

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

CARACTERIZACIÓN DE UNA LIPASA DE *TRICHODERMA*
HARZIANUM CON PENTAPÉPTIDO AHSMG

Tesis que presenta

DENISE ESTHER GUTIÉRREZ DOMÍNGUEZ

En opción al título de

DOCTOR EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: BIOTECNOLOGÍA)

Mérida, Yucatán, México

2023

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

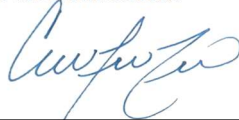


RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de **Denise Esther Gutiérrez Domínguez** titulado **Caracterización de una lipasa de *Trichoderma harzianum* con pentapéptido AHSMG**, fue realizado en la Unidad de Biotecnología y en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, en la línea Agrobiotecnología, en el laboratorio de biotecnología microbiana y en el laboratorio 006, del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección de la **Dra. Blondy Beatriz Canto Canché** y codirección del **Dr. Ignacio Rodrigo Islas Flores**, dentro de la opción de **Biotecnología**, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Esta tesis tiene orientación al desarrollo socioeconómico de la región ya que las lipasas son potenciales herramientas de diagnóstico para enfermedades, y también para generar biodiesel.

Atentamente



Dra. Cecilia Hernández Zepeda
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 8 de junio de 2023.

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de investigación 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 registrarán 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: _____

Nombre: Denise Esther Gutiérrez Domínguez

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de **Biotecnología** del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y forma parte del proyecto titulado “Enfoque agrogenómico en el estudio de la Sigatoka negra”, CONACyT, número 220957, bajo la dirección de la **Dra. Blondy Beatriz Canto Canché** y co director el **Dr. Ignacio Rodrigo Islas Flores**.

AGRADECIMIENTOS

Económicos:

Agradezco al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por la beca 715391 otorgada para la realización de mi Doctorado.

Académicos:

Agradezco el apoyo técnico brindado por el M. en C. Bartolomé Chi Manzanero (†) y el Dr. César de los Santos Briones en el laboratorio de Biotecnología microbiana y el apoyo técnico del M. en C. Miguel Alonso Tzec Simá en el laboratorio 006 de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas.

A la Dra. Karla Gisel Carreón Anguiano por su asesoría técnica.

Al Dr. Miguel Ángel Canseco Pérez por su colaboración en el trabajo publicado.

Personales:

A mis amigos de toda la vida: Alicia, Eyra, Gloria y Alfredo por seguir presentes y echando porras.

A mis nuevos amigos: Gis, Rufi, Jewel, Inés, Jean, Damian por su compañerismo, solidaridad, apoyo y amistad, que hicieron muy amena la estancia en el laboratorio.

DEDICATORIAS

Dedico este trabajo a mi familia: mi hija, motor de mi vida, cuya alegría representó mi salvavidas para atravesar los momentos abrumadores de carga mental; a mi compañero de vida, cuya presencia fue un pilar esencial en la dinámica que me permitió desarrollar el trabajo; a mi madre, hermanos, suegros, cuñada y cuñado.

A mi padre, por su amor y apoyo incondicional durante toda su vida.

Al maestro Bartolomé Chi, ya que, por sus enseñanzas, conocimientos y principalmente por su calidad humana, fue un elemento fundamental en el desarrollo del trabajo.

LISTA DE LOS PRODUCTOS GENERADOS

Artículo: Identification of a Novel Lipase with AHSMG Pentapeptide in Hypocreales and Glomerellales Filamentous Fungi.

Gutiérrez-Domínguez, D.E.; Chí-Manzanero, B.; Rodríguez-Argüello, M.M.; Todd, N.A.; Islas-Flores, I.; Canseco-Pérez, M.Á.; Canto-Canché, B. Identification of a Novel Lipase with AHSMG Pentapeptide in Hypocreales and Glomerellales Filamentous Fungi. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 9367. <https://doi.org/10.3390/ijms23169367>

ÍNDICE

INTRODUCCION	1
CAPÍTULO I	3
ANTECEDENTES	3
1. LIPASAS	3
1.1. Estructura	6
1.2. Mecanismo de reacción	7
1.3. Propiedades	8
1.4. Clasificación	10
2. CLASIFICACIÓN	10
2.1. Producción	13
2.2. Purificación	16
3. PROTEINAS RECOMBINANTES	18
3.1. Sistemas de expresión de proteínas heterólogas	19
3.2. Sistemas de expresión en levadura para lipasas heterólogas	24
4. FAMILIA 1.4 DE LIPASAS	25
JUSTIFICACIÓN	29
HIPÓTESIS	30
OBJETIVO GENERAL	30
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	31

CAPÍTULO II	33
CARACTERIZACIÓN IN SILICO DE LA LIPASA 135964 DE <i>TRICHODERMA HARZIANUM</i>	33
INTRODUCCIÓN	33
MATERIALES Y MÉTODOS	35
1. DEFINICIÓN DE PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS	35
2. PREDICCIONES A PARTIR DE LA SECUENCIA PRIMARIA DE LA LIPASA.....	35
3. MODELADO.....	35
4. BÚSQUEDA DE ORTÓLOGOS	36
RESULTADOS.....	37
1. DEFINICIÓN DE PARMETROS FISICOQUÍMICOS.....	37
2. PREDICCIONES A PARTIR DE LA SECUENCIA PRIMARIA DE LA LIPASA.....	39
3. MODELADO.....	39
4. BÚSQUEDA DE ORTÓLOGOS	42
DISCUSIÓN	49
CAPÍTULO III	53
EXPRESIÓN EN LEVADURA Y CARACTERIZACIÓN DE UNA LIPASA DE <i>TRICHODERMA HARZIANUM</i>	53
INTRODUCCIÓN	53
MATERIALES Y MÉTODOS	55
1. MATERIAL BIOLÓGICO	55
2. MÉTODOS	55

3.2.	Clonación.....	55
2.1.1.	Amplificación de secuencia codificante de la lipasa	55
2.1.2.	Inserción en vector pGEM-T Easy	55
2.1.3.	Secuenciación	57
2.1.4.	Diseño de cebadores específicos para la lipasa 135964, con adaptadores con sitios de restricción	57
2.1.5.	Re-amplificación de la secuencia codificante de la lipasa 135964	58
2.1.6.	Inserción de la lipasa 135964 con sitios de restricción (RE) en vector pGEM- T Easy	58
2.2.	Expresión.....	59
2.2.1.	Digestión con enzimas de restricción.....	59
2.2.2.	Subclonación de la lipasa 135964 en vector de expresión pPICZ-B	60
2.2.3.	Secuenciación de vector de expresión.....	61
2.2.4.	Transformación de levadura <i>P. pastoris</i>	61
2.2.5.	Extracción de ADN genómico de <i>P. pastoris</i>	61
2.2.6.	Inducción de expresión en <i>P. pastoris</i>	62
2.3.	Caracterización.....	63
2.3.1.	Purificación de la lipasa	63
2.3.2.	Cuantificación de proteína	64
2.3.3.	Electroforesis SDS-PAGE.....	64
2.3.4.	Actividad enzimática de lipasa	65
2.3.5.	Western Blot	65

RESULTADOS.....	68
1. CLONACIÓN.....	68
1.1. Inserción en vector pGEM-T Easy	68
1.2. Secuenciación	69
1.3. Diseño de cebadores específicos para la lipasa 135964, con adaptadores con sitios de restricción	72
1.4. Re-amplificación de secuencia codificante de la lipasa 135964	73
1.5. Inserción de la lipasa 135964 con sitios de restricción (RE) en vector pGEM- T Easy	74
2. EXPRESIÓN	75
2.1. Liberación de inserto 135964 en pGEM, con enzimas de restricción	75
2.2. Subclonación de la lipasa 135964 en vector de expresión pPICZ-B	76
2.3. Secuenciación de vector de expresión.....	79
2.4. Transformación de la levadura <i>P. pastoris</i>	80
3. CARACTERIZACIÓN	84
3.1. Purificación de la lipasa	86
3.2. Actividad enzimática	87
3.3. Electroforesis SDS-PAGE.....	89
DISCUSIÓN	94
CAPÍTULO IV	99
IDENTIFICATION OF A NOVEL LIPASE WITH AHSMG PENTAPEPTIDE IN HYPOCREALES AND GLOMERELLALES FILAMENTOUS FUNGI.	99

1.	INTRODUCTION.....	100
2.	RESULTS.....	103
2.1.	Expression of Lipase 135964 in <i>T. harzianum</i>	103
2.2.	Sequencing.....	103
2.3.	<i>In silico</i> Characterization.....	105
2.4.	Orthologs and the Phylogenetic tree	105
2.5.	Three-Dimensional Model of the ThaL Lipase.....	112
2.6.	Pathogenicity induction by starvation	113
3.	DISCUSSION.....	115
4.	MATERIALS AND METHODS.....	119
4.1.	Biological Material.....	119
4.2.	Pathogenicity Induction by Starvation	120
4.3.	RNA Extraction and cDNA Synthesis.....	120
4.4.	Cloning and Sequencing.....	121
4.5.	Expression Analysis.....	121
4.6.	Bioinformatics	122
4.6.1.	In Silico Characterization	122
4.6.2.	Ortholog Identification and Phylogenetic Analysis.....	122
4.6.3.	3D Modeling	123
	CAPÍTULO V	125
	CONCLUSIONES GENERALES.....	125

PERSPECTIVAS.....	125
ANEXOS.....	126
BIBLIOGRAFÍA.....	134

ABREVIATURAS

ThaL	Trichoderma harzianum Lipase 135964.
EUA	Estados Unidos de América.
USD	Dólar estadounidense.
kDa	kilo-dalton. Unidad de masa molecular equivalente a 1000 daltons.
pH	Potencial de hidrógeno.
BRENDA	BRaunschweig ENzyme DAtabase.
α/β	Alfa/beta.
OH	Grupo hidroxilo.
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético.
ESTHER	ESTerases and alpha/beta-Hydrolase Enzymes and Relatives.
LED	Lipase Engineering Database.
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
SSF	Solid State Fermentation.
SmF	Submerged Fermentation.
°C	Grado Celsius.
h	horas.
PF	Factor de purificación.
PR	Recuperación de proteína.
MW	Masa molecular.
PPT	Precipitación.

RMS	Sistema micelar reverso.
ATPS	Sistema acuoso de dos fases.
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario.
NH ₂ -	Grupo amino.
COOH-	Grupo Carboxilo.
GRAS	Generally Recognized As Safe.
YEp	Vector plasmídico episomal.
YRp	Vector plasmídico de replicación autónoma.
YCp	Vector plasmídico con centrómero de levadura.
MCS	Multiple cloning site.
URA3	Gen que codifica orotidina 5-fosfato decarboxilasa.
TRP1	Gen que codifica fosforribosilantranilato isomerasa.
GAL1	Gen que codifica galactoquinasa.
PGK1	Fosfoglicerato quinasa 1.
GAP491/THD3 o GPD	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.
ADH1	Alcohol deshidrogenasa 1.
PDC1	Piruvato descarboxilasa isoenzima 1.
P _{AOX1}	Promotor de la enzima alcohol oxidasa 1.
P _{GAP}	Promotor de la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.
AOX1	Alcohol oxidasa 1.
P _{FLD1}	Promotor de la enzima formaldehído deshidrogenasa dependiente de glutatión.

TALipA	<i>Trichosporon asahii</i> lipase A.
pGEM-T Easy	Vector plasmídico comercial.
GenBank	Base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI).
DDBJ	DNA Database of Japan.
EMBL	European Molecular Biology Laboratory.
Glu	Ácido glutámico.
Arg	Arginina.
Lys	Lisina.
Ser	Serina.
Thr	Treonina.
Asn	Asparagina.
Gln	Glutamina.
Asp	Aspartato.
His	Histidina.
SVM	Support Vector Machine.
PCR	Polymerase chain reaction.
dNTPs	Deoxynucleotide Triphosphates.
V	Volts.
pb	Pares de bases.
ng	nanogramos.
μl	microlitros.

nm	nanómetros.
kb	kilobases.
pGEM-lip13	Vector pGEM-T Easy que contiene la lipasa 135964.
CaCl ₂	Cloruro de calcio.
LB	Luria Bertani.
rpm	revoluciones por minuto.
mM	milimolar.
mg	miligramo.
ml	mililitro.
X-Gal	β-D-galactopiranósido.
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranósido.
pGEM-lip13-Gw	Vector pGEM-T Easy que contiene la lipasa 135964 flanqueada con adaptadores del sistema Gateway.
pDONR-lip13	Vector pDONR 221 que contiene la lipasa 135964.
LANBAMA	Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental.
IPICYT	Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica.
PmlI	Enzima de restricción (Eco721).
XhoI	Enzima de restricción.
BglII	Enzima de restricción.
SacI	Enzima de restricción.
N-His	Etiqueta de histidina en el amino terminal.

C-His	Etiqueta de histidina en el carboxilo terminal.
pGEM-lip13-NH	Vector pGEM-T Easy que contiene la lipasa 135964 con la etiqueta de histidina en el amino terminal.
pGEM-lip13-CH	Vector pGEM-T Easy que contiene la lipasa 135964 con la etiqueta de histidina en el carboxilo terminal.
RE	Sitios de restricción.
PICZ-Lip13NH	Vector pPICZ-B que contiene la lipasa 135964 con la etiqueta de histidina en el amino terminal.
PICZ-Lip13CH	Vector pPICZ-B que contiene la lipasa 135964 con la etiqueta de histidina en el carboxilo terminal.
YPD	Yeast extract Peptone Dextrose.
x g	Gravedad. Medida de fuerza centrífuga.
SDS	Dodecilsulfato sódico.
NaCl	Cloruro de sodio.
Tris-HCl	Clorhidrato de tris(hidroximetil)metilamina.
MGYH	Minimum medium: Yeast nitrogen base, Glycerol, biotin and Histidine.
OD ₆₀₀	Densidad óptica a 600 nm.
YNB	Yeast Nitrogen Base.
MMH	Minimu medium Metanol Histidine.
M	Molar.
Ni-NTA	Níquel-ácido nitrilotriacético.
BSA	Bovine serum albumin.
SDS-PAGE	sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis.

PNP	p-nitrofenil palmitato.
PVDF	Polifluoruro de Vinilideno.
TBST	Amortiguador TBS con Tween 20.
NBT	Nitroazul de tetrazolio.
BCPI	Bromo-cloro-indolil-fosfato.
FW_NHis	Cebador forward para amplificar lipasa 135964 con etiqueta de histidina en amino terminal.
RV_NHis	Cebador reverse para amplificar lipasa 135964 con etiqueta de histidina en amino terminal.
FW_CHis	Cebador forward para amplificar lipasa 135964 con etiqueta de histidina en carboxilo terminal.
RV_CHis	Cebador reverse para amplificar lipasa 135964 con etiqueta de histidina en carboxilo terminal.
6xHis	Seis histidinas.
Ca ²⁺	Catión calcio.
Mg ²⁺	Catión magnesio.
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero.
C.P.	Código Postal.
TAGs	Triacylglycerols.
ORF	Open Reading Frame.
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction.
PEL	<i>Penicillium expansum</i> lipase.
PDA	Potato Dextrose agar.

PDB	Potato Dextrose Broth.
RNA	Ribonucleic acid.
DTT	Dithiotreitol.
CONACyT	Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.
FOSEC	Fondos Sectoriales.
SEP	Secretaría de Educación Pública.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Reacción de hidrólisis catalizada por una lipasa. Tomado de Casas-Godoy <i>et al.</i> , (2018).	3
Figura 1.2 Reacciones de esterificación catalizadas por una lipasa. Tomado de Casas-Godoy <i>et al.</i> , (2018).	4
Figura 1.3 Reacciones de transesterificación catalizadas por una lipasa. Tomado de Casas-Godoy <i>et al.</i> , (2018).	5
Figura 1.4 Esquema de producción de lipasas extracelulares considerando los factores que influyen y las condiciones de reacción. Modificado de Geoffry y Achur (2018).	14
Figura 1.5 Identificación de la putativa lipasa verdadera de <i>T. harzianum</i> . Modificado de Canseco-Pérez <i>et al.</i> (2018)	26
Figura 1.6 Análisis <i>in silico</i> de lipasas de <i>Trichoderma harzianum</i> . Modificada de Canseco-Pérez <i>et al.</i> (2018).	26
Figura 1.7 Identificación <i>in silico</i> de dominios característicos de las lipasas en las lipasas de <i>Trichoderma harzianum</i> . Modificado de Canseco-Pérez <i>et al.</i> (2018).	27
Figura 1.8 Estrategia experimental para caracterizar a la lipasa 135964 de <i>T. harzianum</i>	31
Figura 2.1 Modelo 3D de la lipasa 13964 de <i>Tricoderma harzianum</i> , obtenido por homología con la lipasa 2Z5G de <i>Geobacillus zalihae</i>	40
Figura 2.2 Estructuras secundarias de la lipasa 135964. Verde: láminas β . Morado: α -hélices. Generada y visualizada en Swiss model.	41
Figura 2.3 Sección de secuencia primaria de lipasa 135964 y su correspondiente estructura secundaria. Generada y visualizada en Swiss model.	41
Figura 2.4 Ubicación espacial del pentapéptido AHSMG de la lipasa 135964, resaltado en color rojo. Generada y visualizado en Swiss model.	42
Figura 2.5. Alineamiento múltiple de secuencias ortólogas de la lipasa 135964 de <i>Trichoderma harzianum</i>	45

Figura 2.6. Alineamiento múltiple de secuencias en el que se visualiza el pentapéptido de interés AHSMG.....	47
Figura 2.7. Árbol filogenético de la lipasa 35964 de <i>Trichoderma harzianum</i> y sus homólogos en otros hongos.	48
Figura 3.1 Análisis en gel de agarosa de los productos de PCR en colonia obtenidos de <i>E. coli</i> recombinantes conteniendo la región ORF de la lipasa 135964. A) M: Marcador molecular GeneRuler 1kb DNA Ladder. Carril1-14: Clonas positivas. B) M: Marcador molecular GeneRuler 1kb DNA Ladder. Carril 1 y 2: Clonas positivas 15 y 16. Carril 3: control negativo. La flecha en azul indica el amplicón esperado de 1100 pb mientras que la flecha en naranja indica el amplicón de 153 pb del control negativo.	69
Figura 3.2 Secuencia de nucleótidos de la lipasa 135964 de <i>Trichoderma harzianum</i> obtenida a partir de la secuenciación de los plásmidos recombinantes. La sección resaltada en verde corresponde a la etiqueta de histidina.	70
Figura 3.3 Secuencia deducida de aminoácidos de la lipasa 135964 de <i>Trichoderma harzianum</i>	71
Figura 3.4 Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la lipasa 135964 deducida <i>in silico</i> con la secuencia de aminoácidos de la lipasa obtenida en el presente trabajo. En amarillo se señalan los cambios en la secuencia de aminoácidos y en verde se marca el sitio de inserción de una treonina.	72
Figura 3.5 Gel de agarosa al 0.8% que muestra el producto de PCR obtenido con los oligos N-His y C-His, y como templado el constructo pDONR-lip13. Los amplicones de 1kb que se observan corresponden a la lipasa 135964 de <i>T. harzianum</i> . Las bandas presentes cerca de los 3000pb corresponden al constructo pDONR-lip13 enrollado. M: Marcador molecular GeneRuler 1kb DNA Ladder. Carril 1: Amplicón lip13-NHis. Carril 2: Amplicon lip13-Chis.	73
Figura 3.6 Análisis en gel de agarosa de los productos de PCR en colonia de <i>E. coli</i> recombinantes conteniendo la región ORF de la lipasa 135964 en el vector pGEM-T Easy. A) Lip13-NHis M: Marcador molecular GeneRuler 1kb DNA Ladder. Carril1-5: Clonas analizadas. Carril 6: Colonia negativa control. Carril 7: Control negativo de reactivos. Carril 4 y 5: colonias positivas. B) Lip13-CHis M: Marcador molecular GeneRuler 1kb DNA Ladder. Carril1-5: Clonas	

analizadas. Carril 6: Colonia negativa control. Carril 7: Control negativo de reactivos. Carril 1 y 3: colonias positivas. La flecha en azul indica el amplicón de 1100 pb.....75

Figura 3.7 Análisis en gel Gel de 0.8% de agarosa de las digestiones con PmIII y XhoI de los vectores pGEM-lip13-NH y pGEM-lip13-CH. El inserto de 1kb liberado en las digestiones correspondiente a la lipasa 135964; el vector vacío pPICZ-B se digirió con las mismas enzimas. M: Marcador molecular GeneRuler 1kb DNA Ladder. Carril 1 y 2: De arriba a abajo, plásmido linealizado (4kb), plásmido enrollado (<3kb) e inserto liberado (1 kb) del constructo pGEM-lip13-NH. Carril 3 y 4: De arriba a abajo plásmido linealizado (4kb), plásmido enrollado (<3kb) e inserto liberado (1kb) del constructo pGEM-lip13-CH. Carril 5 y 6: Vector pPICZ-B digerido.76

Figura 3.8 Mapa del vector pPICZ-B para la expresión heteróloga de proteínas en *P. pastoris*. Los sitios de restricción enmarcados en color verde corresponden a los sitios utilizados para insertar la secuencia codificante de la lipasa 135964.....77

Figura 3.9 Gel de agarosa al 1% que muestra productos de PCR a partir de constructos PICZ-lip13. La PCR se llevó a cabo utilizando los plásmidos PICZ-Lip13NH y PICZ-Lip13CH como templado y los oligos N-His y C-His (con sitios de restricción) de la lipasa 135964. M: Marcador molecular GeneRuler 1kb DNA Ladder. Carril 1 y 2: Amplicón de lipasa 135964 a partir de plásmido PICZ-Lip13NH. Carril 3: Control negativo de reactivos con oligos N-His. Carril 4 y 5: Amplicón de lipasa 135964 a partir de plásmido PICZ-Lip13CH. Carril 6: Control negativo de reactivos con oligos C-His.....78

Figura 3.10 Gel de agarosa al 1% que muestra productos de PCR amplificados a partir del constructo PICZ-Lip13NH y del vector pPICZ-B. M: marcador molecular generuler 1kb DNA ladder. Carril 1: Amplicón de 1.3kb correspondiente a la lipasa 135964 con secuencias flanqueantes de oligos del constructo PICZ-Lip13NH. Carril 2: Amplicón de 303 pb que corresponde al sitio múltiple de clonación del vector pPICZ-B. Carril 3: Control negativo.79

Figura 3.11 Secuencia codificante de la lipasa 135964, con etiqueta de histidina en el N-terminal. La secuencia fue confirmada mediante secuenciación de nucleótidos y traducida *in silico* a la secuencia de aminoácidos.....80

Figura 3.12 Gel de agarosa al 0.8% que muestra los constructos PICZ-Lip13NH y PICZ-Lip13CH linealizados. La digestión del vector recombinante se realizó como se describe en materiales y

métodos . M: Marcador molecular GeneRuler 1kb DNA Ladder. Carril 1 al 3: Plásmido PICZ-Lip13NH linealizado (4kb). Carril 5 al 7: Plásmido PICZ-Lip13CH linealizado (4kb).81

Figura 3.13 Gel de agarosa al 0.8% que muestra el vector vacío pPICZ-B linealizado. M: Marcador molecular GeneRuler 1kb DNA Ladder. Carril 1: Plásmido pPICZ-B linearizado (3kb). Carril 2 y 3: De arriba a abajo, plásmido pPICZ-B enrollado (aprox 4.5 kb) y plásmido pPICZ-B linearizado (3kb).81

Figura 3.14 Análisis en gel de 1% de agarosa de los productos de PCR en colonia de *P. pastoris* transformadas con el constructo PICZ-Lip13NH. M: marcador molecular Generuler 1kb DNA. Carril 1 y 2: Amplicón de lipasa 135964 perteneciente a colonias positivas. Carril 6: control positivo de reactivos con oligos nativos y plásmido PICZ-Lip13NH como templado. Carril 7: control negativo de reactivos con oligos nativos sin templado.....82

Figura 3.15 Gel de agarosa al 1% que muestra los productos de PCR en colonia de *Pichia p.* transformada con el constructo PICZ-Lip13CH. M: marcador molecular Generuler 1kb DNA ladder. Carril 1-6 y 8-11: Amplicón de lipasa 135964 perteneciente a colonias positivas. Carril 13: control positivo, amplicon de lipasa 135964.. Carril 14: control negativo de reactivos83

Figura 3.16 Gel de agarosa al 1% que muestra el ADN genómico de *Pichia. pastoris*. transformada con el constructo PICZ-Lip13NH y el producto de PCR, lipasa 135964, usando el ADNg como templado. M: marcador molecular Generuler 1kb DNA ladder. Carril 1: ADN genómico de *Pichia pastoris*. Carril 2: Amplicón de lipasa 135964 amplificado a partir de ADN genómico con oligos nativos de la lipasa. Carril 3: control negativo de reactivos. Carril 4: control positivo de lipasa 135964.....84

Figura 3.17. Resultados cualitativos de la actividad lipolítica del extracto crudo correspondiente a las células transformadas con el constructo PICZ-Lip13-NH, inducidas 0, 48, 72 y 96 horas.85

Figura 3.18. Comparación de resultados cualitativos de la actividad lipolítica del extracto crudo de células transformadas con el constructo PICZ-Lip13-NH y de células tipo silvestre, inducidas por 0, 48, 72 y 96 horas.86

Figura 3.19 Columnas para cromatografía de afinidad níquel-histidina.87

Figura 3.20 Perfil electroforético de polipéptidos presentes en extractos crudos de proteína de muestras tomadas a 0 y 48h de inducción de *Pichia pastoris* transformada con PICZ-Lip13NH.

