 6 fue la única positiva con base en la amplificación del inserto, por tal motivo, se usó esta clona para continuar el trabajo. Una vez obtenido el plásmido pLATE31-77338, se envió a LANBAMA (IPICYT) para secuenciar.

En la figura 14 se muestra un alineamiento Blastn (https://blast.ncbi.nl m.nih.gov/Blast.cgi) usando el inserto secuenciado. Este tiene 95 % de identidad con el ARNm de la proteína 77338 (Sequence ID: XM 024922561.1). De los 1,215 pb del CDS de la enzima, 63 son distintos a los reportados en la base de datos del genoma de *T. harzianum* (https://mycocosm.igi.doe.gov/Triha1/Triha1.home.html). La secuencia confirmó la presencia de la etiqueta 6xHis en el extremo C terminal.

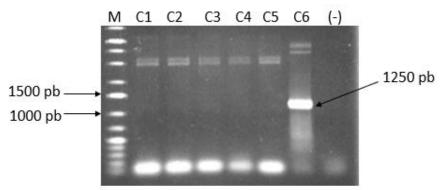


Figura 13. Confirmación por PCR de la presencia del inserto de interés en el constructo pLATE31-77338. M: marcador de peso molecular; C1-C6: clonas de la 1 a la 6; (-): testigo negativo.

| Range | Range 1: 1 to 1212 GenBank Graphics V Next Mu | | | | | | |
|-----------------|---|-----------------|---------------------------|--------------|--------------------|-------------------|-----|
| Score 1906 b | its(103 | 32) Expe 0.0 | ct Identities 1152/121 | 12(95%) | Gaps 0/1212(0%) | Strand Plus/Pl | us |
| Query | 1 | ATGGGGTGGAC | ATTTCTGGGCCGC | TTCGGGCTGTTG | CTGCTTGTACAGCTC | SCCGCTGTT | 68 |
| Sbjct | 1 | ATGGGGTGGAC | TTTCTGGGCCGC | TTCGGGCTGTTG | CTGCTTGTACAGCTC | SCCGCTGCT | 60 |
| Query | 61 | GTCTTTGTCGA | GCCGCCTACATC | AATCAACAAGAA | CCGTTGGGCGTCAAA | SAGCEGGCG | 120 |
| Sbjct | 61 | GTCTTTGTCGA | GCCGQT ACATC | AATCAACAAGAA | CCGTTGGGCGTCAAA | SAGCGAGCG | 120 |
| Query | 121 | GCTGTTTCGAA | ATCTCCGTGTCC | CTGTTCGCGGAT | CTTGAACGACTGGCG | AGGCTCGTT | 180 |
| Sbjct | 121 | GCTGTTTCGAC | ATCCCCGTGTCC | CTGTTCGCGGAT | CTCGAACGACTGGCG | AGGCTCGTT | 180 |
| Query | 181 | GACGTCTCATA | TGCCTCGGCACC | CAGGCATTCGC | AAGCCGTTCCAGTGC | STCTCTCGA | 240 |
| Sbjct | 181 | GACGTCTCATA | TGCCTCGGCACT | AdgeGCATTCGC | AAGCCGTTCCAGTGC | STCTCTCGA | 240 |
| Query | 241 | TGCGATGAATT | CCCAATGTGACG | CTGGCCTCTACG | TGGAGTACAGGTTTT | CTCTTCGGC | 300 |
| Sbjct | 241 | TGCGATGAATT | CCCAATGTGACG | CTGGCCTCTACG | TGGAGCACAGGCTTT | CTCTTCGGC | 300 |
| Query | 301 | GACAGCTGTGG | TTCATCGCAGTC | GATCACGGCTCG | GACCAGCAGCGTCGA | AACGATGAA | 360 |
| Sbjct | 301 | GATAGCTGTGG | TTCATCGCAGTC | GATCACGGCTCG | GACCAGCAGCGTCAA | AACGATGTG | 360 |

Figura 14. Alineamiento del inserto en pLATE31 y la secuencia 77338 del JGI. En óvalos rojos se muestran algunos cambios de base por transversión y en verde por transición.

La secuencia obtenida en pLATE31 se editó eliminando los adaptadores, y con la secuencia resultante se dedujo la secuencia de aminoácidos de la proteína y ésta se comparó con la secuencia de la proteína 77338 disponible en el portal de *T. harzianum*. El alineamiento

confirmó que la secuencia clonada se encuentra en marco de lectura abierto y que la secuencia está completa (Figura 15). Se observa también que no hubo cambios de aminoácidos, es decir; tuvo un 100 % de identidad con la secuencia disponible en la base de datos.

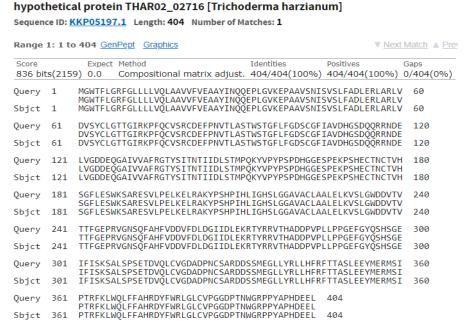


Figura 15. Alineamiento de la proteína deducida a partir del inserto clonado en pLATE31 con la secuencia 77338 del portal genómico de *T. harzianum* en el JGI.

Posteriormente, se transformaron células competentes de *E. coli* (cepa Rosetta-gami) con el plásmido pPLATE31-77338. Se escogieron aleatoriamente trece transformantes que crecieron en presencia del agente de selección ampicilina (100 µg/ µl) y se les realizó una PCR en colonia para confirmar la presencia del inserto. Todas las colonias tuvieron el inserto con el tamaño esperado y el testigo negativo no amplificó (Figura 16).

Una vez confirmadas e identificadas las clonas recombinantes, se seleccionó al azar la clona # 1 y se indujo la expresión de la proteína y su posterior purificación tal como se describió en materiales y métodos.

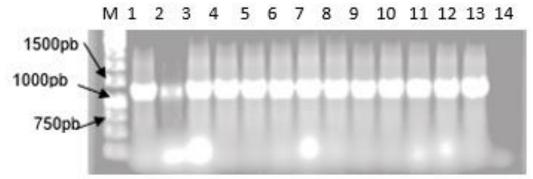


Figura 16. PCR en colonia de células de Rosetta-gami transformadas con el plásmido pLATE31-77338. M: marcador de peso molecular; carriles del 1-13: 13 clonas individuales de Rosetta-gami transformadas con el plásmido pLATE31-77338. Carril 14: testigo negativo.

3.2.3. Sistema pPICZB para expresión en *P. pastoris*

Para la clonación en pPICZB se amplificó la región codificante tanto de la forma madura como inmadura (Figura 17). El gen se amplificó mediante PCR de punto final a partir de ADNc de *T. harzianum* usando los cebadores F-lipI y R-lipI; F-lipM y R-lipM (Cuadro 2) conteniendo los sitios de restricción NotI y XbaI, respectivamente.

Los productos de PCR se purificaron con el paquete QIAquick Gel Extraction (QIAGEN) y se clonaron en el vector pPICZB resultando en los constructos pPICZB-I (constructo con proteína inmadura) y pPICZB-M (constructo con proteína madura). Para confirmar la clonación del inserto, se hizo una doble digestión con Notl y Xbal (Figura 18). El plásmido resultante se mandó a secuenciar a LANBAMA, IPICYT para confirmar la orientación y el marco de lectura.

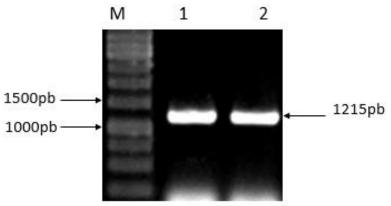


Figura 17. Aislamiento de la región codificante de la lipasa 77338 de *T. harzianum* versión madura e inmadura para su clonación en pPICZB. M: marcador de peso molecular; carril 1: gen para amplificar la forma inmadura de la lipasa 77338, carril 2: gen para amplificar la forma madura de la lipasa 77338. Para ambas se usó ADNc de *T. harzianum* como templado.

La proteína en forma madura no incluye el péptido señal, por tanto se esperaría que se encuentre en el citosol. La forma inmadura de la lipasa si incluye el péptido señal de secreción, por lo que se espera que se secrete en el medio de cultivo. Las digestiones de las construcciones (pPICZB-M y pPICZB-I) confirmaron la inserción de aproximadamente 1200 pb, que es lo que se espera que aumentara el tamaño del vector. A continuación, ambos constructos fueron enviados a secuenciar a LANBAMA (IPICYT) para confirmar que se hayan clonado en marco de lectura. Para ambas construcciones hizo falta terminar de secuenciarse en el extremo N terminal y para la inmadura también del C terminal.

Para la proteína inmadura se realizó un Blastn en la página del NCBI (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) (Figura 19). El alineamiento muestra que el inserto en pPICZB-I tiene 95 % de identidad con la secuencia de la base de datos (Sequence ID: xm. 024922561.1). Para corroborar que la secuencia de la base de datos (Sequence ID: xm. 024922561.1). Para corroborar que la secuencia clonada esté correcta, se realizó el alineamiento de aminoácidos comparando con la secuencia de la proteína 77338 de referencia (Figura 20). Se encontró que presenta 99 % de identidad en aminoácidos respecto a la proteína representada en la base de datos. La secuenciación de la proteína madura clonada en pPICZB-M fue corroborada usando el programa Blastn (Figura 21). El alineamiento muestra un 95 % de identidad con la secuencia de la base de datos (Sequence ID: XM 024922561.1).

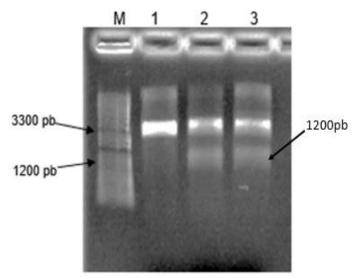


Figura 18. Análisis de restricción de los plásmidos pPICZB, pPICZB-M y pPICZB-I con las enzimas Notl y Xbal. M: marcador de peso molecular; carril 1: vector pPICZB; carril 2: vector pPICZB-M; carril 3: vector pPICZB-I. La flecha señala el inserto liberado.

| Score 1901 b | its(10 | 29) Expect 0.0 | Identities 1151/1212(95%) | Gaps 0/1212(0%) | Strand Plus/Plus | 8 |
|-----------------|--------|----------------|------------------------------|--------------------|---------------------|-----|
| Query | 1 | ATGGGGTGGACATT | TCTGGGCCGCTTCGGGCTGT | TGCTGCTTGTACAGCTCG | CGCTGTT 6 | 50 |
| Sbjct | 1 | ATGGGGTGGACATT | TCTGGGCCGCTTCGGGCTGT | TGCTGCTTGTACAGCTCG | CCGCTGCT 6 | 50 |
| Query | 61 | GTCTTTGTCGA66C | CGCCTACATCAATCAACAAG | AACCGTTGGGCGTCAAAG | AGCCGGCG 1 | 120 |
| Sbjct | 61 | GTCTTTGTCGA66 | CGCTTACATCAATCAACAAG | AACCGTTGGGCGTCAAAG | AGCCAGCG 1 | 120 |
| Query | 121 | GCTGTTTCGAACAT | стссететссстеттсее | ATCTTGAACGACTGGCGA | GGCTCGTT 1 | 180 |
| Sbjct | 121 | GCTGTTTCGACCAT | ccccatatccctattcaca | ATCTCGAACGACTGGCGA | GGCTCGTT 1 | 180 |
| Query | 181 | GACGTCTCATATTG | CCTOGGOACCACAGGCATTC | GCAAGCCGTTCCAGTGCG | TCTCTCGA 2 | 240 |
| bjct | 181 | GACGTCTCATATTG | CCTOGGCACTACGGGCATTC | GCAAGCCGTTCCAGTGCG | TCTCTCGA 2 | 240 |
| Query | 241 | TGCGATGAATTCCC | CAATGTGACGCTGGCCTCTA | CGTGGAGTACAGGTTTTC | TCTTCGGC 3 | 800 |
| Sbjct | 241 | TGCGATGAATTCCC | CAATGTGACGCTGGCCTCTA | CGTGGAGCACAGGCTTTC | TCTTCGGC 3 | 800 |
| Query | 301 | GACAGCTGTGGGTT | CATCGCAGTCGATCACGGCT | CGGACCAGCAGCGTCGAA | ACGATGAA 3 | 60 |
| Sbjct | 361 | GATAGCTGTGGGTT | CATCGCAGTCGATCACGGCT | CGGACCAGCAGCGTCAAA | CGATGTG 3 | 60 |

Figura 19. Alineamiento con la región codificante del gen 77338 con la secuencia de nucleótidos de la versión inmadura clonada en pPICZB-I. En óvalos rojos se muestran algunos cambios por transversión y en verdes cambios por transición.

Para corroborar que la secuencia clonada esté correcta, se realizó el alineamiento de aminoácidos comparando con la secuencia de la proteína 77338 de referencia (Figura 22).

Se encontró que presenta 99 % de identidad en aminoácidos respecto a la proteína representada en la base de datos.

| Score | | Expect | Method | Identities | Positives | Gaps | Frame |
|---------|---------|--------|--|------------------|--------------|-----------|-------|
| 783 bit | s(2023) | 0.0 | Compositional matrix adju | st. 403/404(99%) | 403/404(99%) | 0/404(0%) | +1 |
| uery | | | GRFGllllvqlaavvfveaaYI GRFGLLLLVOLAAVVFVEAAYI | | | | |
| bjct | | | GRFGLLLLVQLAAVVFVEAAYI | | | | |
| uery | | | GTTGIRKPFQCVSRCDEFPNVT GTTGIRKPFQCVSRCDEFPNVT | | | | |
| bjct | | | GTTGIRKPFQCVSRCDEFPNVT | | | | |
| uery | | | QGAIVVAFRGTYSITNTIIDLS OGAIVVAFRGTYSITNTIIDLS | | | | |
| bjct | | | QGAIVVAFRGTYSITNTIIDLS | | | | |
| uery | | | WKSARESVLPELKELRAKYPSH WKSARESVLPELKELRAKYPSH | | | | |
| bjct | 181 | | WKSARESVLPELKELRAKYPSH | | | | |
| uery | 721 | | RVGNSQFAHFVDDVFDLDGIID RVGNSQFAHFVDDVFDLDGIID | | | | |
| bjct | | | RVGNSQFAHFVDDVFDLDGIID | | | | |
| uery | | | ALSPSETDVQLCVGDADPNCSA ALSPSETDVOLCVGDADPNCSA | | | | |
| bjct | | | ALSPSETDVQLCVGDADPNCSA | | | | |
| uery) | | | WORREAHRDYFWRLGLCVPGGD | | | | |
| bjct | | | WOLFFAHRDYFWRLGLCVPGGD | | | | |

Figura 20. Alineamiento de pPICZB-I con la herramienta Blastx. En rojo se muestra el único cambio de una arginina (R) por una lisina (L).

| Range | 1: 57 to | 1212 GenBank | Graphics | | W Next 8 | Aatch . |
|-----------------|----------|---------------|------------------------------|----------------------|-------------------|---------|
| Score 1836 t | its(994) | Expect 0.0 | Identities 1102/1156(95%) | Gaps 0/1156(0%) | Strand Plus/Pl | us |
| Query | 1 | TGCTGTCTTTGTC | GAGGCCGCTACATCAATCA | AACAAGAACCGTTGGGCGTC | AAAGAGCC | 60 |
| Sbjct | 57 | tectetetttete | GAGGCCGCTTACATCAATCA | AACAAGAACCGTTGGGCGTC | AAAGAGCC | 116 |
| Query | 61 | GGCGGCTGTTTCG | AAATC/CCGTGTCCCTGT | TCGCGGATCTTGAACGACTG | GCGAGGCT | 120 |
| Sbjct | 117 | AGCGGCTGTTTCG | ACCATCCCCGTGTCCCTGT | TCGCGGATCTCGAACGACTG | GCGAGGCT | 176 |
| Query | 121 | CGTTGACGTCTCA | TATTGCCTCGGCACACAG | GCATTCGCAAGCCGTTCCAG | TGCGTCTC | 180 |
| Sbjct | 177 | cetteAcetete | TATTGCCTCGGCACTAGGG | GCATTCGCAAGCCGTTCCAG | tecetete | 236 |
| Query | 181 | TCGATGCGATGAA | TTCCCCAATGTGACGCTGG | CCTCTACGTGGAGTACAGGT | TTTCTCTT | 240 |
| Sbjct | 237 | TCGATGCGATGA | TTCCCCAATGTGACGCTGG | cctctacgtggagcacaggc | tttctctt | 296 |
| Query | 241 | CGGCGACAGCTGT | GGGTTCATCGCAGTCGATCA | ACGGCTCGGACCAGCAGCGT | CGAAACGA | 300 |
| Sbjct | 297 | CGGCGATAGCTGT | GGGTTCATCGCAGTCGATC | ACGGCTCGGACCAGCAGCGT | CAAAACGA | 356 |
| Query | 301 | TEACTTGTGGGA | GATGACGAGCAAGGCGCCA | TCGTAGTTGCGTTCCGTGGG | ACCTACAG | 360 |
| Sbjct | 357 | TOTACTTATAGGA | GATGACGAGCAAGGCGCCA | TCGTAGTTGCGTTCCGTGGG | ACCTACAG | 416 |

Figura 21. Alineamiento con la región codificante del gen 77338 con la secuencia de nucleótidos de la versión inmadura clonada en pPICZB-M. En óvalos rojos se muestran algunos cambios por transversión y en verdes cambios por transición.

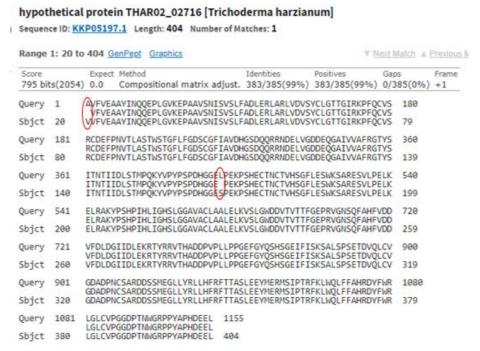


Figura 22. Alineamiento de pPICZB-M con la herramienta Blastx. En rojo se muestran los cambios de aminoácidos.

Ambos constructos (pPICZB-I y pPICZB-M) y el vector pPICZB (como testigo negativo) se usaron para transformar células competentes de *P. pastoris* cepa GS115. Las transformantes fueron seleccionadas en placas de YPD con 100 µg/µl de zeocina. Se obtuvieron 9 colonias transformadas con pPICZB-I; 4 colonias con pPICZB-M y una con pPICZB crecieron en presencia de zeocina. La presencia de inserto fue confirmada mediante PCR en colonia usando los cebadores específicos para la lipasa 77338 (Figura 23).

En la figura 23 se observa que la clona transformada con pPICZB (carril 2) no presentó amplificación, congruente con lo esperado porque el vector no contiene el inserto (vector vacío). Por otra parte, para las clonas transformadas con pPICZB-M una colonia presentó el inserto con el tamaño esperado (carril 5) y una fue positiva lo que también se observó para el caso de las clonas transformadas con pPIZCB-I, una colonia tuvo amplificación (carril 10).

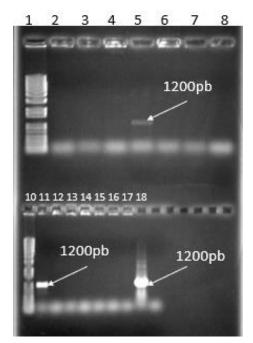


Figura 23. Confirmación de las clonas recombinantes GS115-pPICZBlipI y GS115-pPICZBlipM. La confirmación de transformantes se realizó mediante PCR en colonia de las clonas que crecieron en presencia de zeocina (100 μg/ml); carriles 1 y 10: marcador de peso molecular (GeneRuler 1kb Ladder, Thermoscientific); carril 2: única colonia transformada con pPICZB vacío que creció; carriles 3-6: cuatro únicas colonias transformadas con el vector pPICZBlipM; carriles 7, 8 y del 10-16: colonias transformadas con el vector pPICZBlipI; carril 17: vector pPICZBlipI como testigo positivo y carril 18: colonia no transformada.