M: marcador de masa molecular en kDa. WT: wild type (control). TR: NH I (muestra). ExT0: Extracto crudo de 0h. ET48: Extracto crudo de 48h. FT: Flow through. L1: Lavado 1. Línea roja: altura correspondiente al tamaño de la proteína de interés (lipasa 135964).....89

Figura 3.21 Perfil electroforético de polipéptidos presentes en las fracciones eluidas con diferente concentración de imidazol a partir de los extractos crudos de células de *P. pastoris* silvestre (WT) o transformada (TR) inducidas por 48 h,. M: marcador de masa molecular en kD. WT: silvestre (control). TR ET48: Extracto crudo de 48h de muestra NH I. EE100: Eluato con 100mM de imidazol. E150: Eluato con 150mM de imidazol. E250: Eluato con 250mM de imidazol. Línea roja: altura correspondiente al tamaño de la proteína de interés (lipasa 135964).....90

Figura 3.22 Perfil electroforético en geles SDS-PAGE de polipéptidos presentes en la fracción soluble de los extractos crudos de células de *P. pastoris* silvestre (WT) o transformada (TR) inducidas 72h (T72) y 96h (T96). Línea roja: altura correspondiente al tamaño de la proteína de interés (lipasa 135964).....91

Figura 3.23 Perfil electroforético de polipéptidos teñidos con nitrato de plata en gel SDS-PAGE conteniendo extractos crudos, de la fracción insoluble, de las muestras de 72h (T72) y 96h (T96). WT: silvestre (control). TR: NH I (muestra). Línea roja: altura correspondiente al tamaño de la proteína de interés (lipasa 135964).....92

Figura 3.24 Western blot en membrana de PVDF conteniendo a las proteínas de los eluatos solubles eluidos con 100mM de imidazol. Las muestras correspondientes a 0h, 48h, 72h y 96h de inducción, tanto transformadas (TR) como silvestres (WT).93

Figure 4.1 Analysis in 1% agarose gel of the expression of *T. harzianum* 135964 lipase using mycelial cDNA from different culture media and conidial cDNA as templates. M: 1 kb DNA Ladder. O1: Medium with 1% olive oil. O2: Medium with 2% olive oil. Ey: Medium with 2.5% egg yolk. Lm: Medium with 12 g/L leaf macerate (*Zephyranthes citrina*). Ce: Medium with 20 g/L cockroach exoskeleton (*Periplaneta americana*). PDA: 39 g/l medium. Cn: Conidia cDNA. The blue circle encloses the transcript of lipase135964.103

Figure 4.2 Phylogenetic tree of the ThaL lipase of *T. harzianum* and its homologs. ThaL lipase is indicated with a red circle.110

Figure 4.3 Phylogenetic tree of lipase families. The phylogenetic tree from Canseco-Pérez *et al.*, (2018) was reconstructed, and at this time the sequences of ThaL (red circle) and its top ten hits,

along with TaLipA (green circle), RN2 (blue circle), and 2Z5G (purple circle), were included. The accession numbers in parenthesis in all of the sequences correspond to GenBank IDs. The tree was generated with the MAFFT program v7.0, using the UPGMA average linkage algorithm (Rozewicki *et al.*, 2019). The tree was edited in iTOL v6 (Letunic y Bork 2007).111

Figure 4.4 Three-dimensional model of the ThaL lipase of *T. harzianum*. (A) 3D model based on the protein 2Z5G from *Geobacillus zalihae* as a template; the α -sheets are in red, and α -helices are in blue. The catalytic triad, in gray. (B) Close up of catalytic triad and oxyanion hole; Van der Waals forces are shown as cyan clouds. (C) Superposition of ThaL and 2Z5G. (D) Lid identification in ThaL (orange) based on PDB 1EX9.113

Figure 4.5 Expression of ThaL lipase *T. harzianum* cultured in liquid minimal medium. (A) Expression of ThaL in *T. harzianum*. (B) Elongation factor amplification. The temporal course corresponds to the days 0, 1, 3, 5 and 7 (labeled on the lanes as D0–D7). M: molecular marker, 1Kb DNA Ladder. (-) negative PCR control, without template. (+) positive PCR control, with gDNA as a template.114

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Productos industriales derivados de hongos (Mukherjee <i>et al.</i> , 2018).	11
Tabla 1.2 Tecnología fúngica moderna (Mukherjee <i>et al.</i> , 2018).....	12
Tabla 1.3 Lipasas fúngicas comerciales (Meghwanshi y Vashishtha 2018).....	12
Tabla 1.4. Resumen de las técnicas convencionales de purificación de lipasas para enzimas fúngicas (Pérez <i>et al.</i> , 2019).	17
Tabla 1.5 Lipasas termoestables (Kovacic <i>et al.</i> , 2019; Chakravorty <i>et al.</i> , 2011).....	25
Tabla 2.1 Composición de aminoácidos de la lipasa 135964.	37
Tabla 2.2 Características de la lipasa 135964 predichas a partir de su secuencia primaria y las herramientas utilizadas.	39
Tabla 2.3. Análisis BLAST-P de la lipasa 135964 de <i>Trichiderma harzianum</i> con la base de proteínas no redundantes de hongos.....	42
Tabla 3.1 Absorbancias registradas a 410nm para el ensayo enzimático de lipasa en ausencia de iones (ST) y en presencia de 20mM de Ca ²⁺ o 20mM de Mg ²⁺ en los extractos crudos de la fracción soluble y la fracción insoluble de la muestra T96*.....	88
Table 4.1 Comparison of the deduced protein sequence from the cDNA obtained in this study, with <i>T harzianum</i> lipase 135964 at JGI and KKO99473.1 from Gen Bank.....	104
Table 4.2 Taxonomic classification of organisms with orthologs of ThaL lipase of <i>T. harzianum</i>	107

RESUMEN

Las lipasas constituyen uno de los grupos más importante de biocatalizadores para aplicaciones biotecnológicas. Estas enzimas son serina hidrolasas definidas como triacilglicerol acilhidrolasas (E.C.3.1.1.3) capaces de hidrolizar ácidos carboxílicos de cadena larga (>10 átomos de carbono) y ésteres insolubles en agua. A pesar de ser enzimas ubicuas, se prefieren las de origen microbiano debido a que se producen en poco tiempo, tienen alto rendimiento en la conversión sustrato-producto, simplicidad en la manipulación genética y condiciones de cultivo, y constituyen una provisión constante independiente de cambios estacionales. Los hongos filamentosos se consideran una excelente fuente de lipasas debido a su capacidad de adaptarse y prosperar en ambientes hostiles (suelos contaminados con aceites, vertederos). En este trabajo se estudió a la lipasa ThaL del hongo filamentoso *Trichoderma harzianum*. Dicha lipasa se identificó por poseer el pentapéptido modificado de la forma AHSMG, hasta ahora solo reportado en lipasas bacterianas y en una lipasa de la levadura *Trichosporon ashaii*. Las lipasas de la bibliografía fueron reportadas como termoestables. El análisis estructural bioinformático identificó el oxyanion, la triada catalítica y la lid, confirmando que ThaL es una lipasa verdadera que pertenece al Grupo III de lipasas. Su similitud con lipasas termoestables en los análisis bioinformáticos sugiere que ThaL también es termoestable. Por otra parte, el análisis filogenético mostró que las lipasas fúngicas que presentan pentapéptido AHSMG constituyen una nueva familia de lipasas de los hongos filamentosos. Finalmente, las características observadas en ThaL respecto a la variabilidad de la secuencia entre cepas, mostró presencia de regiones desordenadas en su conformación y la distribución filogenética de linaje específico, común en los efectores, sugieren que la lipasa ThaL sea un potencial factor de patogenicidad, clasificada como efector no canónico. ThaL fue clonada para expresarse en *Pichia pastoris*. La enzima se produjo en cantidad insuficiente, lo que impidió la caracterización bioquímica en este trabajo, pero se establecieron las bases para trabajos posteriores.

ABSTRACT

Lipases constitute one of the most important groups of biocatalysts for biotechnological applications. These enzymes are serine hydrolases defined as triacylglycerol acylhydrolases (E.C.3.1.1.3) capable of hydrolyzing long-chain carboxylic acids (>10 carbon atoms) and water-insoluble esters. Despite being ubiquitous enzymes, those of microbial origin are preferred because they are produced in a short time, have high yield in substrate-product conversion, simplicity in genetic manipulation and culture conditions, and constitute a constant supply independent of seasons. Filamentous fungi are considered an excellent source of lipases due to their ability to adapt and thrive in harsh environments (oil-contaminated soils, landfills). In this work, lipase ThaL from the filamentous fungus *Trichoderma harzianum* was studied. This lipase was identified as having the modified pentapeptide of the AHSMG form, until now only reported in bacterial lipases and in a lipase from the yeast *Trichosporon ashaii*. Lipases from the references were reported as thermostable. Bioinformatic structural analysis identified the oxyanion, the catalytic triad, and the lid, confirming that ThaL is a true lipase belonging to Group III lipases. Its similarity to heat stable lipases in bioinformatics analyzes suggests that ThaL is also heat stable. On the other hand, the phylogenetic analysis showed that the fungal lipases presenting AHSMG pentapeptide constitute a new family of lipases from filamentous fungi. Finally, the characteristics observed in ThaL regarding the sequence variability between strains, showed the presence of disordered regions in its conformation and the phylogenetic distribution of specific lineage, common in effectors, suggest that ThaL lipase is a potential pathogenicity factor. classified as a non-canonical effector. ThaL was cloned for expression in *Pichia pastoris*. The enzyme was poorly produced, preventing biochemical characterization in the current research, but established basis for further works.

INTRODUCCIÓN

Las actividades en las que se utilizan organismos para beneficio del hombre se remontan hasta las primeras civilizaciones, no obstante, la palabra biotecnología es relativamente nueva, ya que fue hasta 1979 que se incluyó en un diccionario y con un concepto muy diferente al que conocemos actualmente (Springham *et al.*, 2020; F. A. Khan, 2012).

El Instituto Nacional de Salud y Administración de Alimentos y Medicamentos, EUA, la define como “la aplicación de sistemas biológicos y organismos a procesos técnicos e industriales. Las tecnologías incluidas en esta área comprenden la selección genética, modificación *in vitro* de material genético, empalme de genes y otras tecnologías para modificar el material genético de un organismo” (Mukherjee *et al.*, 2018). En este sentido, se denominó: nueva biotecnología y biotecnología moderna, para designar actividades que implican la manipulación genética (Springham *et al.*, 2020).

En 1917 Weizmann utilizó por primera vez un organismo en un proceso industrial: un cultivo puro de *Clostridium acetobutylicum* en la fermentación de almidón de maíz para la producción de acetona; pero fue hasta 1945 cuando la industria de la fermentación floreció. Esto provocó un impacto tal en el pensamiento y experimentación biológica que sus efectos llegaron hasta inversionistas e industriales, es decir, al área de los negocios. A partir de ahí se ha observado que los últimos descubrimientos y avances en las ciencias involucradas en esta área, han creado un mercado estrechamente relacionado que avanza conforme se desarrolla la tecnología. Por esta razón, es importante tener presente que la biotecnología no está confinada a actividades académicas y experimentos innovadores de laboratorio, sino que también es sujeto de materia industrial y comercial (Springham *et al.*, 2020; Shimasaki, 2020; Horvath *et al.*, 2019).

Hasta hoy se conocen cerca de 4000 enzimas, de las cuales, 200 son aprovechadas comercialmente. El uso de enzimas a nivel industrial ha reducido la demanda de energía en muchos procesos y genera residuos biodegradables, no tóxicos, inofensivos para el medio ambiente, por lo cual se ha incrementado la demanda de dichos biocatalizadores como alternativa a los químicos sintéticos. El mercado de enzimas para la industria pasó de 0.31 billones de USD en 1960 a un valor neto de 6 billones de USD en 2020 y se estima que alcance un valor superior a los 9 billones de USD en 2027. Los principales productores de enzimas a nivel global son Novozymes, DuPont, DSM, Advanced Enzyme Technologies, Amano Enzyme, entre otros. Actualmente, las enzimas de origen microbiano engloban el 90% del mercado mundial, mientras que, a nivel industrial, al menos el 75% de las enzimas utilizadas son de tipo

hidrolítico, y de origen microbiano (bacterias, levaduras, hongos) (Okpara, 2022; Pérez *et al.*, 2019).

Las lipasas constituyen uno de los grupos más importante de biocatalizadores para aplicaciones biotecnológicas (Jaeger y Eggert, 2002). La lipasa se descubrió por primera vez como una enzima, en el jugo pancreático, por Claude Bernard en 1856, donde hidrolizaba gotas de aceite insolubles, convirtiéndolas en productos solubles (Challa *et al.*, 2019). En 2018 su mercado se valuó en 425 millones de USD y se estima que alcance los 590.2 millones de USD en 2023 (Chandra *et al.*, 2020). Las lipasas son enzimas ubicuas, sin embargo, se prefieren las de origen microbiano sobre otras, debido a que se producen en poco tiempo, generalmente tienen alto rendimiento en la conversión sustrato-producto, simplicidad en la manipulación genética y condiciones de cultivo, y constituyen una provisión constante independiente de cambios estacionales, por lo que a nivel industrial, desde el punto de vista económico son las más viables (Pérez *et al.*, 2019). Las bacterias como *Pseudomonas alcaligenes*, *P. aeruginosa* y *Bacillus subtilis*, así como los hongos *Penicillium expansum*, *Trichoderma*, y *Aspergillus niger* son conocidos por producir grandes cantidades de lipasas (Chandra *et al.*, 2020).

Los hongos filamentosos se prefieren sobre las bacterias para producir lipasas debido a que, en su ambiente natural, son capaces de descomponer materiales que contienen carbón y nitrógeno en porcentajes más altos (Geoffry y Achur, 2018).

Las fuentes naturales de lipasas, como los hongos, habitualmente las producen en pequeñas cantidades (tomando como referencia la demanda a escala industrial), lo cual hace que su proceso de extracción sea costoso e incluso imposible (Palomares *et al.*, 2004). La producción de lipasas heterólogas es la principal estrategia que se ha empleado para incrementar los rendimientos en los bioprocesos y reducir costos, con el objetivo de hacer posible la implementación de aplicaciones industriales que utilicen lipasas (Valero, 2012). Es así como la búsqueda de nuevas fuentes microbianas de lipasas, y enzimas, es una actividad constante en la que se prevee un crecimiento significativo (Adrio y Demain, 2014).

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1. LIPASAS

Las lipasas son serina hidrolasas definidas como triacilglicerol acilhidrolasas (E.C.3.1.1.3) capaces de hidrolizar ácidos carboxílicos de cadena larga (>10 átomos de carbono) y ésteres insolubles en agua. De manera natural, catalizan la hidrólisis del enlace éster de los mono-, di- y triglicéridos produciendo ácidos grasos y glicerol.

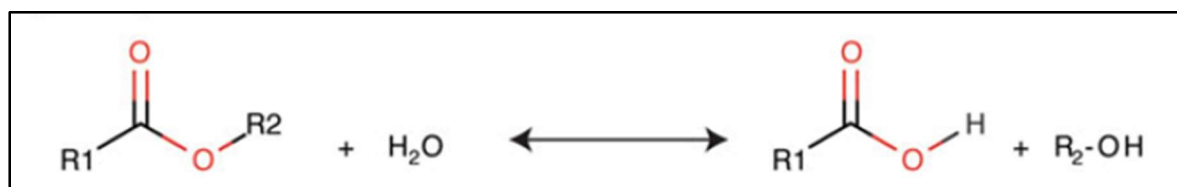


Figura 1.1 Reacción de hidrólisis catalizada por una lipasa. Tomado de Casas-Godoy *et al.*, (2018).

En condiciones termodinámicas favorables, es decir, baja actividad de agua, las lipasas catalizan varias reacciones de síntesis, las cuales podemos agrupar en dos tipos principales:

1. Esterificación

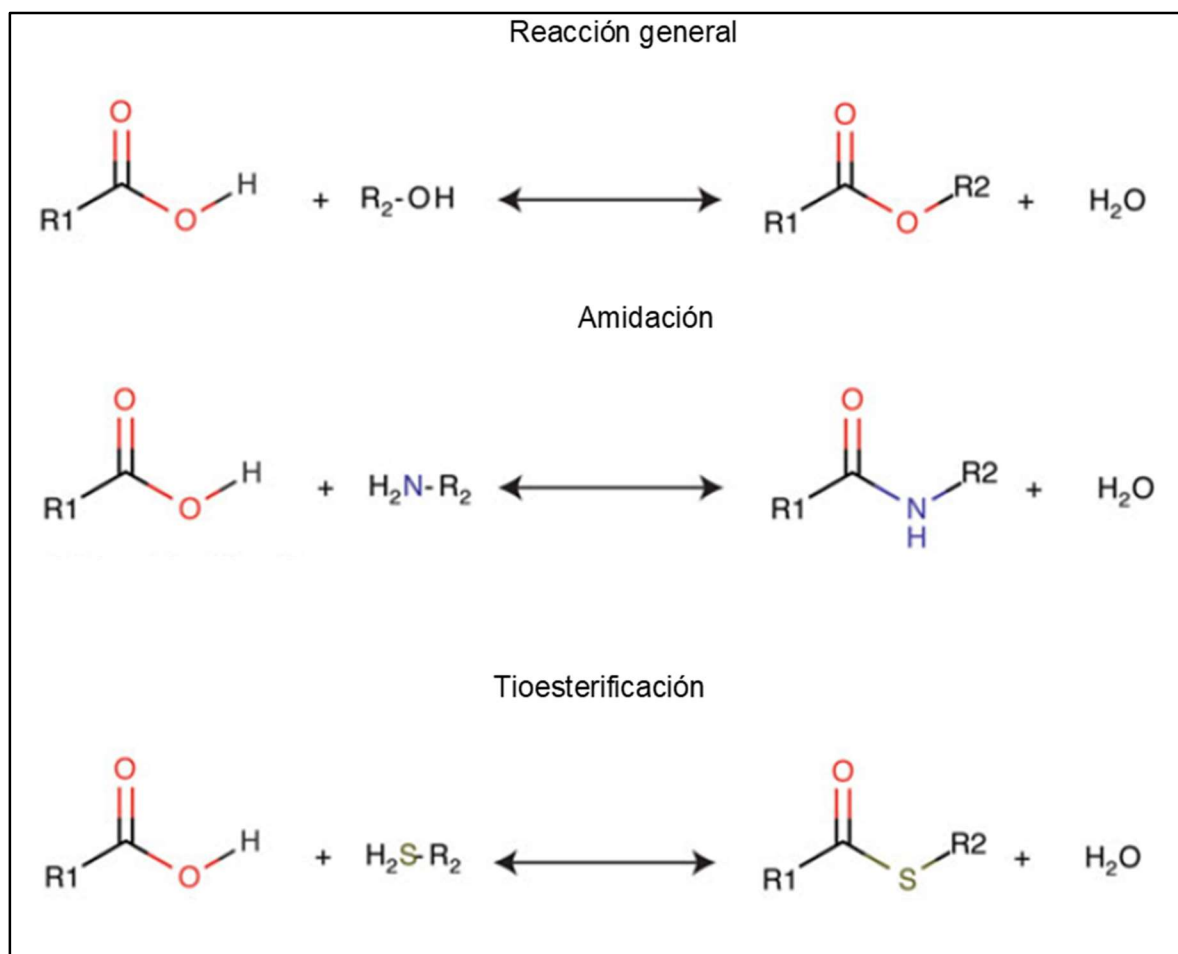


Figura 1.2 Reacciones de esterificación catalizadas por una lipasa. Tomado de Casas-Godoy *et al.*, (2018).

2. Transesterificación

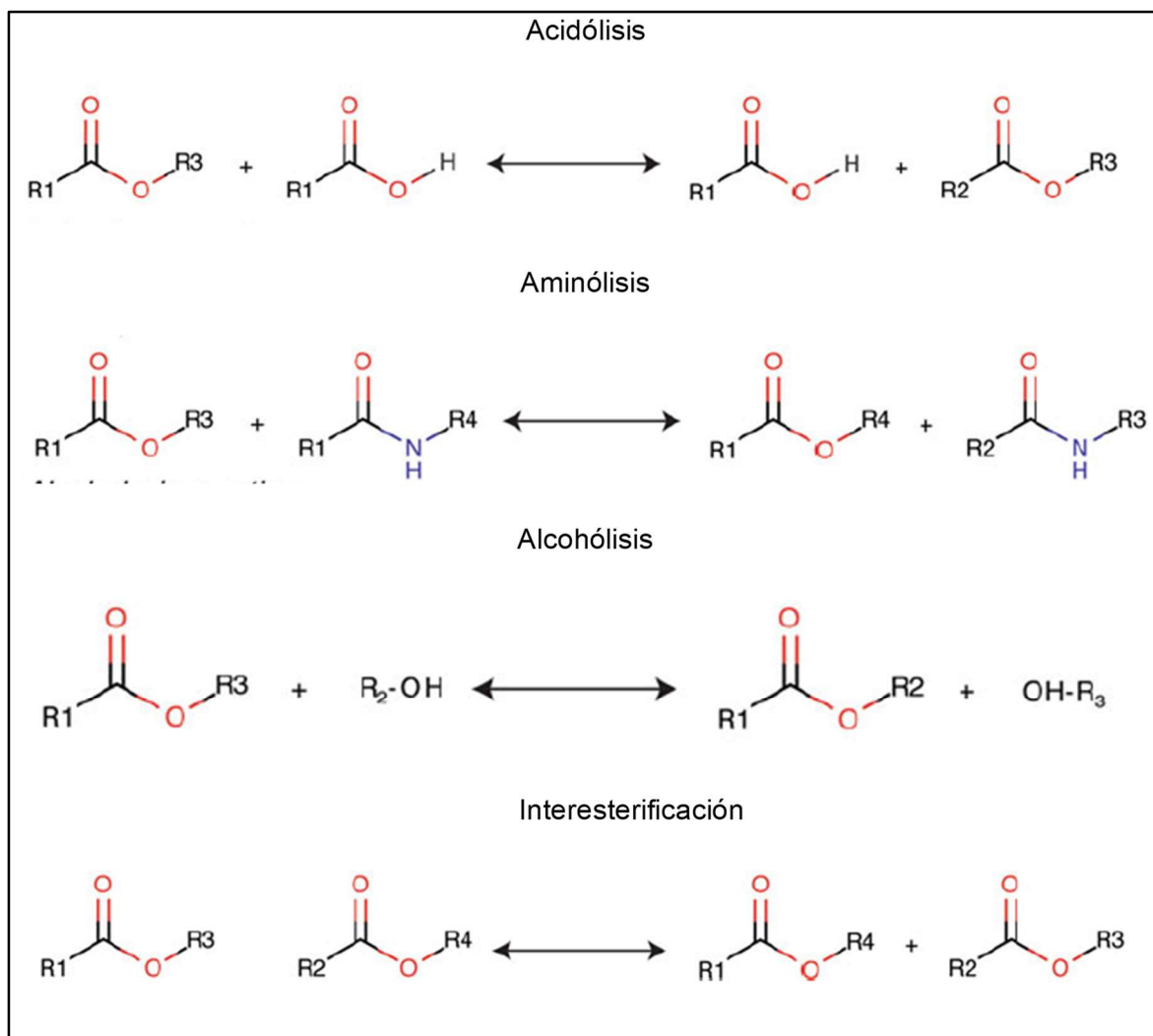


Figura 1.3 Reacciones de transesterificación catalizadas por una lipasa. Tomado de Casas-Godoy *et al.*, (2018).

Se trata de enzimas solubles en agua que actúan en interfaces lípido-agua sobre sustratos insolubles y agregados, generando las condiciones en las que se incrementa su actividad catalítica y que se conoce como fenómeno de activación interfacial. Molecularmente hablando una interfase está constituida por dos capas adyacentes de moléculas ordenadas con diferente carácter hidrofóbico-hidrofílico. En el momento en que la enzima hace contacto con una interfase, el ambiente dieléctrico en su superficie se modifica, potenciando las interacciones electrostáticas

y desplazando la cubierta del centro activo, lo que genera una reestructuración en la conformación de la proteína, aumentando su afinidad por sustratos lipídicos. Las características fisicoquímicas del sustrato también influyen en esta activación interfacial, ya que, en su forma agregada, los triacilglicéridos se encuentran en un grado de ordenamiento elevado, lo cual favorece el reconocimiento de la enzima.