3.3. Expresión y purificación de la lipasa 77338

3.3.1. Expresión en S. cerevisiae

Al analizar los diseños de las construcciones se pensó en la posibilidad de que la etiqueta en el extremo N terminal interfiera con la función de la señal de secreción y que la proteína se procesaría de manera incorrecta y no se podría secretar. Por lo tanto, se decidió comenzar con la inducción de la expresión de la lipasa con la clona que contiene la etiqueta de 6xHis en el extremo C terminal (LipC). Se realizaron otros intentos previos de expresión de la proteína en *S. cerevisiae*, incubando el cultivo a 30° C y 200 rpm y colectando la levadura a las 16, 36, 72 y 96 horas. En todos los casos los resultados fueron negativos; la proteína no se observó en el extracto citosólico ni en la pastilla (Figura 24).

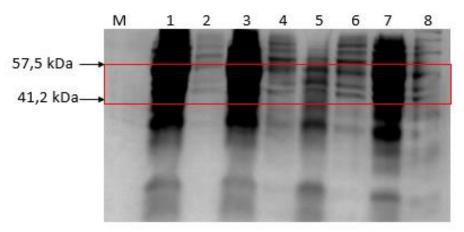


Figura 24. SDS-PAGE del perfil proteico de *S. cerevisiae* bajo inducción con galactosa. M: Marcador de masa molecular; 1 y 2: fracción insoluble (pastilla) y fracción soluble de la cepa no transformada, respectivamente; 3 y 4: fracción insoluble y fracción soluble de la cepa recombinante LipC a las 16 h de inducción; 5 y 6: fracción insoluble y fracción soluble de la cepa recombinante LipC a las 36 h de inducción; 7 y 8: fracción insoluble y fracción soluble de la cepa recombinante LipC a las 72 h de inducción; El recuadro rojo resalta donde debería estar la proteína.

En la Figura 25 se muestra el perfil proteico de las fracciones solubles de los extractos celulares de *S. cerevisiae* transformadas; los extractos fueron purificados por IMAC, utilizando una resina Ni-NTA. Sin embargo, no se observó enriquecimiento de alguna banda, lo que hace pensar que la proteína no se está expresando o se está plegando mal y degradando rápidamente.

Como muestra la figura 25, no se observa ninguna proteína en el rango de tamaño esperado en las clonas de *S. cerevisiae*, lo que posiblemente se deba a que la levadura no cuente con la maquinaria necesaria para la traducción y maduración para producir la lipasa.

Es por ello, que como sistema alternativo de expresión se evaluó *E. coli* Rosetta-gami, ya que es una cepa especializada en producir proteínas eucariotas y ricas en cisteínas (Jin-Song *et al.*, 2012; Mehrnoosh *et al.*, 2016; Yedahalli *et al.*, 2016) como es el caso de la proteína de interés de este trabajo, la cual tiene 10 cisteínas en su secuencia.

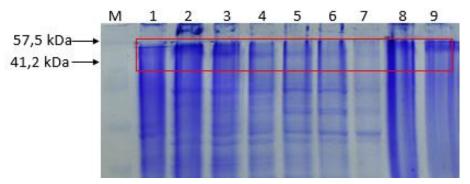


Figura 25. Perfil proteico en gel SDS-PAGE de eluciones de columna Ni-NTA de las fracciones solubles de las clonas transformadas de *S. cerevisiae* para expresar la proteína 77338. M: marcador de masa molecular; 1 y 2: medios de cultivo de la cepa transformada y no transformada, respectivamente; 3-5: fracciones solubles de la cepa no transformada eluídas con 10, 50 y 250 mM de imidazol; 6-8: fracciones solubles de LipC eluídas con 10, 50 y 250 mM de imidazol; 9: fracción insoluble de LipC. En recuadro rojo señala la región donde se esperaba ver la proteína.

3.3.2. Expresión en E. coli

La expresión de la lipasa en *E. coli Rosetta-gami* se indujo con 0.1, 1 y 4 mM de IPTG en medio LB por 8, 16 y 24 horas. Se separó por centrifugación el medio de cultivo del paquete celular y se lisaron las células para extraer las proteínas. El perfil proteico de las fracciones solubles e insolubles se analizó mediante SDS-PAGE obteniendo los resultados que se observan en la Figura 26.

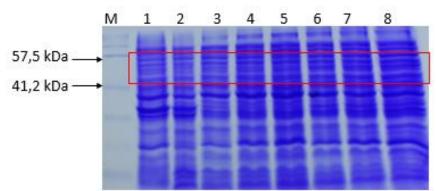


Figura 26. SDS-PAGE de fracciones solubles e insolubles de *E. coli*. M: marcador de masa molecular. 1 y 2: fracción insoluble de la cepa transformada y no transformada, respectivamente; 3-5: fracción soluble de la cepa no transformada a las 8, 16 y 24 horas; 6-8: fracción soluble de la cepa transformada a las 8, 16 y 24 horas de inducción. En recuadro rojo señala la región donde se espera ver la proteína.

En las fracciones eluídas de la resina Ni-NTA con 50mM y 100mM de imidazol, se observa una banda diferencial (Figura 27, carriles 6 y 7 en recuadro negro) con un tamaño de aproximadamente de 45 kDa, lo cual coincide con la masa molecular calculada *in silico* para la lipasa 77338. Esto sugiere que se trate de la proteína de interés.

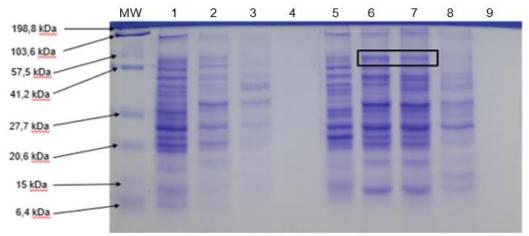


Figura 27. Perfil proteico de las fracciones solubles de Rosetta-gami B purificadas por Ni-NTA resueltas en un gel SDS-PAGE al 12%. MW: marcador de peso molecular. Carriles del 1-4: fracciones solubles de la cepa no transformada eluídas con 10Mm, 50mM, 100mM y 250mM de imidazol, respectivamente. Carriles 5-8: fracciones solubles de la cepa transformada con el plásmido pLATE-77338 eluídas con 10mM, 50mM, 100mM y 250mM de imidazol, respectivamente. Carril 9: amortiguador Laemmli 1X como testigo negativo El recuadro negro resalta las bandas diferenciales esperadas.

De igual forma se analizó el perfil proteico del medio de cultivo de las clonas de Rosettagami transformadas y no transformadas con pLATE31-77338 (Figura 28) para ver si la bacteria sería capaz de secretar la enzima. El medio de cultivo de las transformadas presentó una banda en el SDS-PAGE de alrededor de 30 kDa, menos abundante o ausente en las no transformantes; sin embargo, el tamaño no coincide con el calculado *in silico* para la proteína madura, que es de 40 kDa.

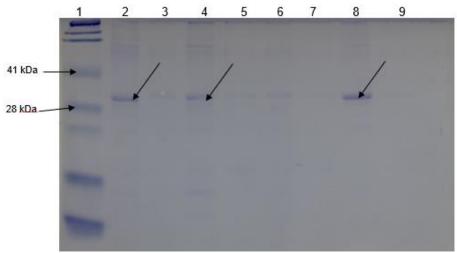


Figura 28. Perfil proteico del medio de cultivo en Rosetta-gami. Carril 1: marcador de peso molecular; carril 2: medio de cultivo en transformante a las 8 h de inducción; carril 3: medio cultivo en no transformante a las 8 h de inducción; carril 4: medio de cultivo en transformante a las 16 h de inducción; carril 5: medio de cultivo en no transformada a las 16 h de inducción; carril 6: medio de cultivo de transformante a las 8 h de inducción y 37°C; carril 7: medio de cultivo de no transformante a las 8 h de inducción y 37°C; carril 8: medio de cultivo en transformante a las 8 h de inducción.

3.3.3. Expresión en *P. pastoris*

Se analizó por SDS-PAGE el perfil proteico de las fracciones solubles e insolubles citosólicas. Las fracciones solubles (Figura 29) de las clonas inducidas con 1% de metanol muestran patrones similares entre las tres clonas (vector vacío, pPICZB-M, pPICZB-I). En el patrón de bandas observado en la figura 29 no se observa enriquecimiento de alguna banda en ninguna de las transformantes.

Consecuentemente, el medio de cultivo de las tres clonas también fue analizado (Figura 30) para buscar la lipasa, ya que, en el caso de la lipasa inmadura, se esperaba que se secrete al medio de cultivo. Se observan bandas leves en los medios de la clona pPICZB-M y la clona con pPICZB-I de aproximadamente 45 kDa, lo que coincide con el tamaño deducido *in silico*. Esto sugiere que posiblemente se trate de la proteína esperada.

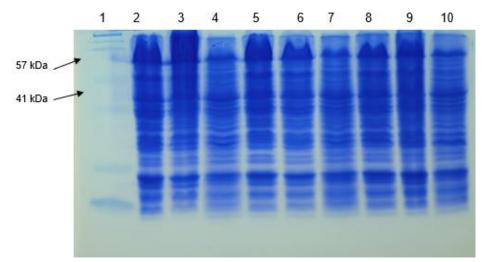


Figura 29. Fracciones solubles de ensayos de expresión de la lipasa 77338 en *P. pastoris*. Carril 1: marcador de peso molecular; carriles 2-5: fracciones solubles (40µl) de la transformada con el vector pPICZB-M a las 24, 48, 72 y 96 horas de inducción, respectivamente; carriles 6-9: fracciones solubles (40µl) de la transformada con el vector pPICZB-I a las 24, 48, 72 y 96 horas de inducción; carril 10: fracción soluble (40µl) de la transformada con el vector vacío a las 96 horas de inducción.

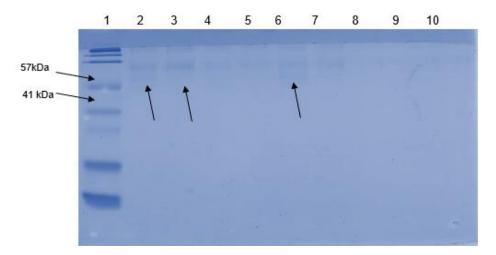


Figura 30. Medio de cultivo de *P. pastoris*. Carril 1: marcador de peso molecular; carriles 2-4: Medio de cultivo (40µl) de la transformada con el vector pPICZB-I a las 24, 48, 120 h de inducción respectivamente; carriles 5-7: medio de cultivo (40µl) de la transformada con el vector pPICZB-M a las 24, 48, 120 h de inducción; carriles 8-10: medio de cultivo (40µl) de la transformada con el vector pPICZB a las 24, 48, 120 h de inducción. Las flechas negras presentan bandas únicas.

También se analizó el perfil proteico de las fracciones solubles purificadas por IMAC tanto para la proteína inmadura (Figura 31) como la madura (Figura 32). Ambas formas de la proteína eluyeron entre 20 y 300 mM de imidazol, sin ninguna proteína contaminante.

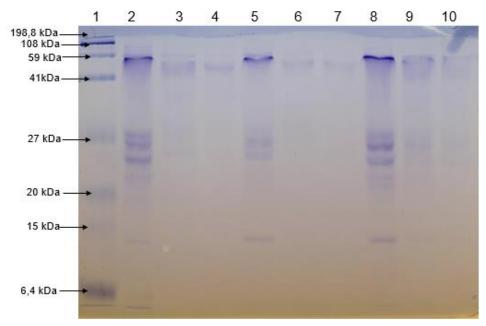


Figura 31. Proteína inmadura purificada por IMAC. Carril 1: marcador masa molecular; carriles 2, 5 y 8 muestran el "Flow-through" a las 24, 48 y 72 horas de inducción, respectivamente; carriles 3, 6 y 9 muestran la elución de la columna con 20 mM de imidazol a las 24, 48 y 72 horas de inducción; carriles 4, 7 y 10: eluciones con 300 mM de imidazol.

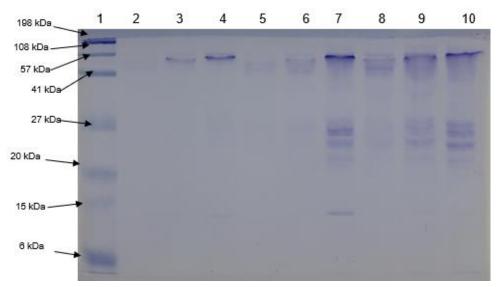


Figura 32. Proteína madura purificada por IMAC. Carril 1: marcador masa molecular; carriles 2, 5 y 8 muestran el "Flow-through" a las 24, 48 y 72 horas de inducción, respectivamente; carriles 3, 6 y 9 muestran la elución de la columna con 20 mM de imidazol a las 24, 48 y 72 horas de inducción; carriles 4, 7 y 10: eluciones con 300 mM de imidazol.

3.4. Cuantificación de proteínas

Se cuantificó la proteína en las fracciones solubles purificadas por IMAC, extraídas de Rosetta-gami B transformada y no transformada con el plásmido pLATE31-77338. Las muestras fueron eluídas con 10mM, 50mM, 100mM y 250Mm de imidazol. Los resultados indican una mayor concentración de proteínas en las cepas transformantes respecto a las no transformantes (Cuadro 4). De igual forma, en ambas fracciones, la concentración de proteínas disminuye conforme incrementa la concentración de imidazol, esto probablemente se debe a que son menos las proteínas que se disocian de la resina conforme aumenta la concentración de imidazol. Por otra parte, la concentración de proteínas en las fracciones solubles muestra una mayor concentración a las 72 horas de inducción tanto para la proteína madura como inmadura. No obstante, al recuperar las fracciones por IMAC la concentración disminuye hasta 10 veces en ambas muestras, posiblemente porque en las FS están inmersas proteínas endógenas, lo que cuenta al momento de realizar la cuantificación, en cambio, en las fracciones purificadas por IMAC

solo se eluyen las proteínas que se unieron a la resina, y se espera que la concentración sea menor al total de proteínas.

| Cuadro 4. Cuantificación de | proteínas | Proteína total |
|-----------------------------|--------------------------|---------------------|
| Sistema <i>E. coli</i> | | |
| Muestra | Concentración en [mg/ml] | Proteína total (mg) |
| 10- | 0.4464 | 4.464 |
| 50- | 0.2135 | 2.135 |
| 100- | 0.0800 | 0.8 |
| 250- | 0.0140 | 0.14 |
| 10+ | 1.6914 | 16.914 |
| 50+ | 1.3656 | 13.656 |
| 100+ | 0.7644 | 7.644 |
| 250+ | 0.0680 | 0.68 |
| Sistema P. pastoris | | |
| Muestra | Concentración en [mg/ml] | |
| M-24h20mM | 0.2670 | 2.67 |
| M-24h300mM | 0.1567 | 1.567 |
| M-48h20mM | 0.1062 | 1.062 |
| M-48h300mM | 0.0539 | 0.539 |
| M-72h20mM | 0.0729 | 0.729 |
| M-72h300mM | 0.0452 | 0.452 |
| M-96h20mM | 0.0678 | 0.678 |
| M-96h300mM | 0.0331 | 0.331 |
| I-24h20mM | 0.1108 | 1.108 |
| I-24h300mM | 0.0493 | 0.493 |
| I-48h20mM | 0.0528 | 0.528 |
| I-48h300mM | 0.0484 | 0.484 |
| I-72h20mM | 0.1614 | 1.614 |
| I-72h300mM | 0.1083 | 1.083 |
| I-96h20mM | 0.1004 | 1.004 |
| I-96h300mM | 0.0617 | 0.617 |

| FS-M 24h | 0.4732 | 4.732 |
|----------|--------|--------|
| FS-M 48h | 0.5805 | 5.805 |
| FS-M 72h | 0.8746 | 8.746 |
| FS-M 96h | 0.6283 | 6.283 |
| FS-I 24h | 0.7805 | 7.805 |
| FS-I 48h | 0.5 | 5 |
| FS-I 72h | 1.2061 | 12.061 |
| FS-I 96h | 0.8778 | 8.778 |

3.5. Ensayo de actividad en placas

3.5.1. En S. cerevisiae

La determinación de actividad lipolítica se realizó de acuerdo con Kouker y Jaeger (1986), usando como sustrato aceite de oliva y el colorante Rodamina B como indicador de actividad bajo UV. Se analizó la fracción soluble (Figura 33) y el medio de cultivo (Figura 34) tanto de la cepa transformada (LipC) y la no transformada. La actividad no se visualizó bajo las condiciones experimentales establecidas en las fracciones solubles de *S. cerevisiae* tanto transformada como no transformada inducida a las 24, 48, 72 y 96 horas. El medio de cultivo tampoco mostró actividad en la cepa transformante, así como la no transformante.



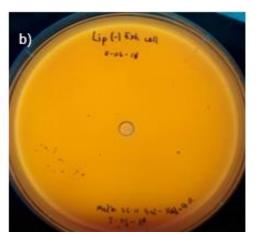
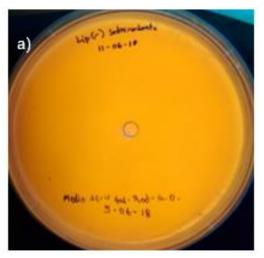


Figura 33. Ensayo de actividad lipolítica con las fracciones solubles de *S. cerevisiae*-pYESDEST52-LipC. a) Fracción soluble de la cepa transformada, b) fracción soluble de la cepa no transformada. Se utilizó aceite de oliva como sustrato y el colorante Rodamina como indicador de actividad lipasa.



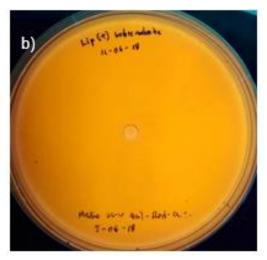


Figura 34. Ensayo de actividad lipolítica con el medio de cultivo de *S. cerevisiae*-pYESDEST52-LipC. Se utilizó aceite de oliva como sustrato y el colorante Rodamina como indicador de actividad lipasa.

Se analizaron las FS y fracciones purificadas por IMAC y los resultados fueron también negativos (datos no mostrados).

3.5.2. En *E. coli*

Se utilizó el método de placa para detectar la actividad lipolítica, ya sea con aceite de oliva o tributirina. Se usó la cepa Rosetta-gami transformada así como la no transformada (Figura 35). Como testigo positivo se usó el hongo *T. harzianum* y como testigo negativo, agua. Las placas contienen 1 mM de IPTG y se analizaron bajo luz UV a las 0, 24, 48 horas. En ningún caso se observó actividad lipolítica, excepto en el control positivo. Se observa que en ningún caso se forma el halo fluorescente que caracteriza la actividad lipolítica. De acuerdo con los resultados de los geles SDS-PAGE y los obtenidos en las placas Petri es probable que la proteína no se esté secretando.

De igual forma, las fracciones solubles recuperadas a diferentes tiempos de inducción fueron analizados por esta metodología (Kouker y Jaeger, 1986) y en la Figura 36 se muestran los resultados. Tampoco se observó el halo de fluorescencia para las fracciones solubles e insolubles tanto de la clona recombinante ni del testigo negativo. El ensayo se realizó también con las fracciones purificadas por IMAC dando los mismos resultados.

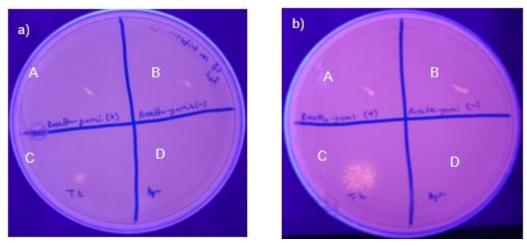


Figura 35. Ensayo de actividad lipolítica en placa con la clona Rosetta-gami. En la imagen a) se muestra una placa con tributirina y rodamina B. En la imagen b) una placa con aceite de oliva y rodamina B. En ambos casos A: Rosetta-gami inducida; B: Rosetta gami no inducida; C: *T. harzianum*; D: agua.