Las lipasas generalmente presentan masas moleculares en el rango de 27 y 60 kDa, con puntos isoeléctricos que van desde 3.8 hasta 7.3. Pueden formar agregados debido a la interacción con otras sustancias hidrofóbicas, lo cual bloquea sus centros activos y su actividad catalítica se reduce o desaparece.

Las condiciones óptimas de pH y temperatura para la actividad catalítica de las lipasas dependen del sustrato con el que se trabaje; en el caso del pH, el rango se encuentra entre 7 y 9, y la temperatura entre 35°C y 50°C (González-Bacerio *et al.*, 2010). La actividad de las lipasas está directamente relacionada con el área total del sustrato y no con su concentración (Fojan, 2000).

Actualmente, en la colección no redundante de enzimas BRENDA están identificadas 4257 lipasas (Kovacic *et al.*, 2019).

1.1. Estructura

Las lipasas poseen elementos estructurales característicos, esto son:

-  Pliegue α/β hidrolasa. Consiste en una lámina β central, super enrollada, que contiene ocho hebras conectadas por seis α -hélices, de las ocho hebras, al menos una es antiparalela (Rani Gupta *et al.*, 2015). Esta conformación es observable en la estructura tridimensional de una lipasa y su presencia está ampliamente distribuida en enzimas hidrolíticas de diferentes orígenes. Las variaciones que existen en este pliegue consisten en diferencias en la cantidad de α -hélices y láminas β , curvatura de las láminas β , bucles, longitud y arquitectura de sitios de unión al sustrato.
-  Triada catalítica. Consiste en una serina como nucleófilo, un aspartato/glutamato como residuo ácido y una histidina; esta conformación es conservada entre las lipasas.
-  Pentapéptido (motivo conservado). La mayoría de las lipasas posee la secuencia G-X1-S-X2-G.
-  Oxianión. Se trata de dos aminoácidos que forman puentes de hidrógeno para estabilizar el tetraedro intermediario que se produce durante el mecanismo catalítico de las lipasas.

El primer aminoácido del oxianión es el residuo X2 del pentapéptido, ubicado junto a la serina catalítica. El segundo aminoácido se localiza en la parte N-terminal de la proteína.

- ✚ Tapa (Lid, por sus siglas en inglés): En la estructura tridimensional de una lipasa se puede identificar una “tapa” sobre el sitio activo, la cual se compone de una o más α -hélices, unidas a la estructura principal de la enzima por una estructura flexible. Este elemento descubre el sitio activo cuando hay presencia de una interface agua-lípido, generando un cambio conformacional y permitiendo el acceso del sustrato al sitio activo.
- ✚ Sitio de unión al sustrato: El sitio activo de las lipasas se localiza dentro de un “bolsillo” en la parte superior de la lámina β central; la superficie de este compartimento consta de aminoácidos hidrofóbicos que interactúan con el sustrato hidrofóbico, estos sitios difieren en su área de interacción hidrofóbica, forma, tamaño y profundidad (Casas-Godoy *et al.*, 2018). De acuerdo con su geometría se han identificado tres tipos de sitios:
 - Hendidura: el sitio de unión se encuentra cerca de la superficie de la proteína.
 - Embudo.
 - Túnel
- ✚ La modificación de la hidrofobicidad de los aminoácidos que rodean este sitio de unión repercute en la orientación, grado de unión e incluso en la selectividad por la longitud de la cadena del sustrato (Rani Gupta *et al.*, 2015).
- ✚ Enlaces disulfuro: Al ser proteínas ricas en cisteína, las lipasas contienen de uno a cuatro enlaces disulfuro para mantener su estructura. Estos enlaces contribuyen significativamente a la estabilidad conformacional de la molécula mediante la disminución de la entropía de la proteína, lo cual influye directamente en la termoestabilidad de varias lipasas (Rani Gupta *et al.*, 2015).

1.2. Mecanismo de reacción

Las lipasas en solución existen en dos conformaciones: cerrada y abierta; los dos estados se encuentran en equilibrio, favoreciendo la conformación cerrada. Cuando se produce una interfase, la adsorción de la lipasa cambia el equilibrio en favor de la conformación abierta (Muralidhar *et al.*, 2002).

La reacción catalizada por una lipasa empieza con una acilación, la cual inicia con la transferencia de un protón entre el aspartato, la histidina y la serina, ocasionando la activación del grupo OH de la serina. Este grupo OH, incrementa su nucleofilicidad y ataca al grupo carbonilo del sustrato. Se forma el intermediario tetraedro cargado negativamente en el oxígeno del grupo carbonilo y

el oxianión estabiliza la distribución de las cargas formando puentes de hidrógeno. La deacilación ocurre cuando un nucleófilo (agua o alcohol) ataca a la enzima, liberando el producto y regenerando la enzima (Negi, 2019; Casas-Godoy *et al.*, 2018).

De otra manera, el mecanismo de reacción se puede resumir en 4 pasos:

1. Adsorción de la lipasa a la interface.
2. Unión del sustrato a la enzima.
3. Reacción química.
4. Liberación del producto (Muralidhar *et al.*, 2002).

Las lipasas son inhibidas por los organofosfatos, carbodiimidas en presencia de nucleófilos, iodo, ácidos borónicos, fluoruro de fenil-metil-sulfonilo (PMSF), metales pesados, EDTA, algunos terpenos, iones halógenos, alcaloides, cloroformo, n-hexanol, dietil-fenil carbonato, bromoformo y varias lactonas. Los inhibidores de naturaleza proteica son más específicos, algunas proteínas hidrofóbicas inhiben a las lipasas por unión competitiva a las interfaces. También puede presentarse inhibición por producto o exceso de sustrato.

Por el contrario, los cationes metálicos pueden funcionar como activadores de las lipasas, y los detergentes o surfactantes, al incrementar notablemente el área superficial disponible para la interacción enzima-sustrato, son aceleradores de la velocidad de reacción (González-Bacerio *et al.*, 2010).

1.3. Propiedades

Las lipasas constituyen uno de los grupos más importante de biocatalizadores para aplicaciones biotecnológicas (Jaeger y Eggert, 2002) debido a que actúan en condiciones moderadas, son muy estables en presencia de solventes orgánicos, muestran una amplia especificidad de sustrato y generalmente poseen una alta-regio, o quimio y estéreoselectividad en la catálisis (Pérez *et al.*, 2019; Casas-Godoy *et al.*, 2018; Jaeger y Eggert, 2002).

En este punto es pertinente diferenciar a qué se refiere el término especificidad y selectividad con relación a las lipasas.

Especificidad de sustrato: Es la capacidad catalítica de la enzima para convertir eficientemente el sustrato en producto, esto depende del tipo de aminoácidos presentes en el sitio activo y sus interacciones electrostáticas (Rani Gupta *et al.*, 2015).

Selectividad. Es la propiedad de la enzima para discriminar entre dos sustratos, lo cual depende del arreglo y orientación de los aminoácidos en el sitio activo (Rani Gupta *et al.*, 2015). En este sentido se pueden distinguir tres categorías:

- ✓ **Tiposelectividad.** Se refiere a la propiedad de la lipasa de hidrolizar un tipo particular de éster de ácido graso.
- ✓ **Regioselectividad.** Es la capacidad de la lipasa de hidrolizar grupos éster de carboxilos en posiciones *sn*-1 y *sn*-3, comparados con aquellos en posición *sn*-2 (Jaeger y Eggert, 2002).
- ✓ **Estereoselectividad.** Corresponde a la propiedad de la lipasa para diferenciar entre dos enantiómeros en un sustrato racémico (Chen *et al.*, 2018; Muralidhar *et al.*, 2002).

Además de las arriba mencionadas, las propiedades de termoestabilidad y estabilidad en presencia de solventes son de gran interés a nivel industrial.

Las lipasas **termoestables** son aquellas que llevan a cabo su actividad catalítica a temperaturas mayores de 50°C (Robles-Machuca *et al.*, 2019). Estas lipasas son de gran interés a nivel industrial ya que son resistentes a la desnaturalización química, son estables en presencia de solventes orgánicos y son altamente enantioselectivas (Sreelatha *et al.*, 2017; Chakravorty *et al.*, 2011).

La selección de una lipasa para una determinada aplicación industrial depende de su selectividad y estabilidad en diferentes sistemas de solventes, los cuales pueden ser ácidos, alcalinos, salados o mezclas con solventes orgánicos (Kajiwara *et al.*, 2020). El uso de éstos últimos en aplicaciones que requieren ambientes no acuosos ha evidenciado ventajas como son una alta disolución de compuestos hidrofóbicos, cambio del equilibrio termodinámico de la reacción hacia la síntesis, minimización de reacciones indeseadas dependientes de agua y la ausencia de contaminación por microorganismos. La estabilidad de una lipasa en solventes orgánicos está relacionada con los aminoácidos que interactúan con el medio circundante y aquellos que no participan en la formación de estructuras secundarias (Priyanka *et al.*, 2019; Salihu y Alam, 2015).

1.4. Clasificación

El sistema de clasificación de lipasas propuesto por Arpigny y Jaeger, (1999), el cual se basa en la similitud de secuencias de varias enzimas con la lipasa de *Pseudomonas aeruginosa*, resultando en la diferenciación de ocho familias. De éstas, la Familia I (triacylglicerol lipasas) es la más grande y comprende a las lipasas “verdaderas”, las cuales poseen activación interfacial y la presencia de una “tapa” (Pérez *et al.*, 2019). Actualmente esta clasificación ha crecido a 35 familias (Verma *et al.*, 2021; Kovacic *et al.*, 2019; Hausmann y Jaeger, 2010), de las cuales 15 están registradas en la base de datos ESTHER, la cual contiene información sobre la gran diversidad de la superfamilia α/β hidrolasas (Kovacic *et al.*, 2019; Rani Gupta *et al.*, 2015).

En la base de datos LED (Lipase Engineering Database) (Fischer, 2003) se encuentra una clasificación de las lipasas con base en su oxianión, que las divide en tres clases:

- ❖ GGGX: Se divide en 6 super familias que incluye cuatro familias de lipasas con el pentapéptido GHSG, GESAG, GDSAG y GASAG.
- ❖ GX: Constituida por 27 superfamilias, de las cuales 10 son de lipasas. En esta categoría se encuentran las lipasas de hongos filamentosos que presentan el pentapéptido GHSMG y las lipasas de *Bacillus* con el pentapéptido AHSMG.
- ❖ Y: Clase que incluye 5 superfamilias, con una familia de lipasas- Lipasa A de *Candida antartica* con el pentapéptido GASHG (Rani Gupta *et al.*, 2015).

2. CLASIFICACIÓN

La biodiversidad de las lipasas conocidas se distribuye en bacterias (45%), hongos (21%), animales (18%), plantas 11(%) y algas (3%); de éstas, se prefieren las de origen microbiano debido a que estos organismos generalmente poseen un ciclo de vida corto, un alto rendimiento en la conversión sustrato-producto, simplicidad en la manipulación genética y condiciones de cultivo, y constituyen una provisión constante independiente de los cambios estacionales, por lo que son las más viables económica e industrialmente (Filho *et al.*, 2019; Pérez *et al.*, 2019).

Los hongos son eucariontes omnipresentes y cumplen una función fundamental crítica en complejos procesos biológicos y se les considera como el quinto reino con base en su modo de nutrición (Hagen, 2012). Los hongos desempeñan un papel clave en el mantenimiento de la

homeóstasis del ecosistema terrestre y en la actualidad muchos procesos indispensables en el contexto de las actividades humanas (producción de pan, bebidas y alcohol, antibióticos, enzimas, ácidos orgánicos, medicamentos) se realizan utilizando bioproductos fúngicos. Estas características convierten a los hongos en un pilar fundamental de la biotecnología moderna.

En la Tabla 1.1 se muestra una lista de ejemplos de productos industriales derivados de los hongos, mientras que en la Tabla 1.2, se enlistan las actividades modernas en tecnología fúngica.

Tabla 1.1 Productos industriales derivados de hongos (Mukherjee et al., 2018).

Producto industrial	Hongos
Antibiótico/producto farmacéutico	
Penicilinas	<i>Penicillium chrysogenum</i>
Cefalosporinas	<i>Tolypocladium inflatum</i>
Alcaloides derivados del Ergot	<i>Claviceps purpurea</i>
Griseofulvina	<i>Penicillium griseofulvin</i>
Mevalonina	<i>Aspergillus terreus</i>
Enzimas	
α -Amilasas	<i>A. niger</i> , <i>A. oryzae</i>
Celulasas	<i>Humicola insolens</i> , <i>Penicillium funiculosum</i> <i>Trichoderma viride</i>
Glucoamilasas	<i>Aspergillus phoenicis</i> , <i>Rhizopus delemar</i> , <i>R. niveus</i>
Glucosa oxidasa	<i>A. niger</i>
Invertasa	<i>A. niger</i> , <i>A. oryzae</i>
Lacasa	<i>Coriolus versicolor</i>
Pectinasa	<i>A. niger</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>Humicola insolens</i>
Proteinasas	<i>A. oryzae</i> , <i>Aspergillus melleus</i> , <i>R. delemar</i>
Rennin (microbiana)	<i>Mucor miehei</i> , <i>M. pusillus</i>
Ácidos orgánicos	
Ácido cítrico	<i>A. niger</i>
Ácido itaconico	<i>A. terreus</i>

Tabla 1.2 Tecnología fúngica moderna (Mukherjee *et al.*, 2018)

Desarrollo	Sistemas experimentales
Expresión de genes heterólogos	Fúngicos, vegetales y mamíferos
Amplificación de genes homólogos	Vías de antibióticos y enzimas
Manipulación de vías secundarias	Nuevos antibióticos semi-sintéticos y antibióticos híbridos
Genómica de gran escala	<i>Aspergillus nidulans</i> , <i>Neurospora crassa</i> , <i>Magnaporthe grisea</i> y <i>Phytophthora infestans</i>
Chips de ADN	Arreglos de ADN de alta densidad para escrutinio de expresión de genes
“Minería” en biodiversidad fúngica para nuevos fármacos	Muestreo ambiental de ADN basado en genómica de detección.

Los hongos representan una excelente fuente de lipasas (Mehta *et al.*, 2017); evidencia de esta facultad son las numerosas lipasas fúngicas que actualmente se encuentran disponibles de manera comercial (Tabla 1.3).

Tabla 1.3 Lipasas fúngicas comerciales (Meghwanshi y Vashishtha, 2018)

HONGO	ABREVIACIÓN	OTRO NOMBRE	FUENTE COMERCIAL
<i>Aspergillus Niger</i>	-	Amano A	Amano
<i>Geotrichum Candidum</i>	GCL	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Boehringer Mannheim (Chiraazyme L-8), Novo Nordisk (SP524, LipaseR)
<i>Penicillium Camemberti</i>	PcamL	<i>Penicillium cyclopium</i>	Amano (Lipasa G)
<i>Penicillium Roqueforti</i>			Fluka
<i>Rhizomucor Javanicus</i>	RJL, Amano lipase FAP	<i>Mucor javanicus</i>	Amano (LipaseM), Nagase Sangyo, Osaka Saiken, Fluka
<i>Rhizomucor Miehei</i>	RML	<i>Mucor miehei</i>	Boehringer Mannheim (ChiraazymeRL-9), Amano (MAP), Novo Nordisk (SP523, LIPozymeR), Fluka, Sigma

<i>Candida Antarctica a</i>	CAL-A		Boehringer Mannheim (ChiraazymeRL-5), Novo Nordisk (SP526)
<i>Candida Lipolytica</i>	CLL		Amano (Lipase R), Fluka
<i>Candida Antarctica b</i>	CAL-B, SP-435b		Boehringer Mannheim (ChiraazymeRL-20, Novo Nordisk (SP255 or Novozyme 435), Sigma
<i>Candida Rugosa</i>	CRL	<i>Candida cylindracea</i>	Amano (Lipase AY) Bohringer Mannheim (ChiraazymeRL-3)
<i>Candida Cylindracea</i>	CCL	Lipase OF, Amano lipase AY	Boehringer Mannheim, Amano, Meito Sangyo

Las lipasas fúngicas actualmente se utilizan en diferentes campos de la industria (Filho *et al.*, 2019), por ejemplo: oleo_ química, alimentos, agroquímica, biomédica, bioenergía (producción de biodiesel), y manufacturera: detergentes, biosensores, papel, tratamiento de residuos, síntesis de polímeros, procesamiento de pieles, etc., siendo los principales hongos productores *Rhizopus arrhizus*, *R. delemar*, *R. japonicus*, *R. niveus*, y *R. oryza*, *Aspergillus niger*, *Candida cylindracea*, *Candida antarctica* *Humicola lanuginosa* y *Mucor miehei* (Hernández-Gómez, 2017; Martínez-Corona *et al.*, 2019). Las lipasas producidas por hongos poseen una gran diversidad respecto a sus propiedades bioquímicas, tales como: pH y temperatura óptimos, rangos de tolerancia a pH y temperaturas, peso molecular, especificidad de sustrato y periodos de incubación. Las condiciones de cultivo, el estado nutricional del hongo y otros parámetros fisicoquímicos presentes en el proceso de producción, influyen en las características específicas de las lipasas, las cuales definen la pertinencia de su aplicación en determinados procesos industriales (Meghwanshi y Vashishtha, 2018).

2.1. Producción

Los hongos filamentosos se prefieren sobre las bacterias para producir lipasas debido a que, en su ambiente natural, son capaces de descomponer materiales que contienen carbón y nitrógeno en porcentajes más altos (Geoffry y Achur, 2018).

Los hongos filamentosos y los unicelulares (levaduras) productores de lipasas se pueden dividir en tres grupos de acuerdo con el mecanismo de inducción de la lipasa:

- ☞ Grupo I: La lipasa es producida en presencia de un inductor que puede ser triglicérido, ácido graso u otro lípido.
- ☞ Grupo II: Los organismos no requieren de lípidos para producir la lipasa, pero su presencia en el medio de cultivo incrementa el nivel de producción de la lipasa.
- ☞ Grupo III: Las lipasas son producidas constitutivamente (Meghwanshi y Vashishtha, 2018).

La mayoría de las lipasas son extracelulares y secretadas al medio de cultivo, considerando esta condición, en la Figura 1.4 se presenta un esquema general de producción en el que se indican los factores que influyen durante cada etapa.

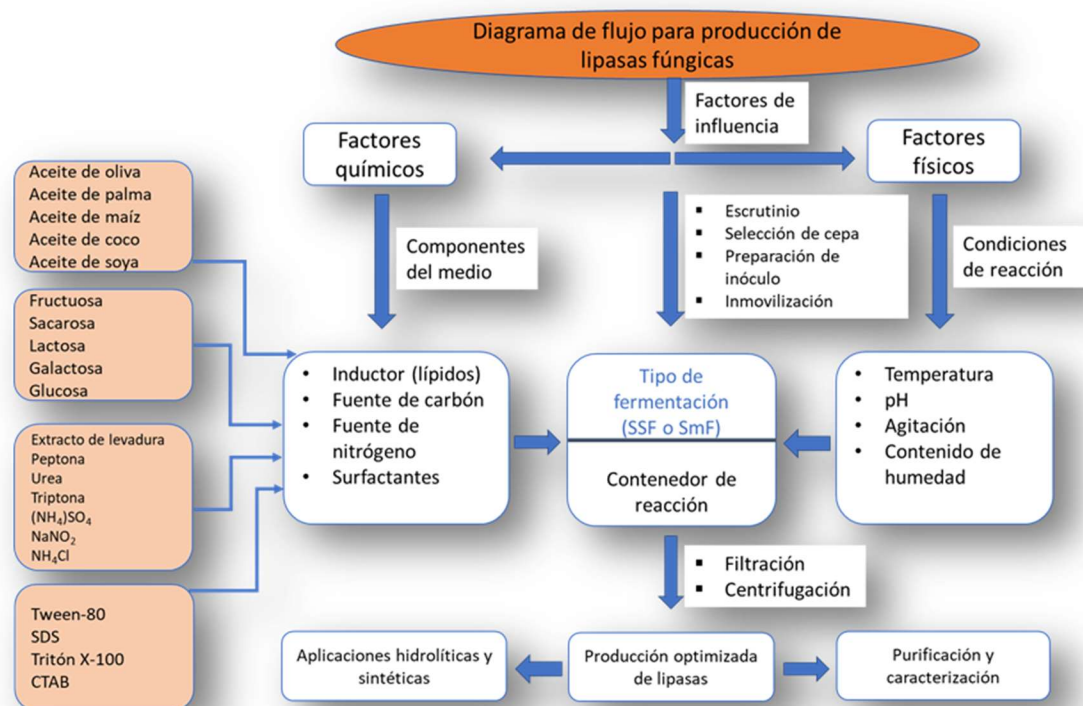


Figura 1.4 Esquema de producción de lipasas extracelulares considerando los factores que influyen y las condiciones de reacción. Modificado de Geoffry y Achur (2018).

Los parámetros fisicoquímicos que influyen en la producción de las lipasas fúngicas son:

a) Factores químicos:

- a. Sustratos lípidos: aceite de oliva, ácido oleico, aceite de girasol y de maíz son algunos ejemplos.
- b. Fuente de carbón: Diversos azúcares, polisacáridos y alcoholes de azúcares afectan la producción de las lipasas.
- c. Fuente de nitrógeno: Sulfato de amonio, cas-amino-ácidos y extracto de levadura han producido buenos resultados en producción de lipasas (Meghwanshi y Vashishtha, 2018).
- d. Surfactantes. Moléculas orgánicas que contienen una parte hidrofóbica y otra hidrofílica que incrementan la permeabilidad celular, facilitando la exportación de moléculas y la secreción de proteínas.
- e. Contenido de humedad. Factor que afecta el crecimiento del hongo y la producción de lipasas particularmente en fermentación en estado sólido (Geoffry y Achur, 2018).

b) Factores físicos:

- a. Temperatura. Este parámetro se relaciona principalmente con el crecimiento del organismo; en los hongos, la mayoría de las lipasas se han producido con hongos mesofílicos, con crecimientos óptimos entre 25 y 37°C.
- b. pH: Generalmente los hongos producen lipasas a pH ligeramente ácidos, entre 5.5 y 6.2.
- c. Periodo de incubación: Este factor depende del hongo productor, y se han registrados tiempos desde 24 hasta 120h (Meghwanshi y Vashishtha, 2018).
- d. Agitación. Variable que mejora el crecimiento del hongo y la producción de las lipasas debido al mejoramiento de la tasa de transferencia de oxígeno en el medio, lo cual dispersa de mejor manera a las micelas permitiendo un mayor contacto con las células fúngicas, produciéndose una mejor absorción de aceite que induce la secreción de la lipasa (Geoffry y Achur, 2018).

Los principales métodos de producción de lipasas a nivel industrial son la fermentación sumergida (SMF por sus siglas en inglés) y la fermentación en estado sólido (SSF). La propiedad hidrolítica de una lipasa y su rendimiento están determinados en gran medida por el método de fermentación empleado.

La fermentación en estado sólido es un proceso de cultivo de microorganismos en un sustrato sólido insoluble que se desarrolla con menos, o incluso en ausencia, de agua. Se prefiere para el cultivo de hongos debido a la similitud con las condiciones naturales de su crecimiento, además por su simplicidad, bajo nivel de represión catabólica e inhibición por producto, mejor recuperación de producto y alta calidad de éste. Las lipasas purificadas de un sistema SSF han mostrado mayor termoestabilidad en comparación con aquellas producidas por SMF.

La fermentación sumergida es un proceso de cultivo de microorganismos en medio que normalmente se encuentra en estado líquido. Presenta ventajas como alta homogeneidad del medio de cultivo, fácil control de pH y temperatura y la recuperación de biomasa y enzimas mediante simple filtración y centrifugación. En este tipo de fermentación el uso de aceites como fuente de carbón constituye el factor más influyente del proceso (Geoffry y Achur, 2018).

2.2. Purificación

Las lipasas son enzimas que pueden ser utilizadas en forma cruda en diversas ramas industriales como la oleo-química, biorremediación, detergentes y producción de biodiesel, sin embargo, en la industria farmacéutica y de alimentos, así como para propósitos de investigación (determinación de la secuencia de aminoácidos, la estructura en tres dimensiones, peso molecular y cinética) se requiere que la lipasa se encuentre pura (Meghwanshi y Vashishtha, 2018).

Los pasos para purificar una lipasa se basan en las propiedades de la proteína (carga iónica, masa molecular, hidrofobicidad, especificidad) y sus interacciones con resinas cromatográficas. Frecuentemente, entre más pasos se incluyan en el proceso de purificación, menor es la cantidad de proteína recuperada, pero la aplicación de un solo paso no genera el nivel de pureza requerido para el estudio de la enzima. Alrededor del 80% de las estrategias de purificación incluyen un paso de precipitación (al inicio), y el 60% de estas precipitaciones son con sulfato de amonio; aunque también son utilizados los disolventes acetona, etanol y diferentes ácidos.