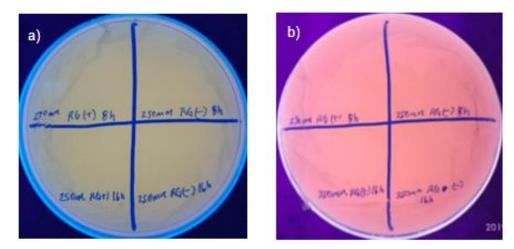


Figura 36. Ensayo de actividad lipolítica en placa con fracciones solubles de Rosetta-gami-pLATE31. En la imagen a) se muestra una placa con tributirina y rodamina B. En la imagen b) una placa con aceite de oliva y rodamina B.

Además, se realizaron ensayos usando tributirina como sustrato, esto para determinar si la proteína pudiera tener actividad de esterasa, pero los resultados fueron similares.

3.5.3. En P. pastoris

En las clonas de *P. pastoris* tampoco se logró ver actividad mediante la metodología de placas. Se usó aceite de oliva como sustrato y rodamina como colorante indicador de actividad (Figura 37).

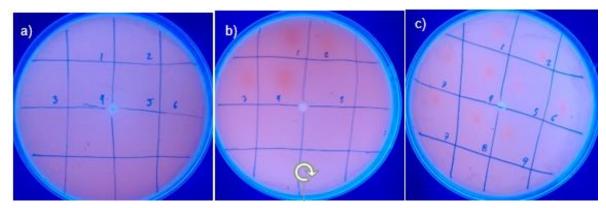


Figura 37. Ensayo de actividad lipolítica en placa con clonas de *P. pastoris*. En la imagen a) se muestran 6 clonas de pPICZB; en la imagen b) se muestran 4 clonas de pPICZB-M y en el c) se muestran 9 clonas de pPICZB-I.

3.6. Ensayo de actividad por espectrofotometría

Las fracciones proteicas de los tres sistemas fueron usadas para detección de actividad por espectrofotometría. El ensayo por espectrofotometría fue basado en Winkler y Stuckmann, 1979 y en el Cuadro 5 se muestran los resultados obtenidos en este estudio. Una unidad de actividad lipasa (U) fue definida como la cantidad de enzima que libera 1 µmol de pnitrofenilpalmitato por minuto (Liu *et al.* 2017). En todos los casos, el sustrato usado fue pnitrofenilpalmitato ya que es un ácido graso de cadena larga (16 carbonos), un sustrato comúnmente usado para escrutinio de lipasas verdaderas.

Para el sistema *S. cerevisiae* las fracciones solubles (FS) de las cepas transformada y no tranformada, así como sus medios de cultivo no presentaron actividad lipolítica. También se analizaron las fracciones purificadas por IMAC, sin embargo, los resultados fueron similares. No obstante, las muestras de las fracciones insolubles tanto de la transformada como no transformada presentaron actividad, pero con esta evidencia, no es posible saber

si se deba a la lipasa recombinante o sea posiblemente a actividad lipasa endógena, ya que los valores son similares en ambas cepas.

Por otra parte, ninguna de las fracciones proteicas obtenidas con el sistema *E. coli* mostró actividad lipolítica, tanto en las fracciones solubles, insolubles, medio de cultivo y purificadas por IMAC. Esto probablemente debido a que al ser un sistema procariota no cuente con la maquinaria necesaria para producir una enzima eucariótica activa.

| Cuadro 5. E | insayo de actividad por espe | | | |
|------------------|------------------------------|---------------------|-------------------|----------------------|
| Sistema | Muestra | Absorbancia a 410nm | Actividad (U/μΙ)* | Actividad específica |
| S. cerevisiae | Fracción soluble 36 h (+) | -0-023 | ND | ND |
| | Fracción soluble 72 h (+) | -0.007 | ND | ND |
| | Fracción insoluble 36 h (+) | 1.717 | 7.63 | ND |
| | Fracción insoluble 72 h (+) | 1.838 | 8.16 | ND |
| | Medio cultivo 36 h (+) | -0.021 | ND | ND |
| | Medio cultivo 72 h (+) | -0.070 | ND | ND |
| | Fracción soluble 36 h (-) | -0.015 | ND | ND |
| | Fracción soluble 72 h (-) | -0.009 | ND | ND |
| | Fracción insoluble 36 h (-) | 1.639 | 7.28 | ND |
| | Fracción insoluble 72 h (-) | 1.896 | 8.42 | ND |
| | Medio cultivo 36 h (-) | -0.012 | ND | ND |
| | Medio cultivo 72 h (-) | -0.010 | ND | ND |
| E. coli | Fracción soluble 16 h (+) | -0.054 | ND | ND |
| | Fracción soluble 16 h (-) | -0.097 | ND | ND |
| | 0 mM (+) | -0.063 | ND | ND |
| | 10 mM (+) | -0.089 | ND | ND |

| | 50 mM (+) | -0.106 | ND | ND |
|-------------|-------------------------------------|--------|-------|------|
| | 100 mM (+) | -0.111 | ND | ND |
| | 250 mM (+) | -0.110 | ND | ND |
| | M.C. 8 h (+) | -0.333 | ND | ND |
| | M.C. (+) | -0.028 | ND | ND |
| | M.C. (-) | -0.002 | ND | ND |
| P. pastoris | Fracción soluble 24h-M | 0.892 | 3.96 | 0.84 |
| | Fracción soluble 48h-M | 1.539 | 6.84 | 1.17 |
| | Fracción soluble 72h-M | 3.214 | 14.28 | 1.64 |
| | Fracción soluble 96h-M | 3.214 | 14.28 | 2.3 |
| | Fracción soluble 24h-l | 0.705 | 3.13 | 0.62 |
| | Fracción soluble 48h-l | 3.214 | 14.28 | 1.83 |
| | Fracción soluble 72h-l | 3.214 | 14.28 | 1.19 |
| | Fracción soluble 96h-l | 2.458 | 10.92 | 1.25 |
| | Fracción purificada 24h- 20mM-M | 0.263 | 0.98 | 0.37 |
| | Fracción purificada 24h- 300mM-M | 0.221 | 0.70 | 0.46 |
| | Fracción purificada 48h- 20mM-M | 0.2 | 1.04 | 0.98 |
| | Fracción purificada 48h- 300mM-M | 0.103 | 0.51 | 0.09 |
| | Fracción purificada 72h- 20mM-M | 0.417 | 1.86 | 0.25 |
| | Fracción purificada 72h- 300mM-M | 0.260 | 1.15 | 0.25 |

| | Fracción 20mM-M | purificada | 96h- | 0.242 | 1.07 | 0.15 |
|--|---------------------|------------|------|-------|------|------|
| | Fracción 300mM-M | purificada | 96h- | 0.244 | 1.08 | 0.32 |
| | Fracción 20mM-l | purificada | 24h- | 0.094 | 0.41 | 0.37 |
| | Fracción 300mM-l | purificada | 24h- | 0.132 | 0.58 | 0.11 |
| | Fracción 20mM-l | purificada | 48h- | 0.219 | 0.97 | 0.18 |
| | Fracción 300mM-I | purificada | 48h- | 0.379 | 1.68 | 0.35 |
| | Fracción 20mM-l | purificada | 72h- | 0.309 | 1.37 | 0.85 |
| | Fracción 300mM-I | purificada | 72h- | 0.417 | 1.85 | 0.18 |
| | Fracción 20mM-l | purificada | 96h- | 0.094 | 0.41 | 0.4 |
| | Fracción 300mM-l | purificada | 96h- | 0.108 | 0.48 | 0.07 |

^{*} U, Una unidad es definida como 1 μmol de p-nitrofenilpalmitato hidrolizado por minuto. ND, No calculado.

En el sistema recombinante de *P. pastoris* se obtuvo actividad, tanto en la fracción soluble como en la purificada por IMAC, lo que no se observó para el testigo negativo (cepa transformada con vector vacío). La Figura 38 corresponde a un ensayo cualitativo para observar el desarrollo de coloración que se da por la hidrólisis del p-nitrofenilpalmitato.

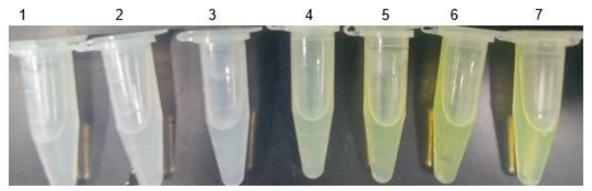


Figura 38. Ensayo de actividad lipolítica con las FS de *P. pastoris*-PICZB-M. Tubo 1: Sustrato y agua; tubo 2: sustrato y amortiguador; tubo 3: sustrato y FS de transformante con vector vacío; tubos 4-7: sustrato y FS de transformante con proteína madura a las 24, 48, 72 y 96 horas de inducción. El sustrato usado fue p-nitrofenilpalmitato. En cada caso se adicionaron volúmenes iguales de muestra (100 μl).

Las fracciones solubles de las cepas recombinantes *P. pastoris*-PICZB-M y *P. pastoris*-PICZB-I mostraron actividad lipolítica Para corroborar que la actividad lipolítica era de la proteína recombinante, se usó como testigo negativo la fracción soluble de la cepa transformada con el vector vacío y el amortiguador donde se resuspendió la enzima, cada uno por triplicado. Estas fracciones no presentaron absorbancia a 410nm, por lo tanto, no tienen actividad lipolítica.

Las fracciones solubles de las cepas recombinantes mostraron una actividad máxima de $14.28~\text{U/}\,\mu\text{I}$, siendo las 48 horas el tiempo óptimo de inducción para la lipasa inmadura y 72 horas para la lipasa madura (Figura 39). A las 24 horas de inducción, la clona que expresa la lipasa madura tenía una actividad de 3.9 $\text{U/}\mu\text{I}$, mientras que la que expresa la lipasa inmadura tenía 3.1 $\text{U/}\mu\text{I}$.