En la Tabla 1.4 se enlistan las técnicas convencionales utilizadas en la purificación de lipasas de origen fúngico y algunos métodos aplicados con el mismo propósito.

Tabla 1.4. Resumen de las técnicas convencionales de purificación de lipasas para enzimas fúngicas (Pérez *et al.*, 2019).

Hongo	Estrategia de purificación	PF	PR (%)	MW (kDa)	Referencia
<i>Antrodia cinnamomea</i>	Sulfato de amonio PPTd y Fenil-Sefarosa	17.2	33.6	60	Shu <i>et al.</i> , (2006)
<i>Aspergillus awamori</i> (BTMFW032)	Sulfato de amonio PPT y DEAE celulosa	30.2	33.7	90	Basheer <i>et al.</i> , (2011)
<i>Aspergillus fumigatus</i> (expresada en <i>Escherichia coli</i>)	Agarosa Ni-NTA	8.47	86.1	38	Shangguan <i>et al.</i> , (2011)
<i>Aspergillus japonicus</i> LAB01	Sulfato de amonio PPT y Superosa. 12h filtración en gel	3.91	44.2	25	Souza <i>et al.</i> , (2014)
<i>Aspergillus niger</i> F044	Sulfato de amonio PPT, DEAE-Sefarosa Flujo rápido, y Sephadex G-75	73.71	33.99	35-40	Shu <i>et al.</i> , (2007)
<i>A. niger</i> F044 (expresada en <i>P. pastoris</i>)	Agarosa Ni-NTA y filtración en gel con Sephadex G-75	-	-	35-40	Shu <i>et al.</i> , (2009)
<i>Aspergillus terreus</i> NCFT 4269.10	Sulfato de amonio PPT y Sephadex G-100	2.56	8.44	46.3	Sethi <i>et al.</i> , (2016)
<i>Beauveria bassiana</i> (expresada en <i>P. pastoris</i>)	IMAC – Cu ²⁺ octil-sefarosa	15.30 13.88	39.13 75.58	78	Vici <i>et al.</i> , (2015)
<i>Fusarium solani</i> N4-2	Acetona PPT y Q-Sefarosa	34	42	31.6	Liu <i>et al.</i> , (2009)
<i>Fusarium verticillioides</i>	Lipasa 1 – octil-Sefarosa Lipasa 2 – octadecil sepabeads	2.14 4.11	44.5 25.7	30.3 68.0	Facchini <i>et al.</i> , (2018)
<i>Mortierella alliacea</i>	Acetona PPT, DEAE-Sefarosa, y Superdex 200	6.2	4	11	Jermisuntiea <i>et al.</i> , (2011)
<i>Penicillium camemberti</i> Thom PG-3	pH PPT, etanol PPT, sulfato de amonio PPT, y DEAE celulosa	22.1	8.7	28.18	Tan <i>et al.</i> , (2004)
<i>Penicillium cyclopium</i>	Sulfato de amonio PPT, Sephadex G-75, DEAE-Sephadex, y Sephadex G-75 otra vez.	590	30	40-43	Chahinian <i>et al.</i> , (2000)

<i>Rhizopus arrhizus</i>	Sephadex G75-3 en fracciones:	1.13	1.0	80	Dobrev <i>et al.</i> , (2011)
	Lip I				
	Lip II	2.95	6.6	39.7	
	Lip III	0.03	2.3	6.9	
<i>Rhizopus chinensis</i>	Sulfato de amonio PPT, butil-Sefarosa, y Superdex 75	138.3	0.7	33	Sun <i>et al.</i> , (2009)
<i>Talaromyces thermophilus</i>	Sulfato de amonio PPT, Filtración en gel con Sephacryl S-200, y MonoQ FPLC	105.75	29.13	39	Romdhane <i>et al.</i> , (2010)
<i>Aspergillus niger</i>	RMSd (isooctano/butanol/ hexano, 75/15/10 (v/v/v)) with 0.2 M CTAB g, pH 9	4.09	82.72	32	Nandini and Rastogi (2009)
<i>A. niger</i>	ATPS (PEG 4000/Ci), pH 5.2	30.5	95.14	-	Marini <i>et al.</i> , (2011)
<i>Candida antarctica</i>	ATPS (25% w/w [C8mim] ClI/30%), 25 °C, pH 7	2.6	95.9	35.3	Ventura <i>et al.</i> , (2011)
<i>Candida rugosa</i>	Immunopurificación con anticuerpos monoclonales: BF11/VNH9	-	99/92	60	Rahimi <i>et al.</i> , (2004)

PF= Factor de purificación. PR= Recuperación de proteína. MW= masa molecular. PPT= Precipitación. RMS= Sistema micelar reverso. ATPS= Sistema acuoso de dos fases.

Generalmente, en cada estrategia se incluye al menos un paso de cromatografía de interacción hidrofóbica, ya que las lipasas tienden a unirse más fuertemente a resinas hidrofóbicas, en comparación con otras proteínas. Sin embargo, cada proceso de purificación debe ser diseñado en función de la aplicación final de la enzima (Pérez *et al.*, 2019).

3. PROTEINAS RECOMBINANTES

Los microorganismos, y demás fuentes naturales, producen lipasas en pequeñas cantidades, lo cual implica que su proceso de extracción sea costoso y consuma mucho tiempo. Sin embargo, las tecnologías de ADN recombinante han hecho posible la producción de proteínas no nativas en nuevos huéspedes. Actualmente, la producción de proteínas recombinantes (Palomares *et al.*, 2004) es un mercado multi-billonario; tan solo el mercado para enzimas industriales rebasa los 6.5 billones de dólares (Mattanovich *et al.*, 2012).

La producción de lipasas heterólogas es la principal estrategia que se ha empleado para incrementar los rendimientos en los bioprocesos y reducir costos, con el objetivo de hacer posible la implementación de aplicaciones industriales que utilicen lipasas. Entre los diferentes sistemas

de expresión existentes, comúnmente el bacteriano y el de levadura son los más utilizados, debido a que son las plataformas heterólogas más económicas (Valero, 2012).

3.1. Sistemas de expresión de proteínas heterólogas

Actualmente todavía existen problemas técnicos relacionados con la purificación de proteínas, especialmente cuando están presentes en cantidades pequeñas, tienen isoformas o múltiples formas modificadas pos-traduccionalmente; por este motivo, se han desarrollado métodos para expresar ADNc de prácticamente cualquier origen, en organismos hospederos adecuados, de tal manera que se generen cantidades suficientes de proteína con las cuales se pueda llevar a cabo su análisis funcional. Dichos métodos se conocen como sistemas de expresión heterólogos (Doyle, 2009).

La expresión heteróloga de ADN recombinante permite una producción rápida de proteínas específicas, sin embargo, cada sistema puede tener éxito únicamente si la proteína no ocasiona efectos perjudiciales en la fisiología del huésped y éste provee las condiciones requeridas para la producción y el plegamiento correcto que genere una proteína funcionalmente activa. Entre las condiciones requeridas para que se lleve a cabo el plegamiento correcto de una proteína se encuentran la formación de puentes disulfuro y/o modificaciones postraduccionales específicas. En este punto es pertinente precisar que un alto nivel de transcripción del fragmento de ADN en las células del huésped no siempre lleva a una producción de una proteína completamente activa y de alta calidad (Md. Illias *et al.*, 2014).

Por otra parte, es necesario purificar la proteína de interés de la mezcla de proteínas expresadas naturalmente por el sistema hospedero, y para ello, se prefieren los protocolos de un solo paso, basados en el principio de afinidad. La sección de la proteína expresada que hace posible la purificación por afinidad se conoce como “etiqueta de afinidad”, la cual puede determinarse mediante la inserción de una secuencia codificante apropiada en el ADN que se va a expresar, es decir, la adición a la proteína de un fragmento que codifica un péptido corto, en cualquiera de sus extremos. Una etiqueta de afinidad adecuada debe permitir una purificación rápida (de un solo paso); debe ejercer un efecto mínimo en el plegamiento de la proteína, en su estructura terciaria y en su actividad biológica; no debe estar oculta por dominios aledaños y debe ser posible su remoción después de purificar la proteína expresada. La elección de la etiqueta de afinidad y su posición en el extremo NH₂- o COOH- son aspectos relevantes en el plegamiento y actividad de la proteína (Farrokhi *et al.*, 2009).

Los sistemas biológicos desarrollados como huésped para la expresión heteróloga de proteínas incluyen bacterias, levaduras, hongos, plantas, mamíferos y células de insectos; las propiedades bioquímicas y biológicas de la proteína de interés dirigirán el tipo de sistema de expresión que puede ser utilizado con éxito (Valero, 2012; Farrokhi *et al.*, 2009).

No existe un único sistema con el que se puedan producir óptimamente todas las proteínas recombinantes, por lo que para integrar un sistema exitoso primero se debe seleccionar cuidadosamente la cepa huésped y posteriormente determinar cuál es el vector más apropiado, el marcador de selección, el promotor y la etiqueta de selección (Gündüz Ergün *et al.*, 2019; Md. Illias *et al.*, 2014).

Las levaduras son las favoritas como huéspedes para la expresión de proteínas heterólogas utilizadas en la investigación, industria o medicina, ya que mantienen las ventajas de las bacterias en cuanto a manipulación y capacidad de crecimiento (Valero, 2012) y, además, poseen la maquinaria celular requerida para las modificaciones pos-traduccionales necesarias para la expresión de proteínas activas de origen eucariótico, como son la glicosilación, remoción de residuos de metionina del extremo NH₂-, formación de complejos de metilación en el extremo COOH-, la miristoilación y la farnesilación (Farrokhi *et al.*, 2009).

La expresión en levadura requiere la optimización de varios factores externos como la posición de la etiqueta de afinidad, la temperatura, la densidad celular, la formulación del medio, las variaciones entre clones, la duración del periodo de expresión y el tipo de promotor necesario (Baghban *et al.*, 2019; Farrokhi *et al.*, 2009).

Los sistemas de expresión en levadura se pueden dividir en dos grupos: metilótrofo y no metilótrofo (Baghban *et al.*, 2019; Mattanovich *et al.*, 2012).

La principal ventaja de utilizar levaduras no metilotróficas como organismo huésped es que los biólogos moleculares, bioquímicos, fisiólogos microbianos y tecnólogos de fermentación están bien familiarizados con ellas, siendo la mejor conocida *Saccharomyces cerevisiae* (Mattanovich *et al.*, 2012).

Saccharomyces cerevisiae es el primer, y mejor conocido, sistema de expresión de levadura (Florczak *et al.*, 2013; Kingsman *et al.*, 1985). Se utilizó por primera vez en 1980, aprovechando su uso tradicional en la manufactura de vino y pan. Las ventajas que posee respecto a los sistemas bacterianos residen en características fisiológicas como su tolerancia a un amplio rango

de pH, altas concentraciones de etanol y azúcar, y resistencia a una alta presión osmótica (Liu *et al.*, 2012). Además, es seguro desde el punto de vista de riesgos potenciales inherentes al huésped (Baghban *et al.*, 2019). Fue la primer célula eucariótica usada como hospedera durante la revolución del ADN recombinante y su importancia como organismo modelo clave se potenció al convertirse en el primer organismo eucarionte en tener su genoma secuenciado, en 1996, permitiendo abordar muchas cuestiones de importancia biológica fundamental (Curran y Bugeja, 2014).

Desde 1990 ha sido un organismo industrial con estatus GRAS (acrónimo de Generally Recognized As Safe) (Valero, 2012) con resistencia intrínseca a alta osmolalidad, bajo pH y a varios inhibidores, lo cual permite procesos de fermentación fáciles y económicos, con un crecimiento celular rápido en condiciones aerobias y anaerobias (Gündüz Ergün *et al.*, 2019).

S. cerevisiae ha estado en primer plano en el desarrollo de nuevas tecnologías y para la construcción de vectores de expresión y clonación. Para la producción de proteínas heterólogas la levadura se puede transformar con un vector autoreplicante o un casete de expresión integrativo, el primero provee un mayor número de copias, pero se vuelve inestable en condiciones no selectivas, mientras que con el segundo, únicamente se integra establemente una copia al genoma, pero las dificultades de mantener la presión selectiva hace que los niveles de producto obtenido en ambos se consideren similares (Gündüz Ergün *et al.*, 2019; Kingsman *et al.*, 1985).

Los vectores plasmídicos (Drew y Kim, 2012; Kingsman *et al.*, 1985) diseñados como sistemas de expresión para levadura se clasifican en vector episomal (YE_p), plásmido de replicación autónoma (YR_p) y plásmido con centrómero de levadura (YC_p). Las características en común entre ellos es que permiten la propagación en células de levadura y de *E. coli*, así como la inclusión de un sitio de clonación múltiple (MCS por sus siglas en inglés) que permite la inserción de la secuencia del gen de interés. El diseño de YE_p proviene de un plásmido nativo de *S. cerevisiae* y otras especies. El episoma circular de 2µm endógeno de *S. cerevisiae*, está compuesto de 6318pb que integran un ADN de doble cadena y permite hasta cien copias por célula en la mayoría de las especies de *Saccharomyces*. Los sistemas de expresión en levadura comerciales pYES y pRS son producidos por Invitrogen y New England Biolabs, respectivamente. El sistema pYES contiene el origen de replicación del plásmido nativo, varios marcadores de resistencia: URA3, TRP1, y ampicilina, y contiene además el promotor inducible con galactosidasa del gen GAL1 (Gündüz Ergün *et al.*, 2019).

La aproximación más directa para una expresión eficiente de proteínas recombinantes es la elección del promotor (Partow *et al.*, 2010) de acuerdo con su fuerza y regulación, así como con su potencial toxicidad, carga metabólica y nivel de proteína producida en el organismo hospedero. El poder de cada promotor tiene que ver con su función y localización en la ruta metabólica. Los promotores nativos constitutivos usados inicialmente para la producción de proteínas recombinantes en *S. cerevisiae* son promotores de la ruta glucolítica: PGK1 (fosfoglicerato quinasa 1), GAP491/THD3 o GPD (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa); o de la ruta de fermentación: ADH1(alcohol deshidrogenasa 1) Y PDC1(piruvato descarboxilasa isoenzima 1), de los cuales el primer que fue implementado para la producción de proteínas no nativas fue ADH1. Entre los promotores nativos regulados, GAL es uno de los inducibles más fuertes cuyo mecanismo de regulación es bien conocido. Su regulación depende del tipo de fuente de carbono usada, de manera que la actividad del promotor es inducida 1000 veces por galactosa y reprimida por glucosa (Gündüz Ergün *et al.*, 2019). El promotor de galactosidasa GAL1 ha demostrado la mayor expresión de genes para la expresión, inducible y controlada, de genes heterólogos (Drew y Kim, 2012).

Entre las limitaciones que se han identificado en este sistema de expresión se encuentran la inestabilidad de los plásmidos, bajos rendimientos de proteína y glicoformas no nativas, tráfico ineficiente o plegamientos incorrectos en el retículo endoplásmico (Gündüz Ergün *et al.*, 2019); además, a menudo se producen proteínas hiperglicosiladas con residuos manosilo (50-100) lo cual es muy probable que perjudique el plegamiento y/o la actividad biológica de la proteína recombinante (Farrokhi *et al.*, 2009).

Por otra parte, en el grupo de sistemas de expresión en levadura metilótrofos, el organismo hospedero mejor conocido es la levadura *Pichia pastoris*. Fue aislada por primera vez de un árbol de castaño en Francia en 1919 por Guiliérmond y su habilidad para utilizar el metanol como única fuente de carbono se descubrió a mediados de siglo. La compañía Philips Petroleum la utilizó para producir proteína unicelular como aditivo para alimento animal y posteriormente, en 1980, se transformó en un sistema hospedero heterólogo para producción de proteínas recombinantes, bajo el control del promotor de la alcohol oxidasa 1 P_{AOX1} . Actualmente, es el sistema de levadura más frecuentemente utilizado en la investigación (Juturu y Wu, 2018). La secuencia del genoma de la cepa comercial *P. pastoris* GS115 estuvo disponible en 2009, lo cual permitió a los investigadores un análisis más profundo de la fisiología y genética de la levadura, acelerando el desarrollo de cepas con modificaciones genéticas (Gündüz Ergün *et al.*, 2019).

La levadura *P. pastoris* se destaca por ser más eficiente en la secreción de proteínas recombinantes y el interés en su aplicación industrial se atribuye a su promotor alcohol oxidasa regulado por metanol P_{AOX1} , su alta eficiencia en mecanismos de secreción, capacidad de modificaciones postraduccionales y crecimiento con alta densidad celular en medio definido (Baghban *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2007). Este sistema incorpora pocos residuos manosilos (8-14) en los sitios con potencial a N-glicosilación de la proteína expresada (Farrokhi *et al.*, 2009). El nivel de expresión de una proteína recombinante producida en esta levadura aparentemente está directamente relacionado a las propiedades inherentes de la proteína: secuencia de aminoácidos, estructura terciaria y el sitio de expresión (Valero, 2012).

El tipo de vector más utilizado para la expresión de proteínas en *P. pastoris* es el integrativo, es decir, aquel vector que se encuentra flanqueado (en uno o ambos lados) por secuencias homólogas de la levadura, lo que le permite insertarse en su genoma generando estabilidad genética. Los sitios de integración comúnmente utilizados son P_{AOX1} , P_{GAP} , o las regiones del terminador AOX1. Entre los vectores de expresión comerciales para *P. pastoris* se encuentran la serie pPICZ, pGAPZ y pFLD1 para producción intracelular de proteína, y la series pPICZ α y pGAPZ α , desarrollados para la secreción de proteínas, y comercializados por Life Technologies; estos vectores emplean los promotores P_{AOX1} O P_{FLD1} para la expresión inducida y P_{GAP} para la producción constitutiva, utilizando el gen de resistencia para zeocina como marcador de selección (Gündüz Ergün *et al.*, 2019; Doyle, 2009).

En la actualidad, la tecnología CRISPR/Cas9 es ampliamente utilizada para realizar modificaciones genómicas dirigidas en *P. pastoris*, a través de mecanismos de eliminación múltiple de genes e integración dirigida de casetes homólogos de ADN. Además, se ha introducido un nuevo y eficiente sistema para modificar a *P. pastoris* llamado GoldenPiCS, , usando constructos multigenes; este sistema es capaz de integrar hasta ocho casetes de expresión en un solo plásmido (Baghban *et al.*, 2019).

3.2. Sistemas de expresión en levadura para lipasas heterólogas

De acuerdo con el servicio ISI Web of Knowledge, el sistema de expresión en levadura preferido para producir lipasas heterólogas es *P. pastoris*, ya que, en la última década, ha aparecido en 107 entradas como respuesta a la búsqueda “microorganism + recombinant lipase”; le siguen *S. cerevisiae* con 60 y *Yarrowia lipolytica* únicamente con 16 referencias. La lipasa CALB de *Candida antártica* ha sido la única lipasa que se ha expresado en todos los diferentes sistemas de levaduras.

P. pastoris se posiciona como el sistema preferido para producir lipasas recombinantes debido a que combina la habilidad de crecer en medio mínimo a muy altas densidades celulares y secretar las proteínas heterólogas al medio, facilitando su recuperación. Además, *P. pastoris* secreta muy pocas proteínas propias al medio extracelular y ninguna con actividad de lipasa o esterasa, por lo que las lipasas heterólogas no se contaminan con aquellas propias de la levadura. Sin embargo, la característica más importante que posee como microorganismo hospedero es la presencia de un promotor fuerte y estrictamente regulado: el promotor del gen de la alcohol oxidasa 1, P_{AOX1} , por lo que se utiliza metanol como fuente de carbono e inductor de la producción de la proteína de interés (Valero, 2018; Valero, 2012).

En *P. pastoris* se han producido lipasas de *Pseudomonas fluorescens*, *Thermomyces lanuginosus*, *Bacillus cereus* y *thermocatenulatus*, *Candida rugosa*, *antarctica*, *thermophyla*, *parapsilosis* y sus respectivas isoenzimas; de *Yarrowia lipolytica*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus oryzae*, *R. arrhizus* y *R. chinensis*, *Penicillium*, *Rhizomucor*, *Serratia liquefaciens*, *Galactomyces geotrichum*, *Malassezia furfu* y lipasa porcina y pancreática humana (Valero, 2012).

Finalmente, no existe un solo sistema de expresión perfecto para cada proteína, por lo que la elección del sistema más conveniente depende de variables como el rendimiento en la producción, modificaciones postraduccionales y costos de escalamiento, los cuales están en función de la proteína que interesa expresar (Mattanovich *et al.*, 2012; Valero, 2012).

Actualmente, la búsqueda para seleccionar y aislar nuevas cepas de hongos que produzcan lipasas con características catalíticas específicas, aplicables a procesos industriales, sigue siendo de alta prioridad, y con ello, el estudio a detalle de los parámetros y factores involucrados en su generación para que con su determinación se permita optimizar y alcanzar una producción a gran escala y con menor costo (Geoffry y Achur, 2018).

4. FAMILIA 1.4 DE LIPASAS

La subfamilia 1.4 de lipasas (Ruiz *et al.*, 2003) engloba a las triacilglicerol lipasas más pequeñas identificadas a la fecha, con una masa molecular de 20kDa; esta familia está conformada, casi exclusivamente, por lipasas bacterianas producidas por el género *Bacillus*; todas ellas contienen la secuencia conservada de pentapéptido A-X-S-X-G, con una alanina en la posición 1 en vez del motivo con secuencia canónica G-X-S-X-G (Kovacic *et al.*, 2019).

El estudio *in silico* de caracterización de lipasas termoestables realizado por Chakravorty *et al.*, (2011) evidenció que todas las lipasas de *Bacillus*, con la secuencia pentapéptido del sitio activo arriba descrito, resultaron termoestables o mesoestables. La Tabla 1.5 muestra algunos ejemplos de dichas lipasas.

Tabla 1.5 Lipasas termoestables (Kovacic *et al.*, 2019; Chakravorty *et al.*, 2011)

Origen	Lipasa	Pentapéptido	Temp. °C
<i>Bacillus licheniformis</i>	BLL	AHSMG	55-70
<i>Staphylococcus xylosus</i>	SXL	AHSMG	55
<i>Bacillus pumilus</i>	BPL	AHSMG	70

Posteriormente, Kumari y Gupta, (2015) reportaron la caracterización funcional de una lipasa producida por la levadura *Trichosporon asahii* (lipasa TALipA). Los resultados mostraron que se trataba de una lipasa termoestable, tolerante a disolventes y enantioselectiva, que contiene el pentapéptido conservado AHSMG. Éste fue el primer reporte de la presencia de este pentapéptido en una lipasa fúngica (Sreelatha *et al.*, 2017; Jaeger y Eggert, 2002).

Recientemente, Canseco-Pérez *et al.*, (2018) reportaron la identificación y caracterización *in silico* de triacilglicerol lipasas de *Trichoderma harzianum*. En este estudio *in silico*, se identificó

en el genoma de *T. harzianum* una lipasa que contiene el pentapéptido AHSMG (Figura 1.5), inusual en los hongos filamentosos.

ID Proteína	Superfamilia	Dominios	Descripción de dominios	Dominio de sitio activo	Sitio de unión al sustrato	Blast Hits	PSI-Blast
135964	Familia Abhidrolasa cl21494	EstA (COG1075) PGAP1 (pfam07819)	Triacilglicerol esterasa/lipasa Proteína similar a PGAP1	Sitio activo Ser-His-Asp/ Glu. Ataque nucleofílico en un átomo de carbonilo de carbono		Secuencia y anotación del genoma de diferentes hongos (p. ej., <i>Trichoderma sp.</i> , <i>Hirsutella sp.</i> , <i>Stachybotrys sp.</i> , <i>Fusarium sp.</i> , <i>Ophiocordyceps sp.</i> , <i>Colletotrichum sp.</i> , etc) como proteína hipotética, Triacilglicerol lipasa, Lipasa 2, relacionado con TGL2-triacilglicerol lipasa, GPI inositol-desacilasa Proteína similar a PGAP1, similar a PGAP1 proteína lipasa.	Ninguna proteína caracterizada entre los primeros 500 hits.

Figura 1.5 Identificación de la putativa lipasa verdadera de *T. harzianum*. Modificado de Canseco-Pérez et al. (2018)

Las figuras 1.5 y 1.6 corresponden a la caracterización *in silico* de las lipasas verdaderas putativas de *T. harzianum*, incluyendo la lipasa con el péptido AHSMG (Canseco-Pérez et al., 2018).