Las fracciones que presentaron actividad se sometieron a IMAC para purificar la lipasa. Las fracciones recuperadas (proteína purificada) fueron analizadas para actividad lipolítica usando el ensayo colorimétrico con p-nitrofenilpalmitato como sustrato (Figura 40). Se analizaron las fracciones recuperadas a las 24, 48, 72 y 96 horas de inducción eluídas con 20 y 300 mM de imidazol. Todas las fracciones purificadas mostraron actividad lipolítica usando p-nitrofenilpalmitato como sustrato, por el contrario, los testigos negativos (fracción de cepa transformada con el vector vacío y amortiguador) no mostraron actividad, lo que

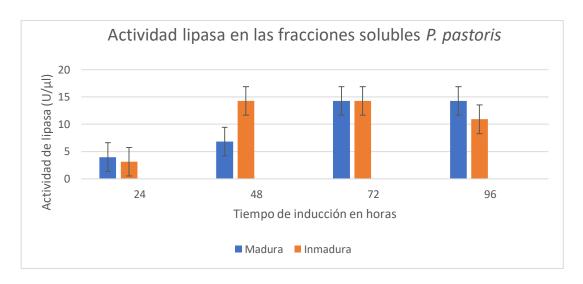


Figura 39. Actividad lipasa en las FS de *P. pastoris-*PICZB-M y *P. pastoris-*PICZB-I. Como sustrato se usó p-nitrofenilpalmitato.

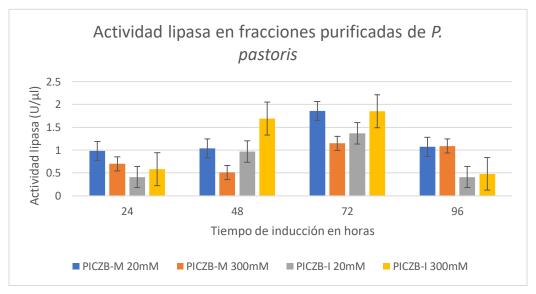


Figura 40. Cuantificación de la actividad de lipasa en las fracciones purificadas de la proteína recombinante en *P. pastoris*. Se usó como sustrato p-nitrofenilpalmitato.

indica que es muy probable que el cambio de absorbancia es debido a la lipasa recombinante. La proteína madura e inmadura purificadas mostraron mayor actividad a las 72 horas de inducción, con 1.86 U/ μ l y 1.87 U/ μ l, respectivamente, lo que corresponde a una séptima parte de la actividad de la fracción soluble de ambas formas de la proteína (14.2 U/ μ l). Esta disminución de actividad en las fracciones purificadas posiblemente se

deba a que la proteína se pierde con los lavados, que se vea disminuida por el uso de imidazol para las eluciones, o que no se pega toda a la resina. Una vez obtenida la lipasa pura, se procedió a su caracterización, tanto en su forma madura como inmadura, evaluando los parámetros fisicoquímicos de temperatura, pH y preferencia de sustratos (Figura 41). Se usaron las muestras de 72 horas de inducción para ambas formas de la proteína, ya que fueron las que tuvieron mayor actividad. La proteína madura se eluyó con 20 mM de imidazol y la inmadura con 300 mM de imidazol. En cuanto a temperatura, tanto la forma madura como inmadura de la lipasa mostraron mayor actividad a 60°C, la cual disminuye conforme baja la temperatura.

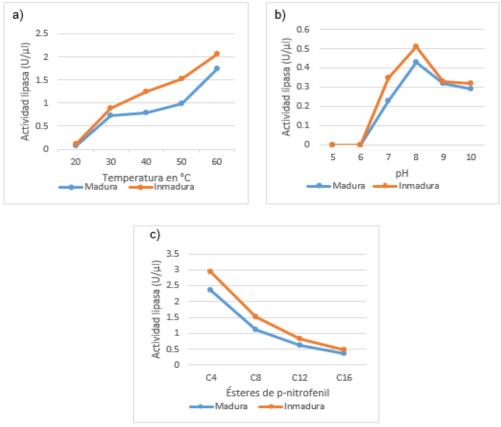


Figura 41. Caracterización de la lipasa recombinante de *T. harzianum*. Se usó como sustrato p-nitrofenilpalmitato. a) Evaluación de temperatura óptima para la lipasa purificada tanto en su forma madura como inmadura, b) determinación de pH óptimo para ambas formas de lipasa, c) evaluación de sustrato preferido usando ésteres de p-nitrofenil de cuatro (C4), ocho (C8), doce (C12) y dieciséis (C16) átomos de carbono.

No se puede asegurar que esta sea la temperatura óptima ya que no se analizaron temperaturas mayores. Respecto al pH óptimo, ambas formas mostraron mayor actividad entre pH 8 y 10, siendo pH 8 en el que mostraron mayor actividad. A pH 5 y 6 la enzima no mostró actividad. La preferencia de sustratos se evaluó con ésteres de p-nitrofenil de diferentes longitudes: cuatro carbonos (C4), ocho carbonos (C8), doce carbonos (C12) y dieciséis carbonos (C16). Ambas formas de la proteína mostraron mayor actividad hacia ésteres de cadena corta, mostrando mayor actividad contra p-nitrofenilbutirato (C4) con una actividad máxima de 2.37 U/μl para la lipasa madura y 2.95 U/μl para la inmadura. Ambas formas mostraron menor actividad hacia p-nitrofenilpalmitato, con una actividad de 0.37 U/μl para la forma madura y 0.48 U/μl para la inmadura. La preferencia por los ésteres de cadena corta es típico de las esterasas, lo que posiblemente indique que la proteína se trate de una esterasa. Si bien las esterasas no tienen actividad sobre triacilgliceroles de cadena larga, esta proteína tuvo actividad en p-nitrofenilésteres de cadena larga, algo que es característico de las lipasas. Además, la enzima fue activa hasta con 300 mM de imidazol lo cual es atractivo para evaluar solventes no acuosos en síntesis orgánica.

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN

La expresión heteróloga de proteínas es un tema que se puede complicar si no se conoce la naturaleza del producto de interés, de lo cual depende la elección de un sistema de expresión adecuado. En este trabajo, se han usado tres sistemas para expresión heteróloga de una lipasa (77338) del hongo T. harzianum, la cual, de acuerdo a los antecedentes de la literatura y estudios bioinformáticos, predice ser una triacilglicerol lipasa clase 3, a la que pertenecen la familia de lipasas verdaderas. Debido a que la lipasa 77338 es de origen eucariota, se decidió primero usar la levadura Saccharomyces cerevisiae como sistema de expresión heteróloga. Se clonó la región codificante de la lipasa en el vector de expresión pYESDEST52 y éste se usó para transformar S. cerevisiae, pero no se obtuvo la proteína cuando los extractos proteicos se analizaron mediante SDS-PAGE ni se obtuvo actividad. Posiblemente esto se debe a la presencia de múltiples cisteínas (10 en total, que representan el 2.47 % de aminoácidos) en la proteína, ya que el plegamiento de proteínas con altos porcentajes de cisteínas necesita un ambiente oxidante para permitir la formación de puentes disulfuro (Mursula et al., 2006; Sato y Inaba, 2012). Otro factor que se puede considerar es el grado de glicosilación que la lipasa necesita para estar en una forma activa, ya que hay estudios que demuestran que S. cerevisiae tiende a hiperglicosilar las proteínas recombinantes (Darby et al., 2012; Anh-Minh et al., 2017). La hiperglicosilación también puede alterar el peso molecular y provocar que la proteína sea de mayor tamaño al esperado (Unal et al., 2008). Por tal motivo, se decidió evaluar otro sistema de expresión, la E. coli Rosetta-gami para sobre-expresar la lipasa. Esta cepa está modificada genéticamente para sobreexpresar proteínas eucarióticas y además posee un ambiente oxidante para el correcto plegamiento de proteínas ricas en cisteínas (Fathi-Roudsari et al., 2016). Por lo tanto, se procedió a clonar el gen de la lipasa 77338 en el vector de expresión bacteriano pLATE31; dando como resultado el plásmido denominado pLATE31-77338, el cual se usó para transformar Rosetta-gami. Al igual que el sistema de S. cerevisiae, al analizar los extractos proteicos mediante SDS-PAGE, aparentemente no se encontró la proteína de interés; esto se puede deber a que la proteína se pliegue mal y se fuese en la fracción insoluble (cuerpos de inclusión) o se degrade. Es importante resaltar que aún en resultados exitosos de detección de actividad, muchas veces es difícil visualizar las proteínas expresadas en los extractos totales analizados por SDS-PAGE. En el reporte de

Ansarypour y Shahpiri (2017) por ejemplo, la proteína que expresan, una metalotionina de arroz denominada OsMT1-1b, no se distingue cuando los perfiles proteicos de los extractos son teñidos para proteína total; en ese reporte todos los perfiles proteicos fueron complejos y similares entre sí. Sin embargo, el análisis por Western blot reveló la proteína de interés en un par de extractos y en el carril de la proteína pura. Eso indica que algunas veces la proteína puede estar siendo expresada pero su concentración no es tan alta para distinguirse entre las proteínas endógenas de la cepa hospedera. Sin embargo, se esperaría que en al menos una de las fracciones eluidas de la columna de níquel se lograra ver alguna proteína enriquecida, y en este caso todos los perfiles fueron similares entre sí, y similares a los extractos de proteína total. Una posibilidad es que la lipasa no se distinga en las fracciones eluídas porque se haya usado una concentración inicial alta (50mM) de imidazol, y esto provoque que las proteínas contaminantes que son capaces de unirse a la columna se despeguen al mismo tiempo que la lipasa y generen el perfil complejo que se observa. Muñoz-Pérez (2018), usando este sistema para expresar la proteína Avr4 del hongo filamentoso ascomiceto Pseudocercospora fijiensis, reportó que la elución debe iniciarse con una concentración más baja (por ejemplo, 10mM) para despegar las proteínas contaminantes y eso permita observar la proteína de interés en un eluato menos complejo. Se evaluó la expresión de la proteína 77338 en un tercer sistema de expresión, la levadura Pichia pastoris, ampliamente usada para expresar lipasas de fuentes bacterianas y de hongos filamentosos (Valero 2012; Jallouli et al., 2017).