ID Proteína	Residuos aa	Masa molecular (kDa)	Señal IP (secretada)	Dominios TMHMM	Localización celular putativa	Continúa para el siguiente análisis
551811	379	41.185	No	No	Citoplasma	Si
87496	430	46.62	Si	No	Extracelular	Si
526309	452	47.99	Si	No	Extracelular	Si
514427	454	49.25	Si	No	Extracelular	Si
510832	722	82.80	No	No	Citoplasma	No
92423	552	62.361	No	1	Localización ambigua	Si
79895	1254	134.85	No	No	Mitocondria	No
135964	339	37.51	No	No	Retículo endoplásmico	No
492160	1782	198.07	No	No	Nuclear	No
77338	404	44.5	Si	1	Extracelular	Si
514252	613	65.4	Si	No	Extracelular	Si
502433	1059	115.6	No	No	Citosol/nuclear	Si
78181	340	36.2	Si	No	Extracelular	Si

Figura 1.6 Análisis *in silico* de lipasas de *Trichoderma harzianum*. Modificada de Canseco-Pérez et al. (2018).

En la Figura 1.7 se muestra el resultado de la predicción *in silico* de la localización de los dominios característicos de las lipasas en las proteínas candidatas a lipasas de *T. harzianum*.

Proteína	Templado	Referencia de Arte	Pentapéptido	Dominio Lid	Tríada catalítica	Oxianión
551811	3GUU	Ericsson et al.	GYSGG Gly160-Gly164	Asn195-Ser287	Ser162, Asp309, His341	Asp92 Gly163
87496			GYSGG Gly188-Gly192	Asn195-Ser287	Ser190, Asp334, His368	Asp96 Gly191
526309			GYSGG Gy208-Gly212	Asn243-Asp332	Ser210, Asp352, His384	Asp116 Gly211
514427			GHSQG Gly226-Gly230	Ala258-Phe349	Ser228, Asp373, His405	Ile146 Gln229
510832	1K8Q	Roussel et al. y Selvan et al.	CHSQG Cys431-Gly435	Phe496-Glu550	Ser433, Asp634, His667	Leu349 Gln434
92423			GFSQG Gly224-Gly228	Ile286-Ile321	Ser226, Asp396, His422	Leu139 Gln227
79895	No se identificó homólogo estructural de lipasa					
135964	4 X6U	Dror et al.	AHSMG Ala-152-Gly156	Phe189-Pro200	Ser154, Asp275, His297	Leu70 Met155
492160	No se identificó homólogo estructural de lipasa					
77338	3O0D	Bordes et al.	GHSLG Gly214-Gly218	Thr137-Tyr154	Ser216, Asp282, His343	Thr137 Leu217
514252			GHSLG Gly316-Gly320	Thr230-Trp262	Ser318, Asp379, His457	Thr230 Leu319
502433	La secuencia proteica completa no modela con lipasa					
78181	3NGM	Lou et al.	GHSLG Gly174-Gly178	Asn115-Phe126	Ser176, Asp230, His289	Ser114 Leu177

Figura 1.7 Identificación *in silico* de dominios característicos de las lipasas en las lipasas de *Trichoderma harzianum*. Modificado de Canseco-Pérez et al. (2018).

Durante el mismo año, en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, como resultado del trabajo titulado “Análisis de expresión de las lipasas de *T. harzianum* en diferentes medios de cultivo” realizado por la bachiller María Mercedes Rodríguez Argüello y dirigido por el M. en C. Bartolomé Chi Manzanero (Gutiérrez-Domínguez *et al.*, 2022), se observó la expresión de la lipasa 135964, (que contiene el pentapéptido AHSMG), en los conidios de *T. harzianum* B13-1. El estudio realizó el monitoreo de la expresión de esta lipasa en diferentes tiempos de crecimiento del hongo, sin embargo, sólo se detectó en el ADNc de conidios.

Considerando los elementos arriba mencionados, el presente trabajo plantea realizar un análisis estructural *in silico* de la lipasa identificada con el número 135964, del hongo *T. harzianum*, así como explorar su expresión heteróloga.

JUSTIFICACIÓN

La familia de lipasas 1.4, destacada por la presencia del pentapéptido AHSMG, está formada mayoritariamente por lipasas producidas por miembros del género *Bacillus*, mesofílicos o moderadamente termofílicos (*B. pumilus*, *B. licheniformis*, *B. stearothermophilus*, etc.). Estas lipasas bacterianas presentan propiedades de termotolerancia, termoestabilidad y actividad estable en medios con disolventes, propiedades altamente deseables a nivel industrial.

La lipasa 135964 descrita por Canseco-Pérez *et al.*, (2018), es la primera encontrada en un hongo filamentoso que contiene el pentapéptido que se creía exclusivo de lipasas bacterianas, por lo que el aislamiento y caracterización de esta nueva lipasa del hongo *T. harzianum*, con posibilidades de presentar características y propiedades típicas de lipasas bacterianas (tolerancia a disolventes y altas temperaturas), genera conocimiento novedoso y la opción de hacer viable un elemento susceptible de explotación en procesos específicos.

HIPÓTESIS

Las lipasas que contienen el pentapéptido AHSMG no son exclusivas de bacterias y la levadura *Trichosporon asahii*.

La lipasa 135964 de *T. harzianum*, que posee el pentapéptido AHSMG, tiene la capacidad de presentar actividad lipolítica en reacciones con temperaturas superiores a 50°C.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la lipasa 135964 de *Trichoderma harzianum* *in silico* y funcionalmente.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar *in silico* la lipasa 135964 de *Trichoderma harzianum*.
- Realizar análisis predictivo de su potencial como enzima termotolerante.
- Determinar si existen ortólogos en otros hongos filamentosos.
- Expresar la lipasa 135964 en *Pichia pastoris*.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La estrategia experimental propuesta para alcanzar los objetivos planteados se muestra en la Figura 1.8.



Figura 1.8 Estrategia experimental para caracterizar a la lipasa 135964 de *T. harzianum*.

La estrategia se divide en tres secciones: la primera corresponde al análisis *in silico* de la secuencia que codifica la lipasa 135964, en el que se incluye la identificación de estructuras y modelamiento de la proteína, predicción de propiedades fisicoquímicas y la búsqueda de ortólogos en otros hongos filamentosos; la segunda corresponde al proceso mediante el cual se clona en vector para su expresión en *Pichia pastoris*, y la tercera implica el aislamiento y análisis funcional de la lipasa.

CAPÍTULO II

CARACTERIZACIÓN IN SILICO DE LA LIPASA 135964 DE TRICHODERMA HARZIANUM.

INTRODUCCIÓN

La Bioinformática es el campo de estudio encargado de desarrollar métodos y programas computacionales para procesar y analizar datos biológicos. En esta área convergen las matemáticas, la biología, la química, la informática y la estadística para la interpretación de dichos datos. Esta disciplina se ha convertido en una herramienta esencial para el estudio de la Biología molecular, Biología de sistemas y las Ciencias ómicas, particularmente en estas últimas, donde se requieren herramientas que puedan procesar datos biológicos extremadamente complejos, en cantidades masivas. De manera general, el proceso de análisis bioinformático sigue los siguientes pasos: procesamiento de datos e identificación de molécula, análisis estadístico, estudio de rutas y modelado (Tu *et al.*, 2018; Schneider y Orchard, 2011; Volmar *et al.*, 2009).

La Bioinformática gestiona la organización y almacenamiento de los grandes volúmenes de datos existentes, de manera que sean accesibles para los investigadores y, a la vez, éstos puedan integrar la nueva información generada. En 2017 ya había 1739 bases de datos biológicas, clasificadas, por tipo de fuente, en secuencias crudas de ADN, secuencias de proteínas, estructuras macromoleculares y genomas secuenciados, entre otras. Las principales bases de datos de secuencias de nucleótidos y proteínas son GenBank, DNA Database of Japan (DDBJ) y el Laboratorio Europeo de Biología Molecular (EMBL, por sus siglas en inglés) (Diniz y Canduri, 2017; Luscombe *et al.*, 2001).

Las técnicas bioinformáticas han permitido predecir la evolución, función y estructura de proteínas, a partir de las bases de datos y a través de algoritmos para comparar secuencias, construir alineamientos múltiples de secuencias, identificar motivos de secuencia conservados, predecir estructuras secundarias y terciarias, calcular la superficie y volumen de la proteína y determinar interacciones, entre otros. Actualmente, existe una amplia variedad de herramientas bioinformáticas disponibles en línea para el estudio de proteínas, como Clustal, BLAST-P, Swiss model, signalP, InterPro scan y PyMOL (Ezema *et al.*, 2022; Luscombe *et al.*, 2001).

Las lipasas son enzimas de la familia α/β hidrolasa capaces de hidrolizar ácidos grasos de cadena larga; la diversidad de propiedades que pueden exhibir las convirtió en una de las enzimas más utilizadas a nivel industrial. Las lipasas presentan una alta diversidad respecto a su estructura y secuencia, por lo que, en la constante búsqueda de lipasas que cumplan con las características deseadas, el trabajo bioinformático se ha dirigido a lograr establecer una predicción sistemática de este tipo de enzimas a partir de información genómica, lo cual representa una menor inversión de tiempo, respecto a la estrategia tradicional de aislamiento y escrutinio de los microorganismos. Sin embargo, el trabajo experimental que valide las predicciones bioinformáticas sigue siendo indispensable (Ezema *et al.*, 2022; Ali *et al.*, 2021; Vorapreeda *et al.*, 2016; Vorapreeda *et al.*, 2015).

MATERIALES Y MÉTODOS

1. DEFINICIÓN DE PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS

Se utilizaron las herramientas ProtParam del portal Expasy (<https://web.expasy.org/protparam/>) y CLC Sequence Viewer 8.0 (software gratuito para descarga) para predecir las propiedades físicoquímicas de la lipasa. En ambos casos se introduce la secuencia primaria de la lipasa y se selecciona la ejecución del análisis.

2. PREDICCIONES A PARTIR DE LA SECUENCIA PRIMARIA DE LA LIPASA

Las características de la lipasa 135964 que se definieron a partir de su secuencia de aminoácidos fueron: la presencia de péptido señal, sitios potenciales de glicosilación, localización subcelular e hidrofobicidad. Se utilizaron las herramientas bioinformáticas/servidores SignalP (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP>) para determinar la presencia de péptido señal, NetNGlyc-1 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetNGlyc-1.0>) para identificar sitios de glicosilación tipo N, NetOGlyc-4 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetOGlyc-4.0>) para identificar sitios de glicosilación tipo O, WoLF PSORT (<https://wolfpsort.hgc.jp/>) para la ubicación subcelular y Peptide 2.0 (<https://www.peptide2.com/>) , a la par de ProtScale (Expasy) (<https://web.expasy.org/protscale/>), para evaluar la hidrofobicidad.

3. MODELADO

Se utilizó el servidor SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) para generar un modelamiento por homología de la estructura que forma la lipasa 135964 de *T. harzianum*. Las opciones del servidor permitieron destacar las estructuras secundarias y el pentapéptido de interés (se seleccionó el pentapéptido en la secuencia primaria y se el programa lo resaltó en la imagen).

4. BÚSQUEDA DE ORTÓLOGOS

Se utilizó la herramienta bioinformática BLAST-P para buscar en la base de datos de proteínas no redundantes de hongos de GenBank (non-redundant taxid 4751, fungi) secuencias similares a la de la lipasa 135964 de *T. harzianum*. La secuencia de aminoácidos de la lipasa 135964 se ingresó como Query en la interfaz de la herramienta y se ejecutó el programa. Se recuperaron las secuencias de los primeros 100 hits y con ellas se procedió a integrar un alineamiento múltiple de secuencias utilizando la herramienta Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). El alineamiento se visualizó en el software Jalview (software de descarga gratuita). Se generó un árbol filogenético con el software MEGA 11.0 utilizando el método de máxima verosimilitud, los parámetros por default del programa y 1000 bootstraps.

RESULTADOS

1. DEFINICIÓN DE PARAMETROS FISICOQUÍMICOS

Los parámetros que se obtuvieron al someter la secuencia de aminoácidos de la lipasa 135964 a los análisis bioinformáticos ProtParam y CLC fueron composición de aminoácidos (Tabla 2.1), masa molecular, carga, índice de inestabilidad e índice alifático y vida media estimada.

a) Composición de aminoácidos.

En este rubro, ambas herramientas arrojaron exactamente los mismos valores (Tabla 2.1).

Tabla 2.1 Composición de aminoácidos de la lipasa 135964.

Aminoácido	Residuos	Porcentaje
Alanina (A)	35	10.3
Arginina (R)	32	9.4
Asparagina (N)	9	2.6
Ácido aspártico (D)	17	5.0
Cisteína (C)	1	0.3
Glutamina (Q)	6	1.8
Ácido Glutámico (E)	14	4.1
Glicina (G)	27	7.9
Histidina (H)	10	2.9
Isoleucina (I)	18	5.3
Leucina (L)	37	10.9
Lisina (K)	9	2.6
Metionina (M)	8	2.4
Fenilalanina (F)	10	2.9
Prolina (P)	21	6.2
Serina (S)	24	7.1
Treonina (T)	23	6.8
Triptófano (W)	7	2.1
Tirosina (Y)	12	3.5
Valina (V)	20	5.9

El aminoácido más abundante de la lipasa 135964 es la Leucina (L) con 37 residuos que equivalen al 10.9% del total de aminoácidos; es uno de los tres aminoácidos ramificados cuya cadena lateral es no polar. Le siguen en abundancia la Alanina (A) y Arginina (R) con 35 y 32

residuos, correspondientes al 10.3% y 9.4%, respectivamente. El aminoácido con menor representación es la Cisteína (C), con un solo residuo que constituye el 0.3% del total de aminoácidos.

b) Masa molecular

La masa molecular calculada para la lipasa 135964, en ambos casos, fue de 37.676 kDa, casi el doble del de las lipasas más pequeñas reportadas, 20kDa, pertenecientes a la subfamilia 1.4 de las triacilglicerol lipasas (Kovacic *et al.*, 2019).

c) Carga

El punto isoelectrico (pI) calculado para la lipasa 135964 fue de 9.78. ProtoParam reportó que el número de residuos cargados negativamente (D + E) fue de 31 y el número de residuos cargados positivamente (R + K) fue de 41.

d) Índice de inestabilidad e índice alifático

El índice de inestabilidad es una medida para estimar si una proteína será estable en un tubo de ensayo; el valor de referencia es 40, si el índice es menor es probable que la proteína sea estable, si el índice es mayor probablemente no lo sea (Guruprasad *et al.*, 1990). ProtParam determinó que para la lipasa 135964 el índice de inestabilidad es de 40.13, clasificándola como una proteína parcialmente inestable. Por otra parte, el índice alifático permite inferir el nivel de termoestabilidad de una proteína con base en que las proteínas de origen termófilo presentan un alto índice alifático y tienden a ser más termoestables (Ikai, 1980). Ambas herramientas calcularon que el índice alifático de la lipasa 135964 es de 90.44, por lo cual se esperaría que sea una enzima termoestable, congruente con lo reportado para las enzimas conocidas de esta familia (Kovacic *et al.*, 2019; Kumari y Gupta, 2015; Chakravorty *et al.*, 2011).

e) Vida media estimada

En ProtParam se determinó que la vida media de la lipasa sería de 30h, *in vitro*; de 20h *in vivo* en levaduras, y de 10h *in vivo* en *E. coli*.

2. PREDICCIONES A PARTIR DE LA SECUENCIA PRIMARIA DE LA LIPASA

En la Tabla 2.2 se resumen los resultados de la predicción, obtenidos después de analizar con diferentes herramientas bioinformáticas a la secuencia primaria de aminoácidos de la lipasa 135964.

Tabla 2.2 Características de la lipasa 135964 predichas a partir de su secuencia primaria y las herramientas utilizadas.

Característica	Herramienta	Predicción
Peptido señal	SignalP	No
Sitos potenciales de N-Glicosilación	NetNGlyc-1	Residuo 99
Sitos potenciales de O-Glicosilación	NetOGlyc-4	8 residuos
Localización subcelular	WoLF PSORT	Mitocondrial
Hidrofobicidad	Peptide 2.0 / ProtScale (Expasy)	45.88% hidrofóbica

3. MODELADO

La herramienta SWISS-MODEL, determinó que la mayor compatibilidad estructural de la lipasa 135964 de *T. harzianum* es con la lipasa 2Z5G de *Geobacillus zalihae*, por lo que tomó su estructura como templado para generar el modelo de la lipasa 135964, el cual se muestra en la Figura 2.1.

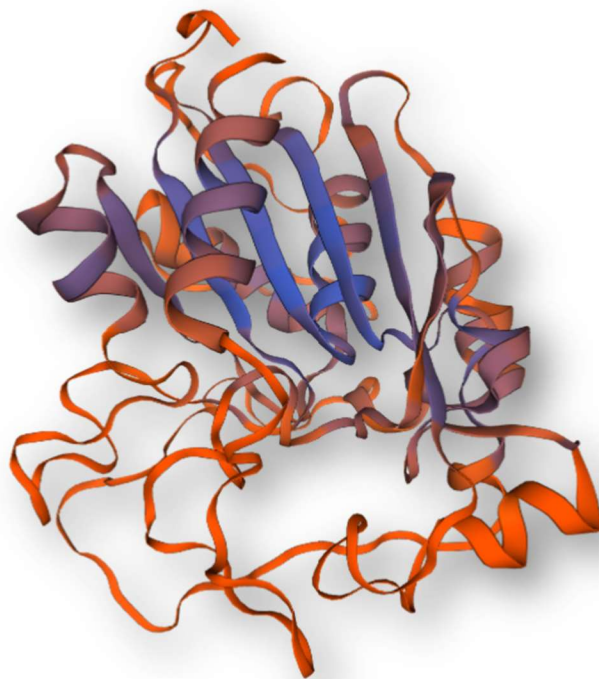


Figura 2.1 Modelo 3D de la lipasa 13964 de *Tricoderma harzianum*, obtenido por homología con la lipasa 2Z5G de *Geobacillus zalihae*.

En el modelo predicho se distinguen las estructuras secundarias características de las lipasas, es decir, las alfa hélices y las láminas beta (Figura 2.2), así como su correspondencia con la secuencia primaria (Figura 2.3). Además, se puede visualizar la ubicación espacial del pentapéptido AHSMG de la lipasa 135964 (Figura 2.4).

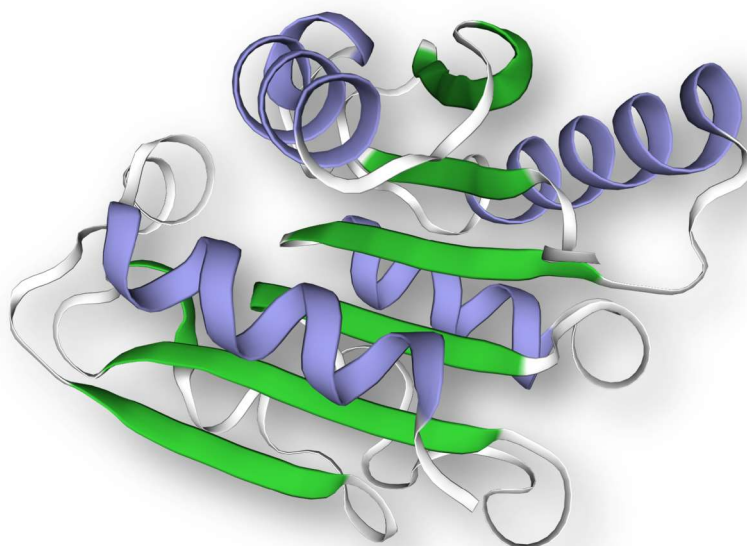


Figura 2.2 Estructuras secundarias de la lipasa 135964. Verde: láminas β . Morado: α -hélices. Generada y visualizada en Swiss model.

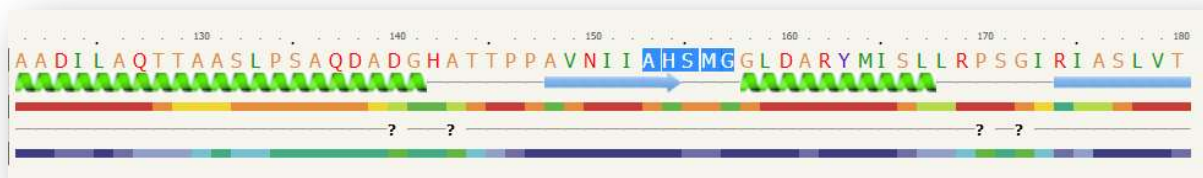


Figura 2.3 Sección de secuencia primaria de lipasa 135964 y su correspondiente estructura secundaria. Generada y visualizada en Swiss model.

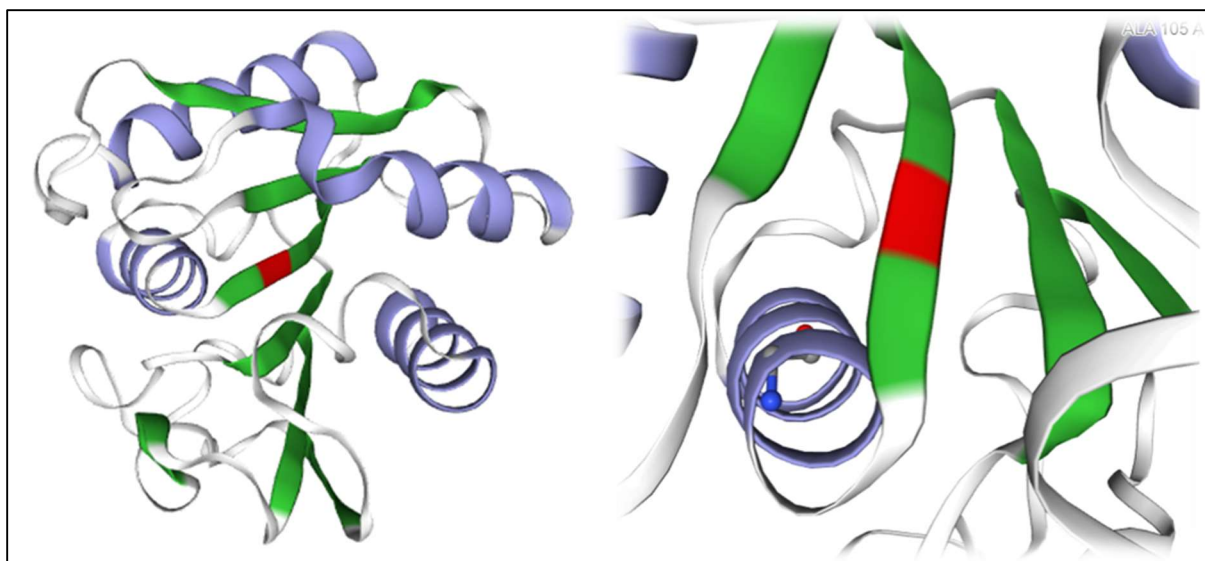


Figura 2.4 Ubicación espacial del pentapéptido AHSMG de la lipasa 135964, resaltado en color rojo. Generada y visualizado en Swiss model.

4. BÚSQUEDA DE ORTÓLOGOS

En la Tabla 2.3 se enlistan los primeros 100 hits obtenidos con la herramienta BLAST-P, correspondientes a las secuencias de proteínas de hongos con mayor identidad con la secuencia de la lipasa 135964 de *T. harzianum*.

Tabla 2.3. Análisis BLAST-P de la lipasa 135964 de *Trichoderma harzianum* con la base de proteínas no redundantes de hongos.

Nombre científico	Query Cover	E value	% identidad	Longitud
<i>Trichoderma harzianum</i>	100%	0	99.71	340
<i>Trichoderma lentiforme</i>	100%	0	97.08	343
<i>Trichoderma harzianum</i> CBS 226.95	100%	0	97.65	339
<i>Trichoderma harzianum</i>	100%	0	97.35	339
<i>Trichoderma simmonsii</i>	100%	0	96.76	336
<i>Trichoderma guizhouense</i>	100%	0	97.35	334
<i>Trichoderma virens</i> FT-333	100%	0	88.92	337
<i>Trichoderma virens</i> Gv29-8	100%	0	89.5	337
<i>Trichoderma harzianum</i>	83%	0	96.11	284

<i>Trichoderma asperellum</i> CBS 433.97	100%	0	78.55	335
<i>Trichoderma arundinaceum</i>	92%	0	83.28	338
<i>Trichoderma asperelloides</i>	100%	0	77.68	335
<i>Trichoderma semiorbis</i>	81%	0	98.57	304
<i>Trichoderma atroviride</i> IMI 206040	92%	0	83.07	337
<i>Trichoderma gracile</i>	100%	0	76.47	357
<i>Trichoderma reesei</i> QM6a	100%	0	76.75	355
<i>Trichoderma longibrachiatum</i> ATCC 18648	100%	3.00E-179	75.93	349
<i>Trichoderma gamsii</i>	100%	3.00E-176	73.02	356
<i>Trichoderma gamsii</i>	100%	5.00E-176	73.02	356
<i>Trichoderma citrinoviride</i>	100%	4.00E-174	75.72	330
<i>Trichoderma cornu-damae</i>	77%	4.00E-153	84.53	264
<i>Hirsutella minnesotensis</i> 3608	92%	1.00E-146	66.67	354
<i>Fusarium</i> sp. AF-6	92%	3.00E-142	65.08	332
<i>Fusarium solani</i>	92%	1.00E-141	64.76	332
<i>Fusarium kuroshium</i>	92%	1.00E-141	65.08	332
<i>Fusarium</i> sp. AF-8	92%	4.00E-141	64.44	332
<i>Fusarium vanettenii</i> 77-13-4	92%	5.00E-141	64.44	332
<i>Fusarium floridanum</i>	92%	7.00E-141	65.08	332
<i>Fusarium ambrosium</i>	89%	3.00E-140	65.79	332
<i>Fusarium albosuccineum</i>	92%	5.00E-140	63.61	352
<i>Fusarium decemcellulare</i>	92%	6.00E-140	63.92	352
<i>Tolypocladium capitatum</i>	89%	3.00E-139	67.78	367
<i>Fusarium sarcochroum</i>	92%	7.00E-139	63.09	334
<i>Stachybotrys chartarum</i> IBT 7711	92%	9.00E-139	63.21	335
<i>Stachybotrys chartarum</i> IBT 40293	92%	1.00E-138	63.21	335
<i>Fusarium flagelliforme</i>	90%	1.00E-138	64.29	334
<i>Stachybotrys chlorohalonata</i> IBT 40285	92%	2.00E-138	62.58	335
<i>Ilyonectria destructans</i>	92%	2.00E-138	66.67	341
<i>Thelonectria olida</i>	92%	3.00E-138	64.35	340
<i>Fusarium</i> sp. FIESC RH6	90%	3.00E-138	63.96	338
<i>Fusarium sporotrichioides</i>	90%	7.00E-138	63.64	351
<i>Ilyonectria</i> sp. MPI-CAGE-AT-0026	92%	1.00E-137	66.35	341
<i>Dactylonectria estremocensis</i>	92%	2.00E-137	64.47	341
<i>Fusarium avenaceum</i>	90%	2.00E-137	64.29	334
<i>Fusarium heterosporum</i>	89%	2.00E-137	64.5	369
<i>Fusarium avenaceum</i>	90%	3.00E-137	63.96	334
<i>Fusarium avenaceum</i>	90%	3.00E-137	63.96	375
<i>Drechmeria coniospora</i>	91%	4.00E-137	62.89	346
<i>Ilyonectria robusta</i>	92%	4.00E-137	66.04	341
<i>Fusarium poae</i>	90%	1.00E-136	62.99	334
<i>Fusarium venenatum</i>	90%	2.00E-136	62.46	334
<i>Fusarium pseudograminearum</i>	89%	2.00E-136	62.87	351

<i>Fusarium graminearum</i>	89%	2.00E-136	62.87	351
<i>Fusarium graminearum</i>	89%	2.00E-136	62.87	351
<i>Fusarium graminearum</i>	89%	3.00E-136	62.87	351
<i>Fusarium sp. MPI-SDFR-AT-0072</i>	92%	3.00E-136	61.83	367
<i>Tolypocladium ophioglossoides</i> CBS 100239	89%	3.00E-136	69.16	343
<i>Drechmeria coniospora</i>	91%	3.00E-136	62.89	386
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>rapae</i>	92%	3.00E-136	61.83	330
<i>Fusarium graminearum</i>	89%	3.00E-136	62.87	334
<i>Fusarium graminearum</i> PH-1	89%	4.00E-136	62.87	334
<i>Hirsutella rhossiliensis</i>	89%	4.00E-136	67.21	320
<i>Fusarium culmorum</i>	89%	5.00E-136	62.87	351
<i>Fusarium redolens</i>	90%	5.00E-136	62.74	336
<i>Fusarium longipes</i>	90%	5.00E-136	62.14	351
<i>Tolypocladium paradoxum</i>	92%	7.00E-136	66.77	338
<i>Fusarium tricinctum</i>	89%	1.00E-135	64.05	334
<i>Clonostachys solani</i>	89%	2.00E-135	64.59	333
<i>Fusarium austroafricanum</i>	90%	5.00E-135	62.66	364
<i>Clonostachys rosea</i>	89%	2.00E-134	63.93	333
<i>Ophiocordyceps sinensis</i> CO18	90%	3.00E-134	66.77	354
<i>Dactylonectria macrodidyma</i>	92%	9.00E-134	63.64	341
<i>Pochonia chlamydosporia</i> 170	89%	6.00E-133	64.82	330
<i>Emericellopsis atlantica</i>	91%	8.00E-133	63.34	335
<i>Trichoderma atroviride</i>	72%	9.00E-133	80.16	272
<i>Fusarium pseudograminearum</i> CS3096	89%	2.00E-131	59.02	371
<i>Fusarium pseudograminearum</i>	89%	3.00E-131	59.02	371
<i>Epichloe festucae</i> FI1	92%	4.00E-131	62.22	328
<i>Fusarium mangiferae</i>	90%	7.00E-131	63.31	330
<i>Fusarium xylarioides</i>	90%	1.00E-130	63.31	330
<i>Ophiocordyceps unilateralis</i>	92%	2.00E-130	62.7	328
<i>Fusarium proliferatum</i>	90%	2.00E-130	63.31	330
<i>Fusarium proliferatum</i> ET1	90%	4.00E-130	62.99	330
<i>Fusarium oxysporum</i> NRRL 32931	90%	4.00E-130	63.31	367
<i>Colletotrichum incanum</i>	92%	6.00E-130	61.71	344
<i>Acremonium chrysogenum</i> ATCC 11550	89%	7.00E-130	63.07	345
<i>Fusarium fujikuroi</i>	90%	7.00E-130	62.99	330
<i>Fusarium fujikuroi</i> IMI 58289	90%	7.00E-130	62.99	330
<i>Fusarium sp.</i> NRRL 25303	89%	1.00E-129	63.19	393
<i>Clonostachys rhizophaga</i>	89%	1.00E-129	59.82	323
<i>Fusarium pseudocircinatum</i>	90%	1.00E-129	62.99	353
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	89%	2.00E-129	62.24	394
<i>Fusarium verticillioides</i>	90%	2.00E-129	62.66	330
<i>Fusarium verticillioides</i> 7600	90%	3.00E-129	62.66	330
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> 4287	90%	4.00E-129	62.99	330

<i>Fusarium oxysporum f. sp. cepae</i>	90%	4.00E-129	63.31	330
<i>Colletotrichum simmondsii</i>	89%	5.00E-129	63.64	342
<i>Fusarium xylarioides</i>	90%	5.00E-129	62.99	330
<i>Colletotrichum sojae</i>	89%	7.00E-129	65.26	355
<i>Fusarium pseudoanthophilum</i>	89%	1.00E-128	63.19	393

El alineamiento múltiple completo obtenido a partir de las secuencias anteriores se presenta en la Figura 2.5. En ella se observa que la región en la que se presenta la mayor divergencia entre estas secuencias es la amino terminal (zona izquierda con menos bloques coloreados), pero a partir del pentapéptido AHSMG (primer bloque coloreado después del bloque blanco en la parte media) inicia la región donde se observa la mayor identidad entre las secuencias (región coloreada de la parte derecha).

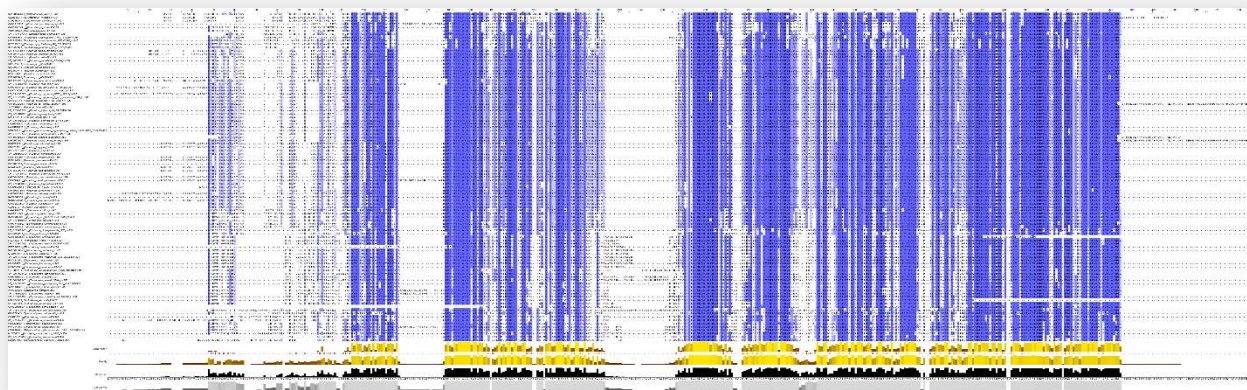


Figura 2.5. Alineamiento múltiple de secuencias ortólogas de la lipasa 135964 de *Trichoderma harzianum*.

En la Figura 2.6 se muestra el alineamiento múltiple de proteínas de diferentes hongos filamentosos que evidencia al pentapéptido de interés AHSMG.

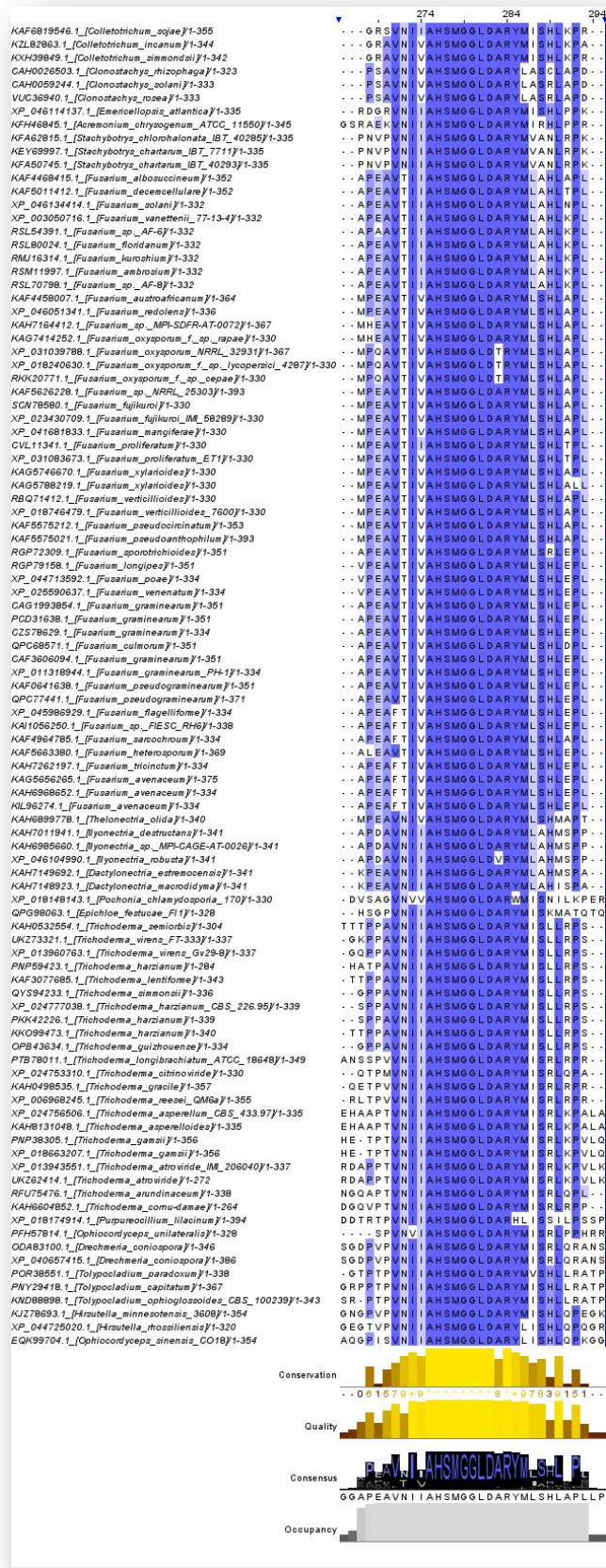


Figura 2.6. Alineamiento múltiple de secuencias en el que se visualiza el pentapéptido de interés AHSMG.

El alineamiento múltiple evidenció amplia presencia del pentapéptido AHSMG en proteínas de hongos; además, se identificó al motivo GLD, exactamente después del pentapéptido de interés, en todas estas proteínas, lo cual podría indicar que el motivo conservado para hongos es AHSMGGLD.

Finalmente, el árbol filogenético generado con la herramienta MEGA 11 se muestra en la Figura 2.7.



Figura 2.7. Árbol filogenético de la lipasa 35964 de *Trichoderma harzianum* y sus homólogos en otros hongos.

El árbol muestra que el pentapéptido AHSMG está presente en proteínas de hongos del orden Hipocreales y Glomerellales; en el primer grupo, la especie con mayor presencia es *Fusarium*, seguida de *Trichoderma*, grupo en el cual se ubicó la lipasa 135964 de *T. harzianum*; mientras que el grupo de los Glomerellales está representado por la especie *Colletotrichum*. La presencia de las especies agrupadas conforme a sus géneros sugiere que la proteína se transmite entre especies cercanas.

DISCUSIÓN

Los aminoácidos que conforman a las proteínas son los responsables de su plegamiento, funcionalidad, estabilidad y solubilidad, siendo la estabilidad de la proteína el elemento crucial que determina su funcionalidad (Ahmad *et al.*, 2020). Los análisis basados en la secuencia primaria siguen siendo valiosos en los estudios de termoestabilidad de las proteínas; estos métodos identifican las diferencias en la composición de aminoácidos entre proteínas termofílicas y mesofílicas, y han evidenciado que las primeras presentan un sesgo significativo en su composición (Liang *et al.*, 2005). Estadísticamente las propiedades más correlacionadas con las proteínas termofílicas son la frecuencia de residuos más grandes, mayor hidrofobicidad de los residuos, más aminoácidos cargados (Glu, Arg y Lys) y pocos residuos polares no cargados (Ser, Thr, Asn y Gln) (Zhou *et al.*, 2008).

Los datos obtenidos en el análisis de composición de aminoácidos para la lipasa 135964 de *T. harzianum* muestran que el residuo más abundante es leucina, aminoácido alifático que contribuye en la generación de las interacciones hidrofóbicas que mantienen la estabilidad interna de una proteína (Creighton, 1993). Por este motivo, su presencia está involucrada en el cálculo del índice alifático y éste se considera como referencia positiva del incremento de la termoestabilidad de una proteína. El estudio comparativo de Lu y colaboradores, 1998, (Lu *et al.*, 1998) entre proteínas homólogas mesofílicas y termofílicas mostró que las últimas tienen un índice alifático promedio más alto, debido a una mayor composición de leucina, coincidiendo con lo reportado por (Ikai, 1980).

El segundo residuo con mayor presencia en la lipasa 13964 es la alanina, aminoácido no polar cuya presencia aumenta la rigidez e hidrofobicidad de una proteína (Chakravarty y Varadarajan, 2000). El contenido de este tipo de aminoácidos es ligeramente mayor en proteínas termofílicas que en aquellas mesofílicas, ya que tienden a interactuar más con los residuos cercanos y tienen mejores formas empaquetadas dentro de la estructura de la proteína. Particularmente, la alanina es el mejor residuo para formar hélices (Argos *et al.*, 1979). El tercer residuo más abundante en la lipasa 13964 es la arginina, aminoácido polar con carga, cuya contribución al mantenimiento de la estabilidad conformacional de la proteína se debe a las interacciones electroestáticas que establece en el exterior de la proteína (Kumar *et al.*, 2000). La arginina tiende a participar en la interacción iónica (puentes salinos) y los enlaces que forma generan un mayor efecto estabilizador, que la lisina, en la estructura de la proteína, por lo que se adapta mejor a las altas temperaturas (Mrabet *et al.*, 1992). Estadísticamente las proteínas termofílicas presentan una

mayor cantidad de aminoácidos cargados, especialmente Arg, Glu y Lys, y la tendencia a contener Arg en lugar de Lys (Trivedi *et al.*, 2006).

La cisteína es un residuo de relevancia significativa para la estructura de una proteína debido a que forma puentes disulfuro, indispensables para el plegamiento de una proteína. Sin embargo, se trata de un aminoácido termolábil que se oxida a altas temperaturas (Russell *et al.*, 1994), por lo que su presencia en proteínas termofílicas es muy baja, como lo reporta Kumar y colaboradores (Kumar *et al.*, 2000).

Las proteínas termoestables son muy solicitadas para aplicarlas en procesos industriales, por lo que para poder cubrir la demanda la estrategia que más se utiliza es la expresión heteróloga, sin embargo, este proceso ha resultado tener una tasa de éxito bastante baja (Gasser *et al.*, 2007). En este sentido, la aplicación de las herramientas bioinformáticas para el análisis de genomas microbianos y librerías metagenómicas tiene la finalidad de facilitar la identificación de proteínas, particularmente lipasas, termoestables, en un periodo de tiempo mucho menor al que implica la búsqueda mediante aislamiento y escrutinio de microorganismos (Vorapreeda *et al.*, 2016).

El análisis de proteínas, basado en su secuencia, constituye una alternativa para el estudio de la termoestabilidad. Al respecto, (Wang *et al.*, 2011) presentó un método de selección de características para identificar propiedades valiosas a partir de su composición de aminoácidos, usando una máquina vector de soporte (SVM, por sus siglas en inglés) y de esta manera detectar proteínas termofílicas. El método fue validado en los estudios de Nakariyakul *et al.*, (2012), y Fan *et al.*, (2016), quienes obtuvieron resultados con una precisión mayor al 93%. En 2018, Pezeshgi Modarres *et al.*, propuso una nueva base de datos de proteínas termofílicas que contiene 14 millones de secuencias de proteínas, clasificadas de acuerdo a su estabilidad térmica y familia a la que pertenecen (Feng *et al.*, 2020).

La función de una proteína, así como su mecanismo de reacción, está relacionada con su estructura, por lo que estudiar dicha característica es de suma importancia para entender y predecir el comportamiento de una proteína (Batumalaie *et al.*, 2018; Mala y Takeuchi, 2008). La aproximación más rápida para conocer la estructura de una proteína la constituye el modelado por homología, en el cual se utilizan datos registrados de proteínas cristalizadas (templados), para generar un modelo en 3D; en este caso, la herramienta bioinformática utilizada, Swiss model, reportó que el templado más adecuado para la lipasa 135964 de *T. harzianum* era el de la lipasa 2Z5G de *Geobacillus zalihae*.

Los miembros del género *Geobacillus* son de gran interés debido a que se trata de cepas termofílicas que de manera natural producen enzimas termoestables. La lipasa T1 de *Geobacillus zalihae* (código PDB 2DSN) se aisló en Malasia a partir de un efluente de aceite de palma, en 2007 (Rahman *et al.*, 2007). Debido a que es una lipasa termoestable que ya cuenta con datos de cristalografía (estructura en 3D), ha sido objeto de diversos estudios bioinformáticos: (Maiangwa *et al.*, 2021; Qin *et al.*, 2021; Ishak *et al.*, 2020; Ishak *et al.*, 2017; Tang *et al.*, 2017; Putri *et al.*, 2017; Rahman *et al.*, 2012), los cuales podrían servir de referencia en análisis bioinformáticos posteriores que se conduzcan con la lipasa 135964.

CAPÍTULO III

EXPRESIÓN EN LEVADURA Y CARACTERIZACIÓN DE UNA LIPASA DE *TRICHODERMA HARZIANUM*.

INTRODUCCIÓN

Las lipasas son serina hidrolasas definidas como triacilglicerol acilhidrolasas (E.C.3.1.1.3) capaces de hidrolizar ácidos carboxílicos de cadena larga y ésteres insolubles en agua. De manera natural, catalizan la hidrólisis del enlace éster de los mono-, di- y triglicéridos produciendo ácidos grasos y glicerol (Casas-Godoy *et al.*, 2018). El sitio activo de estas enzimas consiste en tres residuos catalíticos denominados residuo nucleofílico, residuo ácido catalítico y residuo histidina, que comprende a Ser-Asp/Glu-His en una secuencia consenso de la forma G-X-S-X-G (pentapéptido) (Adetunji y Olaniran, 2021). De acuerdo a la clasificación por familias de estas enzimas (Arpigny y Jaeger, 1999), la subfamilia 1.4 está conformada, casi exclusivamente, por lipasas bacterianas producidas por el género *Bacillus*; todas ellas contienen la secuencia conservada de pentapéptido A-X-S-X-G, con una alanina en la posición 1 (Kovacic *et al.*, 2019). La caracterización de dichas lipasas evidenció un comportamiento termoestable (Kovacic *et al.*, 2019; Chakravorty *et al.*, 2011).

Las lipasas constituyen uno de los grupos más importantes de biocatalizadores para aplicaciones biotecnológicas (Jaeger y Eggert, 2002), y representan el tercer tipo de enzima más comercializado, después de proteasas y carbohidrasas (Adetunji y Olaniran, 2021; Javed *et al.*, 2018). Las lipasas de origen microbiano son la clase de enzima más utilizado en biotecnología y en procesos industriales ya que los microorganismos (bacterias, hongos y levaduras) pueden cultivarse en grandes cantidades dentro de un periodo de tiempo, corto permitiendo una producción masiva de la enzima (Adetunji y Olaniran, 2021; Pérez *et al.*, 2019).

Los hongos filamentosos se utilizan más a menudo para producir lipasas debido a que tienen la facultad de adaptarse más fácilmente en ambientes hostiles (Geoffry y Achur, 2018). Numerosas especies de hongos se han estudiado para investigar el mecanismo de la producción de lipasas y se ha visto que ambientes como suelos contaminados con aceites, productos agrícolas o lácteos, albergan varias especies productoras de lipasas (Alabdall *et al.*, 2020). Derivado de un escrutinio de cepas fúngicas aisladas de residuos lignocelulósicos de una plantación de banana, se identificó una cepa de *T. harzianum* como el aislado con más actividad lipolítica; el subsecuente análisis *in silico* de su genoma reveló la presencia de decenas de lipasas, entre las

que se encuentra una lipasa que presenta el pentapéptido A-X-S-X-G (Canseco-Pérez *et al.*, 2018).

Considerando que la forma canónica del pentapéptido en lipasas fúngicas es G-X-S-X-G (Pérez *et al.*, 2019; Casas-Godoy *et al.*, 2018) y que la única lipasa no bacteriana en la que se ha reportado el pentapéptido A-X-S-X-G, la lipasa ThaL de la levadura *Trichosporon ashaii*, demostró un comportamiento termoestable (Kumari y Gupta, 2015), resulta interesante estudiar a la lipasa de *T. harzianum* que contiene el pentapéptido modificado, pues potencialmente puede ser termoestable. Para tal efecto, en este trabajo se realizó la caracterización *in silico* de la lipasa 135964 de *T. harzianum*, y se comparó *in silico* con otras lipasas que poseen el pentapéptido AHSMG. Asimismo, se clonó en un vector de expresión de *Pichia pastoris*.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIAL BIOLÓGICO

ADNc de conidios de *Trichoderma harzianum* cepa B13-1. *Pichia pastoris* cepa GS115.

2. MÉTODOS

3.2. Clonación

2.1.1. Amplificación de secuencia codificante de la lipasa

La amplificación de la secuencia que codifica la lipasa 135964 se realizó mediante una reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando a la enzima DNA polimerasa de alta fidelidad Phusion High Fidelity (Thermo Fisher Scientific), con oligonucleótidos específicos de la lipasa 135964 (Forward 5'-ATGAAGCAATGGCCCCATTGG-3' y Reverse 5'-TCACAATCCTTCCTTGCCAACATG-3') que alinean en los dos extremos de la secuencia, dNTPs y el ADNc de conidios de *T. harzianum* como templado. La reacción se realizó en un termociclador BioRad bajo las siguientes condiciones: una desnaturalización inicial a 98°C por 30 segundos, seguida de una desnaturalización a 98°C por 10s, una alineación a 65°C por 30s y una extensión a 72°C por 30 segundos, durante 30 ciclos, finalizando con una extensión a 72°C por 5 minutos. El producto de la reacción de PCR se sometió a una electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, durante 30 minutos a 70 V. El gel se tiñó con bromuro de etidio durante 15 minutos. La banda de ADN del tamaño esperado (~1000 pb) se cortó y separó del gel. El ADN se purificó siguiendo el protocolo del paquete comercial QIAquick Gel Extraction (QIAGEN) y la concentración de ADN (ng/μl) recuperado se cuantificó en el equipo Nanodrop a 260/280 nm, utilizando agua ultra pura libre de nucleasas como blanco de lectura.

2.1.2. Inserción en vector pGEM-T Easy

La reacción de ligación del producto de PCR correspondiente a la lipasa en vector pGEM-T Easy (PROMEGA), se realizó en una relación molar inserto: vector de 3:1; la cantidad de inserto necesaria se determinó mediante la fórmula:

$$\frac{50ng \times 1.02 kb}{3.0 kb} \times \frac{3}{1} = 51ng$$

Donde la cantidad destacada en rojo representa el tamaño del inserto (lipasa 135964). Los 50 ng y 3.0kb corresponden a la concentración por μ l y tamaño del vector, respectivamente.