La secreción de proteínas recombinantes es usualmente dirigida por un péptido señal de secreción en el extremo amino terminal. Los péptidos señal pueden diferir ampliamente en su eficiencia para secretar proteínas recombinantes, por tanto, es necesario identificar múltiples señales de secreción disponibles y encontrar la señal de secreción óptima para una proteína (Liang *et al.*, 2013). El péptido señal y los segmentos transmembranales están involucrados en el transporte de proteínas desde su sitio de síntesis, mayormente el citoplasma, a otros destinos ya sea dentro o fuera de la célula (Masomian *et al.*, 2017). Los péptidos señal de diferentes proteínas u organismos tienen secuencias distintas, sin embargo, todas consisten de tres regiones distintivas; aminoácidos básicos en la región amino terminal, seguido por una región hidrofóbica en medio y aminoácidos polares en la región carboxilo terminal (Masomian *et al.*, 2017).

En este sistema, se evaluaron dos versiones de la proteína 77338, la forma madura y la forma inmadura, con el objetivo de determinar la funcionalidad del péptido señal descrito in silico y de esta forma tener un proceso de purificación más fácil y rápido. Sin embargo, los resultados de los geles SDS-PAGE no muestran enriquecimiento claro de alguna proteína en las FS de la forma madura ó inmadura porque la cantidad de proteína total analizada fue baja, pero ambas presentaron actividad lipasa cuando se evaluó por espectrofotometría. Esto sugiere que la actividad específica de la lipasa expresada es alta, ya que se detecta actividad aunque no se logra observar la proteína. Para la enzima madura la máxima actividad lipasa se dio a las 72 horas de inducción, mientras que para la enzima inmadura se indujo a las 48 horas de inducción y se mantuvo a las 72h, siendo que en este momento coinciden ambas en sus puntos máximos de actividad detectada. Es curioso que, aunque se empleó el mismo vector y se expresó la misma proteína, la cinética de inducción de ambos constructos fue diferente (Figura 38), sugiriendo que la presencia del péptido señal afecta de alguna manera la expresión. Recientemente Poborilova et al. (2020) publicaron la expresión transitoria en tabaco de las proteínas verde fluorescente (GFP, por sus siglas en inglés) y roja fluorescente (RFP, por sus siglas en inglés) con el mismo vector pGB-R, observándose mejor expresión de la GFP, aunque estos autores no discutieron ese punto, sino que compararon sus resultados con la expresión con otros sistemas y vectores, argumentando que sus rendimientos fueron similares a los de otros trabajos. Muchos factores que afectan la expresión de proteínas aun no son entendidos, pero es posible que esa pequeña diferencia de tamaño o la secuencia primaria en sí del péptido señal afecte la eficiencia y cinética de expresión de la proteína. Curiosamente, se observa aparentemente un poco más de actividad en las muestras en las que la proteína fue expresada de manera inmadura (con el péptido señal). Esto sugiere que la actividad específica de la proteína que se expresó de manera inmadura sea más alta, a pesar de que se hubiera expresado menos o recuperada menos proteína (Figura 30). Los experimentos realizados no permiten afirmar si el péptido señal permanece o ha sido eliminado por la levadura durante la expresión y maduración in vivo de la enzima, pero es posible que la mayor actividad que se observa en la proteína inmadura sea por un mejor plegamiento de ésta dentro de la célula, o porque el bolsillo catalítico de la enzima queda más protegido y conserva más actividad residual.

La caracterización bioquímica mostró que ambas formas de la enzima son similares en cuanto al efecto de la temperatura, pH y preferencia por sustrato. La preferencia por triglicéridos con ácidos grasos de cadena corta encontrado en el presente trabajo (C4> C8> C12> C16) sugiere que la proteína 77338 es una esterasa, y contrasta con la predicción de Canseco-Pérez et al. (2018) de que sea una lipasa verdadera. Curiosamente, en el reporte de Canseco-Pérez et al. (2018), la proteína 77338 se agrupa en el clado de LipA de Acremonium alcalophilum, una proteína con actividad lipasa/acetil-xilan esterasa que trabaja sobre ésteres de p-nitrofenil de cadena larga y xilanos. Consistente con ambas predicciones (lipasa en una predicción y esterasa en la otra), y los resultados obtenidos, posiblemente la proteína 77338 sea una lipasa/esterasa, ya que su actividad sobre pnitrofenol-C16 es menor que con otros ácidos grasos más cortos, pero no es nula. Las enzimas duales lipasas/esterasas no son muy comunes, pero ha habido otros reportes, como la de una lipasa/esterasa en Bacillus sp., la cual actúa tanto sobre tri-butirina como sobre ésteres de ácido oleico, y es capaz de producir biodiesel (Kumar et al., 2012). Por lo tanto, la preferencia por sustratos de cadena corta de la enzima 77338 no descarta su posible uso en la transesterificación de triglicéridos en biodiesel. Un punto interesante observado en la purificación y caracterización de la proteína 77338 es que es capaz de trabajar en presencia de imidazol, incluso a 300mM; esto es interesante porque el imidazol suele inhibir las actividades enzimáticas (Li y Byers, 1989; Okuda y Fujii, 1972; Shinitzky et al., 1966). La tolerancia al imidazol sugiere que esta enzima tenga potencial para síntesis orgánicas.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Para la proteína 77338 los sistemas de expresión heteróloga *S. cerevisiae* y *E. coli* no fueron adecuados. El sistema *P. pastoris* produjo la enzima activa en su forma tanto madura como inmadura. La proteína purificada mostró actividad lipolítica, con mejor actividad a 60°C, pH 8 y con mayor actividad hacia ésteres de cadena corta.

Los análisis bioinformáticos y de preferencia de sustratos *in vitro* sugieren que la proteína 77338 tiene una actividad dual de lipasa/esterasa, ya que mostró mejor actividad sobre p-nitrofenol-C4 pero también posee actividad sobre p-nitrofenol-C16.

La proteína 77338 es activa aún en presencia de 300mM de imidazol y entre las temperaturas evaluadas, su actividad fue mayor a 60°C, lo que la hace atractiva para explorar su potencial uso industrial en la producción de biodiesel y síntesis química.

BIBLIOGRAFÍA

- Akatsuka, H., Kawai, E., Omori, K., & Shibatani, T. (1995). The three genes *lipB*, *lipC*, and *lipD* involved in the extracellular secretion of the *Serratia marcescens* lipase which lacks an N-terminal signal peptide. *Journal of Bacteriology*, *177*(22), 6381–6389. https://doi.org/10.1128/JB.177.22.6381-6389.1995
- Andualema, B., & Gessesse, A. (2012). Microbial lipases and their industrial applications: Review. *Biotechnology*, 11, 100–118. https://doi.org/10.3923/biotech.2012.100.118
- Ansarypour, Z., & Shahpiri, A. (2017). Heterologous expression of a rice metallothionein isoform (OsMTI-1b) in *Saccharomyces cerevisiae* enhances cadmium, hydrogen peroxide and ethanol tolerance. *Brazilian Journal of Microbiology*, 48(3), 537–543. https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.024
- Arpigny, J. L., & Jaeger, K. E. (1999). Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *The Biochemical Journal*, 343 Pt 1(Pt 1), 177–183
- Aravindan, R., Anbumathi, P. & Viruthagiri, T. (2007). Lipase applications in food industry. Indian Journal of Biotechnology 6, 141-158
- Borrelli, G. M., & Trono, D. (2015). Recombinant lipases and phospholipases and their use as biocatalysts for industrial applications. *International Journal of Molecular Sciences*, *16*(9), 20774–20840. https://doi.org/10.3390/ijms160920774
- Canseco-Pérez M, Castillo-Ávila M., Chi-Manzanero B., Islas-Flores I., Apolinar M., Rivera G., Gamboa M., Sánchez F., C. B. (2018). Fungal screening on olive oil for extracellular triacylglycerol lipases: selection of a *Trichoderma harzianum* strain and genome wide search for the genes. *Genes*, *9*, *62*, 24. https://doi.org/10.3390/genes9020062
- Casas-Godoy, L., Duquesne, S., Bordes, F., Sandoval, G., & Marty, A. (2012). Lipases: an overview. Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.), 861, 3–30. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-600-5 1
- Cen, Y., Singh, W., Arkin, M., Moody, T. S., Huang, M., Zhou, J., Wu, Q., & Reetz, M. T. (2019). Artificial cysteine-lipases with high activity and altered catalytic mechanism

- created by laboratory evolution. Nature Communications, 10(1), 3198. https://doi.org/10.1038/s41467-019-11155-3
- Choo, D. W., Kurihara, T., Suzuki, T., Soda, K., & Esaki, N. (1998). A cold-adapted lipase of an Alaskan psychrotroph, *Pseudomonas* sp. strain B11-1: gene cloning and enzyme purification and characterization. *Applied and Environmental Microbiology*, *64*(2), 486–491
- Darby, R. A., Cartwright, S. P., Dilworth, M. V., & Bill, R. M. (2012). Which yeast species shall I choose? Saccharomyces cerevisiae versus Pichia pastoris (review). Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.), 866, 11–23. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-770-5
- Ernst, O., & Zor, T. (2010). Linearization of the bradford protein assay. *Journal of Visualized Experiments*: JoVE, (38), 1918. https://doi.org/10.3791/1918
- Fathi-Roudsari M, Akhavian-Tehrani A, Maghsoudi N (2016). Comparison of Three *Escherichia coli* Strains in Recombinant Production of Reteplase. Avicenna J *Med Biotechnol.* 8(1),16–22.
- Ferrè, F. & Clote, P. (2006). DiANNA 1.1: an extension of the DiANNA web server for ternary cysteine classification. *Nucleic Acids Res.* 34(Web Server issue):W182-W185. doi:10.1093/nar/gkl189
- Gong, J. S., Li, H., Zhu, X. Y., Lu, Z. M., Wu, Y., Shi, J. S., & Xu, Z. H. (2012). Fungal Histagged nitrilase from *Gibberella intermedia*: gene cloning, heterologous expression and biochemical properties. *PloS One*, 7(11), e50622. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050622
- Gopinath, S. C. B., Anbu, P., & Hilda, A. (2005). Extracellular enzymatic activity profiles in fungi isolated from oil-rich environments. *Mycoscience*, *46*(2), 119–126. https://doi.org/10.1007/S10267-004-0221-9
- Gupta, G.N., Srivastava, S., Khare, S.K. Prakash V. (2014). Extremophiles: An Overview of Microorganism from Extreme Environment. International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology 7(2), 371-380