Se utilizó la enzima T4 DNA ligasa, durante 1 hora a temperatura ambiente. El constructo resultante se denominó pGEM-lip13. Este constructo se propagó en *E. coli* Top 10, para lo cual se prepararon células competentes con CaCl_2 . Enseguida se “picó” una colonia y se inoculó en 3-4ml de medio LB líquido, previamente esterilizado. El cultivo se incubó toda la noche a 37°C con agitación; del cultivo resultante, se tomaron 500 μ l de cultivo y se añadieron a 3ml de medio LB líquido, incubándolo durante 30 minutos a 37°C con agitación. Se tomó 1ml de cultivo, se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5ml y se centrifugó durante 3 minutos a 8 000 rpm; se decantó el sobrenadante y a la pastilla de células se le añadieron 500 μ l de CaCl_2 100mM, las células se resuspendieron y se incubaron en hielo durante 20 minutos. Las células competentes se transformaron, con la reacción de ligación, mediante choque térmico y se plaquearon en cajas Petri que contenían medio LB sólido con ampicilina (100mg/ml), X-Gal (20mg/ml) e Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido, IPTG, (100mM). La selección de colonias transformadas se basó en la funcionalidad del gen lacZ presente en el vector pGEM-T Easy. Las bacterias que integraron el vector sin la secuencia recombinante hidrolizarían el X-Gal tornándose de color azul, mientras que las bacterias transformadas con el constructo de interés no metabolizarían el X-Gal por la interrupción del gen lacZ y permanecerían con su natural coloración blanca.

Después de recuperar las colonias blancas (transformadas), se realizó una PCR en colonia para confirmar la presencia de la secuencia que codifica la lipasa 135964 en las transformantes; la reacción se llevó a cabo con un master mix (Ruby Taq Master), oligos M13, forward y reverse, propios del vector pGEM-T Easy y como templado (ADN) de la colonia recuperada, ajustando con agua a un volumen final de 15 μ l. Las condiciones de trabajo fueron las siguientes: una desnaturalización inicial a 94°C durante 3 minutos, seguida de 25 ciclos a 94°C- 1 minuto, 50°C- 30s y 72°C- 1:10 minutos, terminando con una extensión de 5 minutos a 72°C.

Los productos de la PCR en colonia se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1%, durante 35 minutos a 70 V. El gel se tiñó con bromuro de etidio durante 15 minutos y se observó en luz UV en busca de las bandas del tamaño esperado.

Tres colonias positivas, es decir, en las que se observó la banda de alrededor de 1000 pb, se sembraron en medio líquido LB estéril y adicionado con ampicilina 100 mg/ml, y se incubaron toda la noche a 37°C con agitación. El cultivo se utilizó para extraer el plásmido que contiene el

gen de la lipasa 135964, lo cual se realizó con el kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN). La concentración de ADN (ng/μl) recuperado se cuantificó en el equipo Nanodrop a 260/280 nm, utilizando agua ultra pura libre de nucleasas como blanco de lectura.

Todo el procedimiento descrito, también se llevó a cabo con el producto de PCR correspondiente a la lipasa 135964 flanqueada por las secuencias recombinantes del sistema Gateway (adaptadores), lo que resultó en el constructo pGEM-lip13-Gw; éste se recombinó con el casete de entrada pDONR y se generó el constructo pDONR-lip13. El propósito de integrar la secuencia de la lipasa 135964 en un vector con la tecnología Gateway es la versatilidad que representa este sistema para su traslado a cassetes de expresión, como por ejemplo el pYES-DEST 52 de *Saccharomyces cerevisiae*.

2.1.3. Secuenciación

El plásmido que contiene el gen de la lipasa con los adaptadores Gateway (pGEM-lip13-Gw) fue extraído utilizando el paquete comercial QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN). A partir de cada cultivo se realizaron diluciones para obtener las concentraciones requeridas para el análisis de secuenciación y se enviaron, por duplicado, al Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LANBAMA) del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT); la secuenciación se realizó utilizando los iniciadores universales T7 y SP6.

2.1.4. Diseño de cebadores específicos para la lipasa 135964, con adaptadores con sitios de restricción

Tomando como referencia la información de la lipasa 135964 obtenida de la secuenciación, en este trabajo, se diseñaron dos pares de cebadores específicos que llevaron (ambas parejas) el sitio de corte PmlI en la región que corresponde al extremo 5' y el sitio de corte XhoI en la región que corresponde al extremo 3'-terminal, respectivamente. El primer par corresponde a los cebadores que amplifican la secuencia de la lipasa 135964 con una etiqueta de histidina en el extremo 5' (N-terminal de la proteína), identificados como "N-His"; en el segundo par de cebadores se omite el codón de paro de la secuencia de la lipasa, con la intención de utilizar la secuencia de polihistidinas propias del vector de expresión (pPICZ-B), es decir, con estos últimos cebadores la etiqueta de histidina se ubicará en el extremo 3' (C-terminal de la proteína), de la lipasa 135964, identificándolos como "C-His". En ambos casos se utilizaron las herramientas del

software Snapgene para determinar el número de bases de la secuencia de la lipasa 135964 que conformarían los cebadores, agregando los sitios de restricción y 6 bases aleatorias río arriba (5'- PmlI) (3'-XhoI).

2.1.5. Re-amplificación de la secuencia codificante de la lipasa 135964

La re-amplificación de la secuencia que codifica a la lipasa 135964 se realizó mediante una reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando a la enzima DNA polimerasa de alta fidelidad Phusion High Fidelity (Thermo Fisher Scientific), empleando cada par de oligonucleótidos específicos que contienen los sitios de restricción PmlI y XhoI, y el constructo pDONR-lip13 como templado. La reacción se realizó en un termociclador BioRad, bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 98°C por 30 segundos, seguida de una desnaturalización a 98°C por 10s, alineación a 65°C por 20s y una extensión a 72°C por 30s, durante 35 ciclos, finalizando con una extensión a 72°C por 10 minutos. El producto de la PCR se sometió a electroforesis en gel de 0.8% de agarosa, durante 30 minutos a 70 V. Enseguida, el gel se tiñó con bromuro de etidio durante 15 minutos, se lavó y se observó bajo luz ultravioleta. La banda del amplicón de ADN con el tamaño esperado (aproximadamente 1000 pb) se escindió del gel y el ADN se purificó siguiendo el protocolo del paquete comercial QIAquick Gel Extraction (QIAGEN). La concentración de ADN (ng/μl) se determinó utilizando la relación de los valores de absorbancia obtenidos a 260 y 280 nm en el equipo Nanodrop. Como blanco de lectura se utilizó agua ultra pura libre de nucleasas.

2.1.6. Inserción de la lipasa 135964 con sitios de restricción (RE) en vector pGEM-T Easy

La reacción de ligación entre la lipasa 135964 RE (producto de PCR) y el vector pGEM-T Easy (PROMEGA) se realizó en una relación molar inserto: vector de 3:1, utilizando la enzima T4 DNA ligasa (Invitrogen), durante 1 hora a temperatura ambiente, obteniendo los constructos **pGEM-lip13-NH** y **pGEM-lip13-CH**. Estos constructos se propagaron en *E. coli* Top 10 y se continuaron los análisis como se ha descrito previamente. Después de recuperar las colonias blancas (transformadas), se realizó una PCR en colonia para confirmar la presencia de la secuencia de la lipasa 135964 RE en las transformantes; la reacción se llevó a cabo con un master mix (Dream Taq HS Green), oligos N-His y C-His y como templado la colonia recuperada, ajustando con agua a un volumen final de 15μl. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: una

desnaturalización inicial a 95°C durante 3 minutos, seguida de 30 ciclos a 95°C- 1 minuto, 68°C- 30s y 72°C- 1 minuto, terminando con una extensión de 5 minutos a 72°C.

Los productos de la PCR en colonia se analizaron por electroforesis, siguiendo las condiciones ya descritas.

Dos colonias positivas “N-His” y dos positivas “C-His”, se sembraron en medio líquido LB con ampicilina, previamente esterilizado, y se incubaron toda la noche a 37°C con agitación a 180 rpm. Los cultivos se utilizaron para extraer los plásmidos pGEM-lip13-NH y pGEM-lip13-CH con el paquete comercial QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN). La concentración de ADN (ng/μl) se determinó utilizando la relación de los valores de absorbancia obtenidos a 260 y 280 nm en el equipo Nanodrop. Como blanco de lectura se utilizó agua ultra pura libre de nucleasas.

2.2. Expresión

2.2.1. Digestión con enzimas de restricción

Los constructos pGEM-lip13-NH y pGEM-lip13-CH, así como el vector pPICZ- B, se sometieron a una digestión con PmlI (Eco721) y XhoI; para PmlI la reacción se incubó durante 16 horas a 37°C, seguida de una inactivación a 65°C durante 20 minutos. Para la digestión con XhoI la reacción se incubó 5 minutos a 37°C y se inactivó a 80°C durante 5 minutos, de acuerdo con las indicaciones del proveedor (Thermo Scientific).

Una alícuota de cada reacción se sometió a una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% para confirmar la linearización del vector (banda de 5kb para pGEM y 3kb para pPICZ). Una vez que se confirmó la adecuada linearización de los vectores, el resto de la reacción de digestión se sometió a electroforesis en gel de 0.8% de agarosa, para purificar el vector pPICZ linearizado y el pGEM-T-lipasa 13964. Una vez visualizadas las bandas resultantes se purificaron utilizando el paquete comercial QIAquick Gel Extraction (QIAGEN) y su concentración se determinó con Nanodrop.

Los vectores linearizados se sometieron a digestión con XhoI y se repitió el procedimiento descrito en el párrafo anterior, esperando la liberación de un inserto de 1kb a partir del vector pGEM-T, correspondiente a la lipasa 135964 (inserto lipasa 135964 RE).

2.2.2. Subclonación de la lipasa 135964 en vector de expresión pPICZ-B

La reacción de ligación entre los insertos de 1kb correspondientes a la lipasa13-NH y lipasa13-CH, y el vector de expresión pPICZ-B, se realizó en una relación molar inserto: vector de 4:1, durante toda la noche a 4°C, utilizando la enzima T4 DNA ligasa (PROMEGA), para obtener los constructos PICZ-Lip13NH y PICZ-Lip13CH. Una vez obtenidos, estos constructos se se transformaron en células competentes de *E. coli* Top 10 mediante choque térmico; las células transformadas se plaquearon en cajas Petri que contenían medio LB sólido con 25µg/ml de Zeocina (Thermo Scientific). Las colonias recuperadas se sometieron a una PCR en colonia para confirmar la presencia de la secuencia de la lipasa 135964 en las células transformantes; la reacción se llevó a cabo con un master mix (Dream Taq HS Green), oligos nativos de la lipasa 135964 y como templado la colonia recuperada, ajustando con agua a un volumen final de 15µl. Las condiciones de trabajo fueron las siguientes: una desnaturalización inicial a 95°C durante 3 minutos, seguida de 30 ciclos a 95°C- 30 s, 60°C- 30s y 72°C- 1 minuto, terminando con una extensión de 5 minutos a 72°C.

Los productos de la PCR en colonia se analizaron por electroforesis, siguiendo las condiciones ya descritas.

Las colonias positivas se sembraron en medio líquido LB con Zeocina (25µg/ml) y se incubaron toda la noche a 37°C con agitación. Los cultivos se utilizaron para extraer los plásmidos PICZ-Lip13NH y PICZ-Lip13CH con el paquete comercial QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN). La concentración de plásmido recuperada (ng/µl) se determinó con el equipo Nanodrop, utilizando agua ultra pura libre de nucleasas como blanco de lectura.

Dichos plásmidos se utilizaron como templado para realizar una PCR y confirmar la presencia de la lipasa 135964 RE, por lo cual se utilizaron los oligos N-His y C-His con un master mix (Dream Taq HS Green), ajustando con agua a un volumen final de 15µl. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: una desnaturalización inicial a 95°C durante 4 minutos, seguida de 30 ciclos a 95°C- 30 s, 68°C- 30s y 72°C- 1 minuto, terminando con una extensión de 5 minutos a 72°C. Los productos de la PCR en colonia se analizaron por electroforesis en geles de agarosa 1%.

2.2.3. Secuenciación de vector de expresión

El plásmido correspondiente al vector de expresión que contiene insertada la secuencia codificante de la lipasa 135964 con la etiqueta de histidina en el amino terminal (PICZ-Lip13NH) fue extraído de un cultivo de *E. coli* Top 10 utilizando el paquete comercial QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN). Se realizaron diluciones para obtener las concentraciones requeridas para el análisis de secuenciación y se enviaron, por duplicado, al Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LANBAMA) del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT); la secuenciación se realizó utilizando los iniciadores específicos para el vector pPICZ-B, los cuales fueron proporcionados junto con el plásmido.

2.2.4. Transformación de levadura *P. pastoris*

Las células competentes de *P. pastoris* GS115 se prepararon siguiendo las indicaciones del manual del paquete comercial *Pichia* EasyComp (Invitrogen). Después, los constructos PICZ-Lip13NH y PICZ-Lip13CH se linealizaron mediante la digestión con BglII (Anza, Thermo Scientific) en una reacción de 15 minutos a 37°C. El vector de expresión vacío, pPICZ-B, se linealizó con la enzima SacI (Invitrogen) en una reacción de 1h a 37°C, seguida de una inactivación a 65°C durante 20 minutos. Una pequeña alícuota de cada digestión se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, para confirmar la presencia de una banda de tamaño aproximado de 4300 pb para los constructos y de 3.3 kb para el vector vacío. Cada vector linealizado se utilizó para la transformación por choque térmico de las células competentes de *P. pastoris*, siguiendo el manual del paquete comercial EasySelect™ *Pichia* Expression Kit (Invitrogen). Las células transformadas se plaquearon en cajas Petri con medio YPDS sólido con Zeocina (100µg/ml) y se incubaron de 2 a 4 días a 30°C. La confirmación de colonias transformadas se realizó por medio de PCR en colonia, utilizando los oligonucleótidos específicos de la lipasa 135964.

2.2.5. Extracción de ADN genómico de *P. pastoris*

A partir de una colonia positiva de *P. pastoris* transformada con el constructo PICZ-Lip13NH se preparó un cultivo de 3ml de medio YPD líquido durante 24h. Las células se recuperaron mediante centrifugación a 16000 x g durante 30 segundos, descartando el sobrenadante. Las células se re suspendieron en 230 µl de amortiguador de lisis para ADN (2% Tritón X-100, 1%

SDS, 0.1M NaCl, 1mM EDTA pH8, 10mM Tris-HCl pH8), se añadieron 0.4g de perlas de vidrio con baño ácido y 200 µl fenol:cloroformo:alcohol isoamílico; se agitó en vórtex a máxima velocidad por 3 minutos. Se centrifugó a 16000 x g durante 5 minutos y la fase superior se transfirió a un nuevo tubo, se le añadieron 600 µl de etanol 95% frío y se incubó a -20°C durante 30 minutos. Concluida la incubación, la mezcla se centrifugó a 16000 x g durante 15 minutos, se descartó el etanol y el tubo se dejó secar a temperatura ambiente durante 30 minutos. El ADN se resuspendió en 200 µl de amortiguador TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0), añadiendo 5 µl de RNasa A e incubando a 37°C por 10 minutos. Enseguida se le añadieron 8 µl de 5M NaCl y 430 µl de etanol 95% frío y se incubó a -20°C durante 30 minutos. El ADN se decantó centrifugando a 16000 x g durante 15 minutos; el etanol se descartó y el ADN se dejó secar a temperatura ambiente. Finalmente, la pastilla se re suspendió en 25 µl de agua ultra pura.

2.2.6. Inducción de expresión en *P. pastoris*.

Una de las colonias confirmada como positiva se inoculó en 25ml de medio MGYH (1.34% YNB, 1% glicerol, $4 \times 10^{-5}\%$ biotina y 0.004% histidina) y se incubó toda la noche a 30°C con agitación. Se midió la OD₆₀₀ del cultivo a las 24h y se calculó el volumen de cultivo requerido para iniciar la inducción con una OD₆₀₀=1 en un volumen de 300ml. Las células se recuperaron mediante centrifugación por 5 minutos a 1500 x g y 4°C; la pastilla resultante se lavó tres veces con agua destilada estéril y una última vez con MMH (1.34% YNB, $4 \times 10^{-5}\%$ biotina y 2% metanol), para finalmente resuspenderla en 2-3ml de MMH.

La expresión de la lipasa 135964 se indujo adicionando el paquete celular en 300ml de MMH, e incubando a 30°C con agitación. Cada 24h se adicionó metanol al cultivo para mantener una concentración final de 2% en el matraz de cultivo. Se tomaron muestras de 100ml a diferentes tiempos: 48, 72 y 96 horas. A cada muestra se le determinó la OD₆₀₀, usando MMH como blanco de lectura, en un espectrómetro Cole Parmer. Las células se recuperaron por centrifugación (1500 x g-5 minutos-4°C) y se resuspendieron en 2 ml de agua destilada estéril; se transfirieron a un tubo para microcentrífuga y se centrifugaron por 30 segundos a máxima velocidad. Finalmente, se descartó el sobrenadante y el tubo se envolvió en varias capas de papel, para almacenarlo a -80°C hasta su uso.

Las células recuperadas se lavaron con amortiguador de fosfatos (0.1M Fosfato de Sodio pH7.4, glicerol 20%) y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos a 4°C. Para determinar cuánto

volumen de amortiguador se usaría en la lisis del paquete celular se tomó como referencia el peso del paquete celular; para esto, se consideró que 1µg fuera equivalente a 1µl, y que el volumen final de amortiguador para la lisis correspondiera a una relación peso: volumen de 1:2, es decir, que por cada microgramo de paquete celular recuperado, se utilizaran 2µl de amortiguador para lisarlo. Las células se lisaron mecánicamente añadiendo perlas de vidrio previamente bañadas en ácido y colocando el tubo en el vórtex durante 3 minutos a máxima velocidad. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 1500 x g durante 5 minutos a 4°C, el sobrenadante (extracto crudo de proteína) se transfirió a un nuevo tubo y se guardó a -20°C hasta su uso.

Los residuos celulares se resuspendieron en amortiguador de fosfatos y se colocaron en un nuevo tubo. Este se centrifugó a máxima velocidad por dos minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante. La pastilla se re suspendió en 500 µl de amortiguador de fosfatos con 1%v/v de Tritón X-100 y se dejó en agitación suave, a 4°C, durante 30 minutos. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 1500 x g durante 5 minutos a 4°C, el sobrenadante (fracción insoluble) se transfirió a un nuevo tubo y se guardó a -20°C hasta su uso.

2.3. Caracterización

2.3.1. Purificación de la lipasa

La separación de la lipasa 135964 del extracto crudo de proteína se realizó mediante cromatografía de afinidad de níquel-histidina; para esto, a una columna de cristal (BioRad), se le agregó 0.5ml de resina Ni-NTA agarosa, una vez que la resina se empacó, se descartó el líquido; enseguida se agregó 1ml de “amortiguador de inicio” (50mM fosfato de sodio monobásico, 0.5mM Imidazol) y se incubó por una hora. El amortiguador de inicio se descartó y la resina se agregó nuevamente con 3ml de “amortiguador de inicio”, se cerró la columna y se dejó equilibrar toda la noche a 4°C.

Al día siguiente, se retiró el amortiguador de la columna y a la resina se le agregó 1ml de extracto crudo de proteína previamente filtrado y se incubó en refrigeración por al menos 12 horas. Se recuperó el extracto crudo y la resina se lavó con 3ml de amortiguador (50mM fosfato de sodio monobásico), el cual se recuperó en un tubo Falcon.

La elución de la proteína 135964 a partir de la resina de Níquel, se realizó con 500 µl de amortiguador 50mM fosfato de sodio monobásico conteniendo concentraciones crecientes de imidazol: 20, 100, 150, 250 y 300mM; con cada concentración se mantuvo el contacto de la solución con la resina durante 15 minutos; todas se analizaron mediante el ensayo de actividad enzimática, inmediatamente después de su recuperación. Las fracciones recuperadas se conservaron a -20°C hasta su análisis.

2.3.2. Cuantificación de proteína

La concentración de proteína en los extractos crudos como en los eluatos, se determinó mediante el método de Bradford, leyendo la absorbancia a 595nm (Kruger, 2002). Se preparó una curva de referencia (por duplicado) de 1 a 25µg de proteína, utilizando BSA como estándar. Las muestras se prepararon por duplicado utilizando 5µl de cada extracto.

Debido a las interferencias que genera la presencia de detergentes en la aplicación del método de Bradford, se utilizó el método de Peterson (Peterson, 1977) para cuantificar los extractos y eluatos de la fracción insoluble.

2.3.3. Electroforesis SDS-PAGE

El perfil de polipéptidos del extracto crudo de proteína, de la fracción insoluble y de sus correspondientes eluatos se obtuvo mediante una electroforesis disociante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) analizando aproximadamente 20µg de proteína por carril. Brevemente, las muestras se calentaron a 95°C durante 10 minutos y enseguida se colocaron en hielo, donde se mantuvieron hasta el momento de cargarlas en el gel de apilamiento. La electroforesis se realizó a 50V hasta que las muestras pasaron el gel de apilamiento y a 80V en el gel de separación. El gel se tiñó con azul de Coomassie durante toda la noche. Al día siguiente se destiñó sumergiéndolo en una solución de etanol 25% y ácido acético 10%. En las muestras con bajas concentraciones de proteína, los geles se cargaron con 1µg de muestra y se tiñeron con plata.

2.3.4. Actividad enzimática de lipasa

El ensayo de actividad enzimática se realizó de acuerdo con lo reportado por (Winkler y Stuckmann, 1979) donde se utiliza p-nitrofenil palmitato (PNP) como sustrato. El ensayo se realizó a 37°C durante 15 minutos y se midió la densidad óptica a 410 nm, utilizando como blanco de lectura a la solución sin enzima (sin extracto). Una unidad enzimática corresponde a 1nmol de p-nitrofenol liberado del sustrato $\text{ml}^{-1} \text{min}^{-1}$.

2.3.5. Western Blot

Las muestras se sometieron a una electroforesis SDS-PAGE, con un gel resolvidor al 12% y uno de apilamiento al 4%, y se desarrolló a 80V durante 2.5h. Las proteínas fueron electrotransferidas a una membrana de PVDF, para lo cual se siguió el procedimiento que a continuación se enlista:

- a) Incubar la membrana de PVDF en metanol 100% durante 2 minutos y después equilibrarla en el amortiguador de transferencia por 5 min.
- b) Cortar el papel filtro para que coincidan con el tamaño de las esponjas del equipo de transferencia.
- c) Cortar la membrana de PVDF con un margen de 3mm más grande que el gel.
- d) Equilibrar el gel en el amortiguador de transferencia durante 5 min.
- e) Empapar la membrana, el papel filtro y las esponjas en el amortiguador de transferencia.
- f) Armar el “blot sándwich”, asegurando que la membrana esté entre el ánodo (+) y el gel en el cátodo (-). Remover las burbujas de aire entre la membrana y el gel.
- g) Colocar el casete de transferencia en la cámara de electrotransferencia de manera que coincidan el color de la cara del casete con el de la cámara (negro-negro).
- h) Llenar la cámara con el amortiguador de transferencia, hasta el borde de la cámara, y colocar un agitador magnético en el fondo de la cámara.
- i) Colocar la tapa de la cámara y conectar los cables a la fuente de poder. Correr a 50V durante toda la noche a 4°C.
- j) Remover el casete y abrir el sandwich. Retirar la membrana y hacer un pequeño corte en la esquina superior derecha para identificar la cara frontal y parte superior del gel * El marcador de peso molecular de proteínas debe quedar del lado izquierdo de la membrana.
- k) Teñir la membrana con rojo de Ponceau (*Solución a 5X), para verificar el éxito de la electrotransferencia de las proteínas.

BLOQUEO

- a) Lavar la membrana con amortiguador TBST (20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.6; 0.1% (v/v) Tween-20), 1x 10 min, en agitación constante, a temperatura ambiente.
- b) Disolver 5% de leche y 1% de caseína en amortiguador TBS, con agitación. *Solución de bloqueo (40 ml).
- c) Cubrir la membrana con solución de bloqueo e incubar durante 2h, en agitación constante, a temperatura ambiente.
- d) Lavar la membrana con amortiguador TBST, 3x 10 min, en agitación constante, a temperatura ambiente.

INCUBACIÓN CON ANTICUERPO PRIMARIO (PRIMER ANTICUERPO)

- a) Preparar la dilución del primer anticuerpo, 1:1000, en solución de bloqueo (20 ml). Justo antes de usar y manteniendo en hielo la preparación.
- b) Incubar la membrana con la dilución del primer anticuerpo durante toda la noche a 4°C, y en agitación constante.
- c) Recuperar el anticuerpo (solución) en un tubo Falcon de 50ml, etiquetar y almacenar a -20°C.
- d) Lavar la membrana con amortiguador TBST, 3x 10 min, en agitación constante, a temperatura ambiente.