- Hasan, F., Shah, A. A., & Hameed, A. (2006). Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(2), 235–251. https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.10.016
- Hasan, F., Shah, A. A., & Hameed, A. (2009). Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. *Biotechnology Advances*, 27(6), 782–798. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.06.001
- Houde, A., Kademi, A., & Leblanc, D. (2004). Lipases and their industrial applications: an overview. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 118(1-3), 155–170. https://doi.org/10.1385/abab:118:1-3:155
- Jaeger, K.E. & Egger, T. (2002). Lipases for biotechnology Jaeger and Eggert 391. *Curr Opin Biotechnol*, *13*(7), 390–397.
- Jaeger, K.E., Dijkstra, B.W. & Reetz, M.T (1999). Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annu Rev Microbiol* 53, 315-351. doi:10.1146/annurev.micro.53.1.315
- Jallouli, R., Parsiegla, G., Carrière, F., Gargouri, Y., & Bezzine, S. (2017). Efficient heterologous expression of *Fusarium solani* lipase, FSL2, in *Pichia pastoris*, functional characterization of the recombinant enzyme and molecular modeling. *International Journal of Biological Macromolecules*, 94(Pt A), 61–71 https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.09.030
- Javed, S., Azeem, F., Hussain, S., Rasul, I., Siddique, M. H., Riaz, M., Afzal, M., Kouser, A., & Nadeem, H. (2018). Bacterial lipases: A review on purification and characterization. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 132, 23–34. https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2017.07.014
- Jiao, L., Zhou, Q., Su, Z., Xu, L., & Yan, Y. (2018). High-level extracellular production of Rhizopus oryzae lipase in Pichia pastoris via a strategy combining optimization of genecopy number with co-expression of ERAD-related proteins. Protein Expression and Purification, 147, 1–12. https://doi.org/10.1016/j.pep.2018.02.005
- Khan, F. I., Lan, D., Durrani, R., Huan, W., Zhao, Z., & Wang, Y. (2017). The Lid Domain in

- Lipases: Structural and Functional Determinant of Enzymatic Properties. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 5(March), 1–13. https://doi.org/10.3389/fbioe.2017.00016
- Kouker, G., & Jaeger, K. (1987). Specific and Sensitive Plate Assay for Bacterial Lipases. Applied and Environmental Microbiology, 53(1), 211–213.
- Kumar, D., Kumar, L., Nagar .S., Raina, C., Parshad, R. & Gupta, V.K. (2012). Isolation, production and application of lipase/esterase from *Bacillus* sp. strain DVL43. *J. Microbiol. Biotech. Res.* 2 (4):521-528.
- Li, Y.K. & Byers, L.D. (1989). Inhibition of beta-glucosidase by imidazoles. *Biochim Biophys Acta*. 999(3):227–232. doi:10.1016/0167-4838(89)90001-0
- Liang, S., Li, C., Ye, Y., & Lin, Y. (2013). Endogenous signal peptides efficiently mediate the secretion of recombinant proteins in *Pichia pastoris*. *Biotechnology Letters*, *35*(1), 97–105. https://doi.org/10.1007/s10529-012-1055-8
- Liu, W., Li, M., & Yan, Y. (2017). Heterologous expression and characterization of a new lipase from *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 and used for biodiesel production. *Scientific reports*, 7(1), 15711. https://doi.org/10.1038/s41598-017-16036-7
- Looser, V., Bruhlmann, B., Bumbak, F., Stenger, C., Costa, M., Camattari, A., Fotiadis, D., & Kovar, K. (2015). Cultivation strategies to enhance productivity of *Pichia pastoris*: A review. *Biotechnology Advances*, 33(6 Pt 2), 1177–1193. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.05.008
- Lotti, M. & Alberghina, L. (2007). Lipases: Molecular Structure and Function. In: Polaina J., MacCabe A.P. (eds) *Industrial Enzymes*. Springer, Dordrecht
- Masomian, M., Jasni, A. S., Rahman, R. N. Z. R. A., Salleh, A. B., & Basri, M. (2017). Impact of signal peptide and transmembrane segments on expression and biochemical properties of a lipase from *Bacillus sphaericus* 205y. *Journal of Biotechnology*, 264(October), 51–62. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.10.01
- Morka, K., Pietruszka, J., & Meyer Zu Berstenhorst, S. (2014). Comparative expression of

- lipase CAL-A in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* and Hansenula polymorpha to investigate a possible host influence. *Journal of Biotechnology*, 191, 176–186. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.08.023
- Muñoz-Pérez, G.A. (2018). Expresión heteróloga de laproteína PfAvr4 de Pseudocercospora fijiensis y análisis de su efecto in planta. Tesis de Maestría, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Mérida, Yucatán, México, 121 pp.
- Mursula, A., Liebal, U. & Neubauer, P. (2006). Production of cysteine-rich proteins in *E. coli* the challenge of Wnts. *Microb Cell Fact* 5, P21. https://doi.org/10.1186/1475-2859-5-S1-P21
- Nwuche, C.O. & Ogbonna, JC. (2011). Isolation of lipase producing fungi from palm oil mill effluent (POME) dump sites at Nsukka. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 54(1), 113–116.
- Okuda, H. & Fujii, S. (1972). Effect of imidazole on adipose tissue lipase. *J Biochem.* 71(1):151–152. doi:10.1093/oxfordjournals.jbchem.a129736
- Pleiss, J., Fischer, M., Peiker, M., Thiele, C., & Schmid, R. D. (2000). Lipase engineering database: Understanding and exploiting sequence-structure-function relationships. *Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic*, 10(5), 491–508. https://doi.org/10.1016/S1381-1177(00)00092-8
- Poborilova, Z., Plchova, H. Cerovska ,N., Gunter, C.J., Hitzeroth, I.I., Rybicki, E.P. & Moravec, T (2020). Transient protein expression in tobacco BY-2 plant cell packs using single and multi-cassette replicating vectors. *Plant Cell Rep.* https://doi.org/10.1007/s00299-020-02544-w
- Ramakrishnan, V., Goveas, L. C., Narayan, B., & Halami, P. M. (2012). Comparison of lipase production by *Enterococcus faecium* MTCC 5695 and *Pediococcus acidilactici* MTCC 11361 using fish waste as substrate: optimization of culture conditions by response surface methodology. *ISRN Biotechnology*, 2013, 980562. https://doi.org/10.5402/2013/980562
- Sato, Y. & Inaba, K. (2012). Disulfide bond formation network in the three biological

- kingdoms, bacteria, fungi and mammals. FEBS J. 279, 2262-2271.
- Shinitzky, M., Katchalski, E., Grisaro, V. & Sharon, N. (1966). Inhibition of lysozyme by imidazole and indole derivatives. *Arch Biochem Biophys*. 116(1):332–343. doi:10.1016/0003-9861(66)90039-7
- Shirazi, S. H., Rahman, S. R., & Rahman, M. M. (1998). Short communication: Production of extracellular lipases by *Saccharomyces cerevisiae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *14*(4), 595–597. https://doi.org/10.1023/A:1008868905587
- Singh, A. K., & Mukhopadhyay, M. (2012). Overview of fungal lipase: A review. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *166*(2), 486–520. https://doi.org/10.1007/s12010-011-9444-3
- Somma-Delpéro, C., Valette, A., Lepetit-Thévenin, J., Nobili, O., Boyer, J., & Vérine, A. (1995). Purification and properties of a monoacylglycerol lipase in human erythrocytes. *The Biochemical Journal*, *312* (Pt 2), 519–525. https://doi.org/10.1042/bj3120519
- Tran, A. M., Nguyen, T. T., Nguyen, C. T., Huynh-Thi, X. M., Nguyen, C. T., Trinh, M. T., Tran, L. T., Cartwright, S. P., Bill, R. M., & Tran-Van, H. (2017). *Pichia pastoris* versus *Saccharomyces cerevisiae*: a case study on the recombinant production of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *BMC Research Notes*, 10(1), 148. https://doi.org/10.1186/s13104-017-2471-6
- Ülker, S., Özel, A., Çolak, A., & Karaoğlu, Ş. A. (2011). Isolation, production, and characterization of an extracellular lipase from T*richoderma harzianum* isolated from soil. *Turk J Biol*, *35*, 543–550. https://doi.org/10.3906/biy-1004-107
- Unal, E. S., Zhao, R., Qiu, A., & Goldman, I. D. (2008). N-linked glycosylation and its impact on the electrophoretic mobility and function of the human proton-coupled folate transporter (HsPCFT). *Biochimica et Biophysica Acta*, 1778(6), 1407–1414. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.03.009
- Valero F. (2012). Heterologous expression systems for lipases: a review. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 861, 161–178. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-

- Villela Pacheco, S. M., Cruz Júnior, A., Ferreira-Morgado, A., Furigo Junior, A., Chioma Amadi, O., Guisan, J. M. & Pessela, B.C. (2015). Isolation and screening of filamentous fungi producing extracellular lipase with potential in biodiesel production. *Advances in Enzyme Research*, 3, 101–114
- Walker, J. M. (2012). *Methods in Molecular Biology* ™ *Series Editor* (Gerorgina; S. Georgina, Ed.).
- Yedahalli, S. S., Rehmann, L., & Bassi, A. (2016). Expression of exo-inulinase gene from *Aspergillus niger* 12 in *E. coli* strain Rosetta-gami B (DE3) and its characterization. *Biotechnology Progress*, 32(3), 629–637. https://doi.org/10.1002/btpr.2238
- Winkler, U.K., & Stuckmann, M. (1979). Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. *Journal of Bacteriology*, 138(3), 663–670