SEGUNDO ANTICUERPO

- a) Preparar la dilución del segundo anticuerpo en amortiguador TBS, 1:10 000 (20ml).
- b) Incubar la membrana con la dilución del segundo anticuerpo toda la noche a 4°C, con balanceo.
- c) Recuperar el anticuerpo (solución) en un tubo falcón de 50ml, etiquetar y almacenar a -20°C.
- d) Lavar la membrana con buffer TBST, 3x 10 min, con balanceo, a temperatura ambiente.

REVELADO

Incubar la membrana por 30 minutos en el amortiguado de revelado de la actividad de la fosfatasa alcalina, compuesto de 0.1M Tris, 0.1M NaCl, 0.1M MgCl₂, pH 9.5, y adicionado con 118.7µl de nitroazul de tetrazolio (NBT, solución madre de 50mg/ml en 70% (v/v) de dimetilformamida) y 76

μl de bromo-cloro-indolil-fosfato (BCPI, solución madre de 50mg/ml en 100% v/v dimetilformamida). La reacción positiva genera bandas de color morado en la membrana.

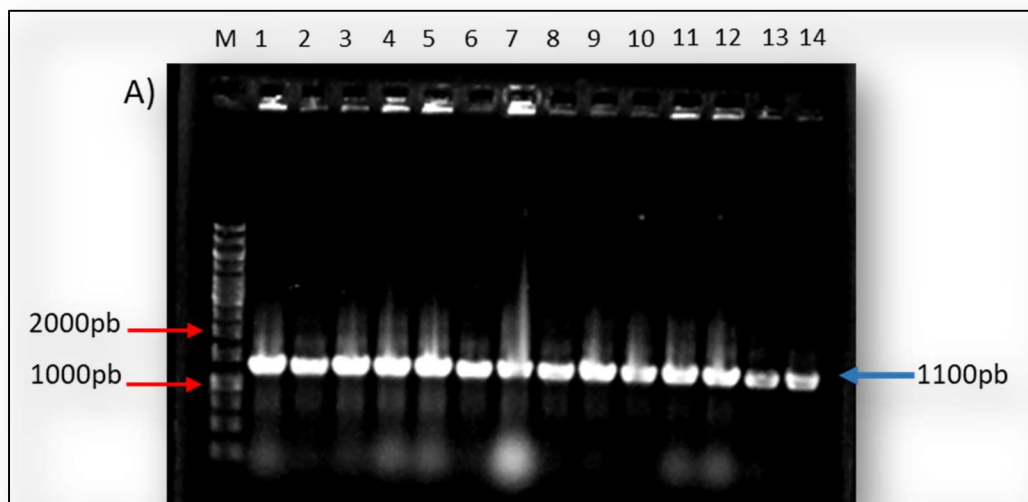
RESULTADOS

1. CLONACIÓN

1.1. Inserción en vector pGEM-T Easy

De acuerdo con la concentración de inserto obtenida después de su purificación (8.9ng/μl), se utilizaron en total 5.7μl para la reacción de ligación, con la cual se transformaron las células competentes de *E. coli* Top 10. Se recuperaron 32 colonias y se les realizó PCR en colonia a 16 de ellas, utilizando oligos M13 de pGEM-T Easy.

Las células recombinantes conteniendo al vector pGEM-Lip fueron analizadas por PCR. En la Figura 3.1 se muestran las bandas del amplicón esperado con el tamaño estimado de 1100 pb, correspondientes a la región codificante de la lipasa 135964. El control negativo (vector vacío) corresponde al tamaño de 150 pb correspondiente al sitio múltiple de clonación del vector y el sitio de hibridación de los oligos M13.



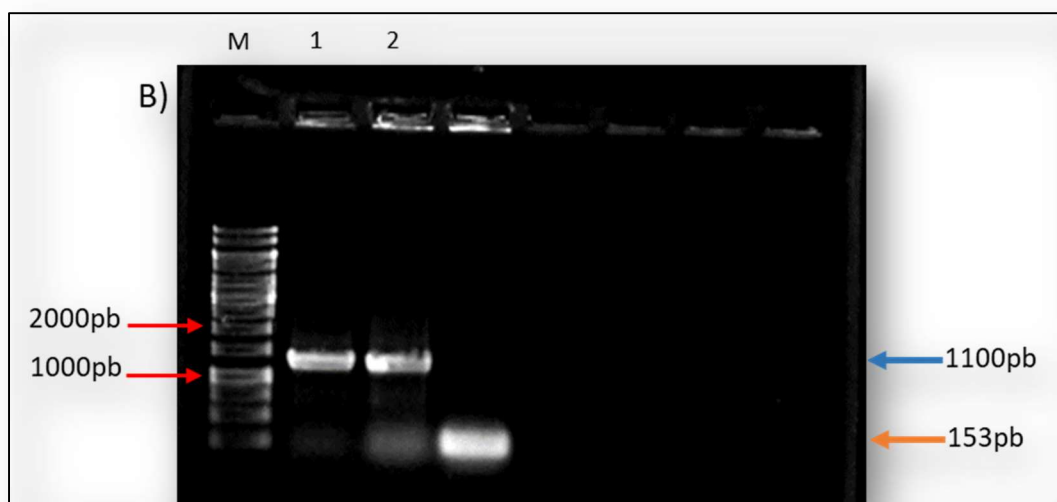


Figura 3.1 Análisis en gel de agarosa de los productos de PCR en colonia obtenidos de *E. coli* recombinantes conteniendo la región ORF de la lipasa 135964. A) M: Marcador molecular GeneRuler 1kb DNA Ladder. Carril1-14: Clonas positivas. B) M: Marcador molecular GeneRuler 1kb DNA Ladder. Carril 1 y 2: Clonas positivas 15 y 16. Carril 3: control negativo. La flecha en azul indica el amplicón esperado de 1100 pb mientras que la flecha en naranja indica el amplicón de 153 pb del control negativo.

A partir de cultivos en medio LB de las colonias 3, 4 y 5, se extrajo plásmido (pGEM-lip13), con las siguientes concentraciones: C3= 43.2 ng/μl, C4= 48.7 ng/ μl y C5= 21.8 ng/μl.

1.2. Secuenciación

A partir de los plásmidos pGEM-Lip13, se prepararon diluciones de 20ng/μl y se enviaron a secuenciar.

La secuenciación de oligonucleótidos confirmó que el producto clonado corresponde a la región codificante de la lipasa 135964 de *T. harzianum* B13-1 y que su orientación está acorde con el marco de lectura 5'-3'; de esta manera, también se tiene la certeza que la secuencia de la lipasa de interés también contiene la secuencia correcta de la etiqueta de histidina (Figura 3.2)

ATGCATCATCACCATCACCAT

ATGAAGCAATGGCCCCATTGGCGCGGCACTCGCCTCCCGCGCTCCTTGCTAAGCCTACAG
CCATCGACCTTGCGGGTCTTTAGTACCGCAAAACCGCTCCGTACGATCCTCGCATCCGT
GACCTCGGGCGACTTATACACGATGACTACGCTACCATCCGCGAGACCTACGCTACGCCA
AAGTACCCGATTGTCCTGGCTCACGGCCTATTGGGCTTCTCCGAGCTCAGAGTCTCGCCA
CTTCTACCCACGATCGAGTACTGGAACGGCATCAAGCAGGCCCTCACGGCAAACAACCTGC
ACCGTCATCACCGCCACCGTCCCGCCCTCCGGCTCCATCGAGGAGCGCGCCGCCAAGCT
CGCCGCCGACATCCTCGCGCAGACAACCGCCGCCTCGCTCCCCTCCGCCCAGGACGCAG
ACGGCCATGCGACTACGCCGCCCGCCGTCAACATCATCGCCCACAGCATGGGAGGGCTG
GACGCCCCGGTACATGATCTCCCTGCTGCGCCCGTCGGGCATACGGATCGCCTCGCTCGT
GACGATTGCCACGCCGCATCGCGGGAGCAGCTTTGCGGATTACCTGGTCGAGCGCGGCG
CCGGGCCGCTCCACCTGCCGCGGTTGTACGGCGTGATTCGGCGCGCTGGATTGGGTACG
TCTGCGTTTGGGCAGCTCACGACGCGGTACATGCGCGAGGAGTTCAACCCGCGGGTGCG
CGACGACGAGGCGGTGCGCTACTTTTCGTACGGGGCGGCCATTGACGAGCCGTCGCTGC
TAGGGGCATTTCCGCTTCCGCACGGCGTCGTGGACAAGAGGGAGGGGGAGAATGATGGG
TTGGTCAGCGTCAAGAGCAGTCGTTGGGGAGTGTACAAGGGGACGCTGATGGGGGTTAG
CCATTTGGATCTGATCAATTGGTCAATCGCGCGAGGTGGACGGTGAGGGAGTGGATGGG
CATGAGGAGGACGTTTAATGCTGTGGCGTTCTACCTGGATGTGGCCGACATGTTGGCCAA
GGAAGGATTGTGA (1023 b)

Figura 3.2 Secuencia de nucleótidos de la lipasa 135964 de *Trichoderma harzianum* obtenida a partir de la secuenciación de los plásmidos recombinantes. La sección resaltada en verde corresponde a la etiqueta de histidina.

Secuencia traducida a proteína.

La secuencia de nucleótidos de la lipasa 135964 fue traducida *in silico* a su secuencia deducida de aminoácidos (Figura 3.3); se destaca en rojo el pentapéptido AHSMG y en amarillo los aminoácidos correspondientes a la tríada catalítica. Todos estos elementos se encuentran localizados un lugar por delante del identificado en el estudio *in silico* (secuencia obtenida del portal).

MKQWPHWRGTRLPRSLLSLQPSTLRVFSTAKPLRHDPRIIDLGRLIHDDYATIRETYATP
 KYPIVLAHGLFGFSELRVSPLLPTIEYWNGIKQALTANNCTVITATVPPSGSIEERAACL
 AADILAQTTAASLPSAQDADGHATTPAVNIIAHSMGGLDARYMISLLRPSGIRIASLVT
 IATPHRGSSFADYLVERGAGPLHLPRLYGVIIRAGLGTSAFGQLTTRYMREEFNPRVRDD
 EAVRYFSYGAAIDEPSLLGAFRLPHGVVDKREGENDGLVSVKSSRWGVYKGTLMGVSHL
 DLINWSNRARWTVREWMGMRRTFNAFAFYLDVADMLAKEGL-

(340 aa) {339}

Pentapéptido A-153 {152} G-157 {156}

Triada S- 155 {154}, D-276 {275}, H-298 {297}

Figura 3.3 Secuencia deducida de aminoácidos de la lipasa 135964 de *Trichoderma harzianum*.

La secuencia de aminoácidos deducida (LipCLON) se alineó con la secuencia de aminoácidos de la secuencia con ID 135964 obtenida del portal de *T. harzianum* (LipOR) obteniendo una puntuación de 97.05 en identidad. En la Figura 3.4 se muestra el alineamiento; se resalta en amarillo las diferencias entre ambas secuencias de aminoácidos. Se observa una inserción de una treonina (resaltado en verde) en la secuencia obtenida en el presente trabajo y varios cambios conservativos (resaltados en amarillo). Las diferencias pueden deberse a que se trata de dos cepas diferentes de *T. harzianum*. Cabe mencionar que el producto obtenido en este trabajo fue secuenciado dos veces en cada dirección, lo que confirma que la secuencia de la lipasa de la cepa B13-1 (este trabajo) es correcta.

LipOR	MKQWPHWRGTRLPRSLLSLQPSASRVFSTTKPLRHDPRI RDLGRLIHDDYATIRETYATP
LipCLON	MKQWPHWRGTRLPRSLLSLQPS TL RVFSTAKPLRHDPRI RDLGRLIHDDYATIRETYATP
	*****:*****:*****
LipOR	KYPIVLAHGLFGFSELRVSPLLPTIEYWNGIKQALTANNCTVITATVPSPSGSIEERA AKL
LipCLON	KYPIVLAHGLFGFSELRVSPLLPTIEYWNGIKQALTANNCTVITATVPSPSGSIEERA AKL

LipOR	AADILAQTTAASLPSAQDAEGHASPPAVNIIAHSMGGLDARYMISLLRPSGIQIASLVT
LipCLON	AADILAQTTAASLPSAQDADGHATTTPAVNIIAHSMGGLDARYMISLLRPSGIRIASLVT
	*****:***:*****:*****
LipOR	IATPHRGSSFADYLVERGAGPLHLPRLYGVIRRAGLGTSAFGQLTTRYMREEFNPRVRDD
LipCLON	IATPHRGSSFADYLVERGAGPLHLPRLYGVIRRAGLGTSAFGQLTTRYMREEFNPRVRDD

LipOR	EGVRYFSYGAAIDEPSSLGAFRLPHGVVDKREGENGLVSVKSSRWGVYKGTLMGVSHLD
LipCLON	EAVRYFSYGAAIDEPSSLGAFRLPHGVVDKREGENGLVSVKSSRWGVYKGTLMGVSHLD
	*.*****
LipOR	LINWSNRARWTVREWMGMRRTFNAVAFYLDVADMLAKEGL
LipCLON	LINWSNRARWTVREWMGMRRTFNAVAFYLDVADMLAKEGL

Figura 3.4 Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la lipasa 135964 deducida *in silico* con la secuencia de aminoácidos de la lipasa obtenida en el presente trabajo. En amarillo se señalan los cambios en la secuencia de aminoácidos y en verde se marca el sitio de inserción de una treonina.

1.3. Diseño de cebadores específicos para la lipasa 135964, con adaptadores con sitios de restricción

Las secuencias de los cebadores diseñados para contener los sitios de restricción PmlI en el N-terminal y XhoI en el C-terminal, se generaron con el software SnapGene son las siguientes:

1.- Etiqueta en el N-terminal (Fw)

FW_NHis

5'-TAGTCGCACGTGATGCATCATCACCATCACCATATGA-3'

RV_NHis

5'-CGACTACTCGAGTCACAATCCTTCCTTGGCCAA-3'

2.- Etiqueta en el C-terminal (la etiqueta del vector)

FW_CHis

5'-TAGTCGCACGTGATGAAGCAATGGCCCCATTG-3'

RV_CHis

5'-CGACTACTCGAGCAATCCTTCCTTGCCCAACATG-3'

1.4. Re-amplificación de secuencia codificante de la lipasa 135964

Los productos de la re-amplificación de la secuencia de la lipasa 135964 con los adaptadores conteniendo los sitios de restricción se muestran en la Figura 3.5. Se detectó un amplicón con tamaño de 1100pb que corresponde al tamaño esperado.

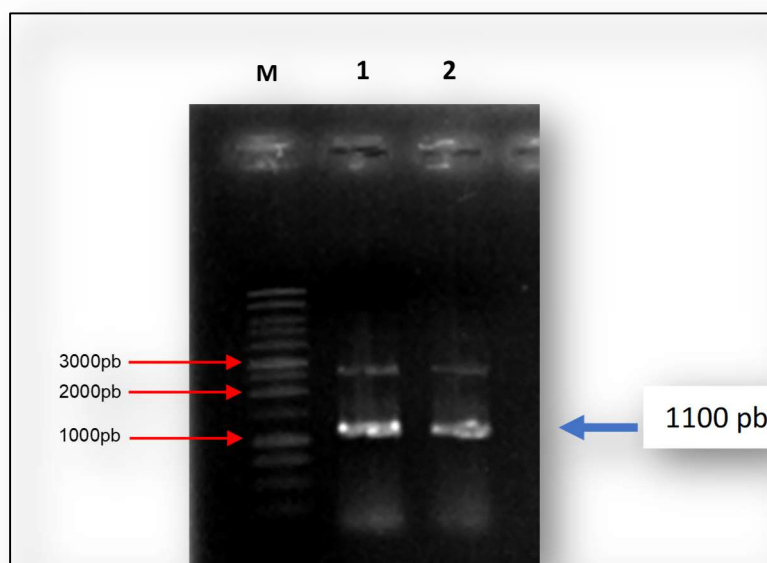


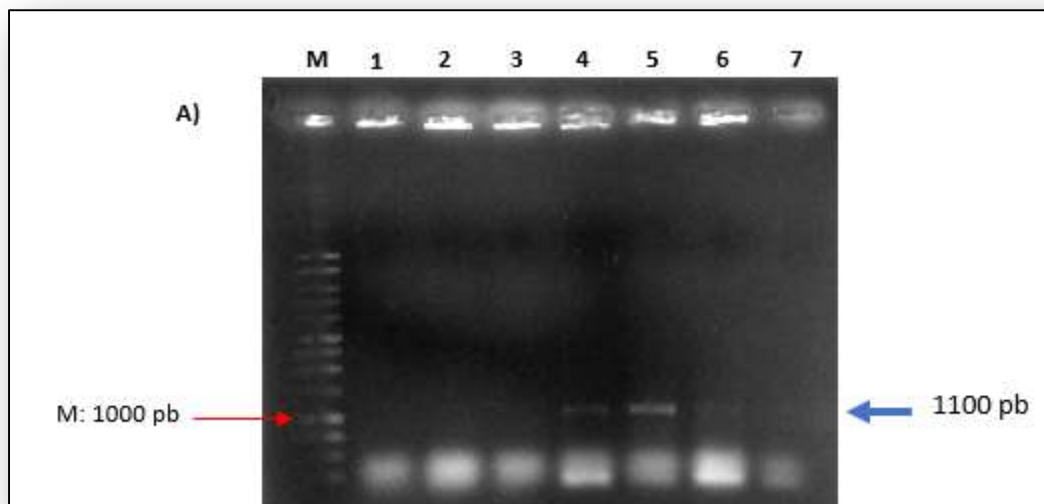
Figura 3.5 Gel de agarosa al 0.8% que muestra el producto de PCR obtenido con los oligos N-His y C-His, y como templado el constructo pDONR-lip13. Los amplicones de 1kb que se observan corresponden a la lipasa 135964 de *T. harzianum*. Las bandas presentes cerca de los 3000pb corresponden al constructo pDONR-lip13 enrollado. M: Marcador molecular GeneRuler 1kb DNA Ladder. Carril 1: Amplicón lip13-NHis. Carril 2: Amplicon lip13-Chis.

1.5. Inserción de la lipasa 135964 con sitios de restricción (RE) en vector pGEM- T Easy

La cantidad de inserto necesaria para realizar la reacción de ligación de la lipasa 135964 con el vector pGEM-TEasy, en una relación molar inserto: vector de 3:1, se determinó como se indicó anteriormente.

De acuerdo con la concentración de inserto obtenida después de su purificación: 91.5ng/μl para lip13-NHis y 60.8ng/μl para lip13-CHis, se utilizó 1μl para la reacción de ligación de cada uno, con la cual se transformaron las células competentes de *E. coli* Top 10. Se recuperaron alrededor de 30 colonias para lip13-N-His y 10 para lip13-CHis, de las cuales 5 de cada tipo se sometieron a PCR en colonia, utilizando los oligos N-His y C-His.

En la Figura 3.6 se muestran las bandas del amplicón esperado, con el tamaño estimado de 1100 b, correspondientes a la región codificante de la lipasa 135964 ya con los sitios de restricción en cada extremo. El amplicón original de la lipasa 135964 consta de 1023 bases.



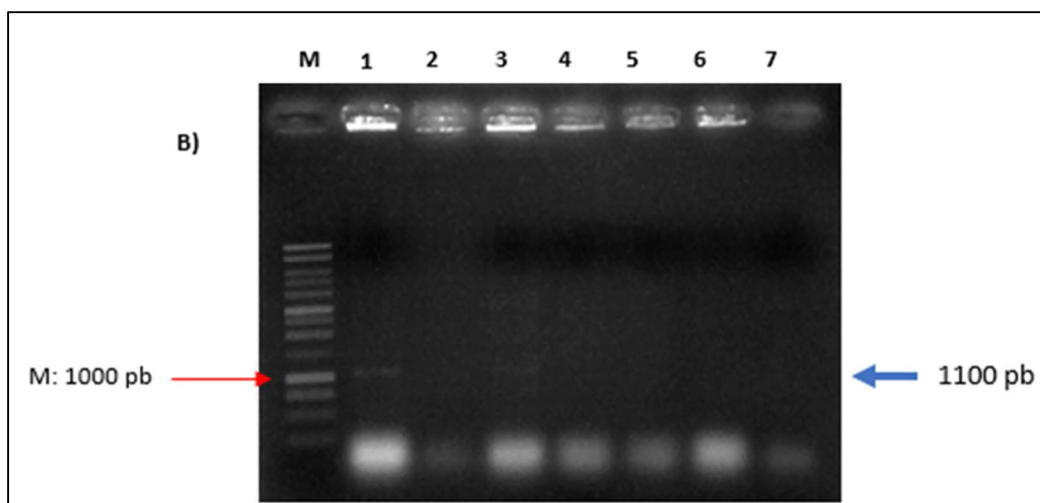


Figura 3.6 Análisis en gel de agarosa de los productos de PCR en colonia de *E. coli* recombinantes conteniendo la región ORF de la lipasa 135964 en el vector pGEM-T Easy. A) Lip13-NHis M: Marcador molecular GeneRuler 1kb DNA Ladder. Carril1-5: Clonas analizadas. Carril 6: Colonia negativa control. Carril 7: Control negativo de reactivos. Carril 4 y 5: colonias positivas. B) Lip13-CHis M: Marcador molecular GeneRuler 1kb DNA Ladder. Carril1-5: Clonas analizadas. Carril 6: Colonia negativa control. Carril 7: Control negativo de reactivos. Carril 1 y 3: colonias positivas. La flecha en azul indica el amplicón de 1100 pb.

2. EXPRESIÓN

2.1. Liberación de inserto 135964 en pGEM, con enzimas de restricción

Los productos de la digestión con PmlI (Eco721) y XhoI, de los constructos pGEM-lip13-NH y pGEM-lip13-CH mostraron la liberación del inserto lipasa 135964 (lip 13) con el tamaño esperado, tal como se muestra en la Figura 3.7.

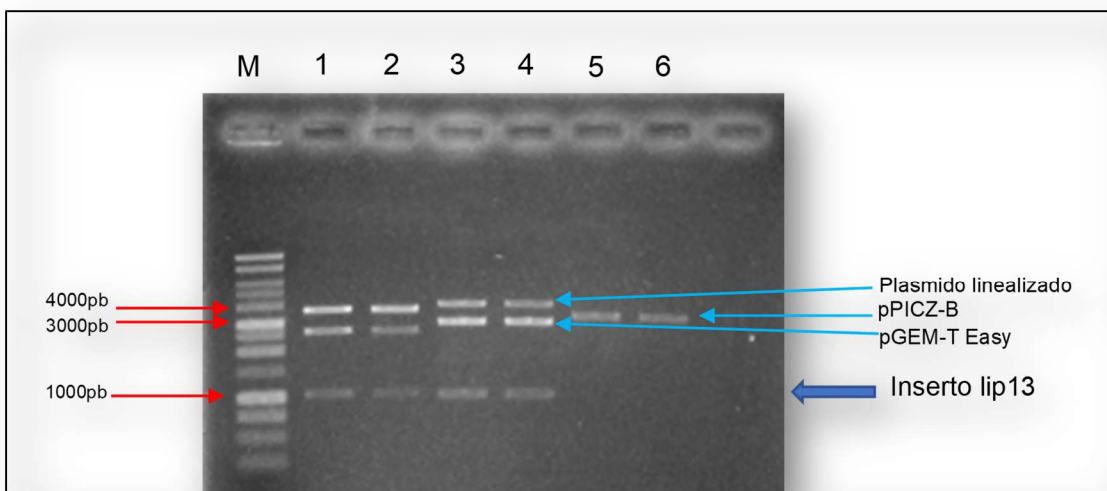


Figura 3.7 Análisis en gel Gel de 0.8% de agarosa de las digestiones con PmIII y XhoI de los vectores pGEM-lip13-NH y pGEM-lip13-CH. El inserto de 1kb liberado en las digestiones correspondiente a la lipasa 135964; el vector vacío pPICZ-B se digirió con las mismas enzimas. M: Marcador molecular GeneRuler 1kb DNA Ladder. Carril 1 y 2: De arriba a abajo, plásmido linealizado (4kb), plásmido enrollado (<3kb) e inserto liberado (1 kb) del constructo pGEM-lip13-NH. Carril 3 y 4: De arriba a abajo plásmido linealizado (4kb), plásmido enrollado (<3kb) e inserto liberado (1kb) del constructo pGEM-lip13-CH. Carril 5 y 6: Vector pPICZ-B digerido.

2.2. Subclonación de la lipasa 135964 en vector de expresión pPICZ-B

El vector de expresión para *P. pastoris* pPICZ-B consta de 3328pb y contiene el promotor AOX1, inducible con metanol, así como una etiqueta de 6xHis río abajo del sitio múltiple de clonación. En este vector, se insertó la secuencia codificante de la lipasa 135964 flanqueada por los sitios de restricción PmII y XhoI. La Figura 3.8 muestra el mapa del vector pPICZ-B resaltando en recuadros verdes los sitios de introducción de la lipasa 135964.

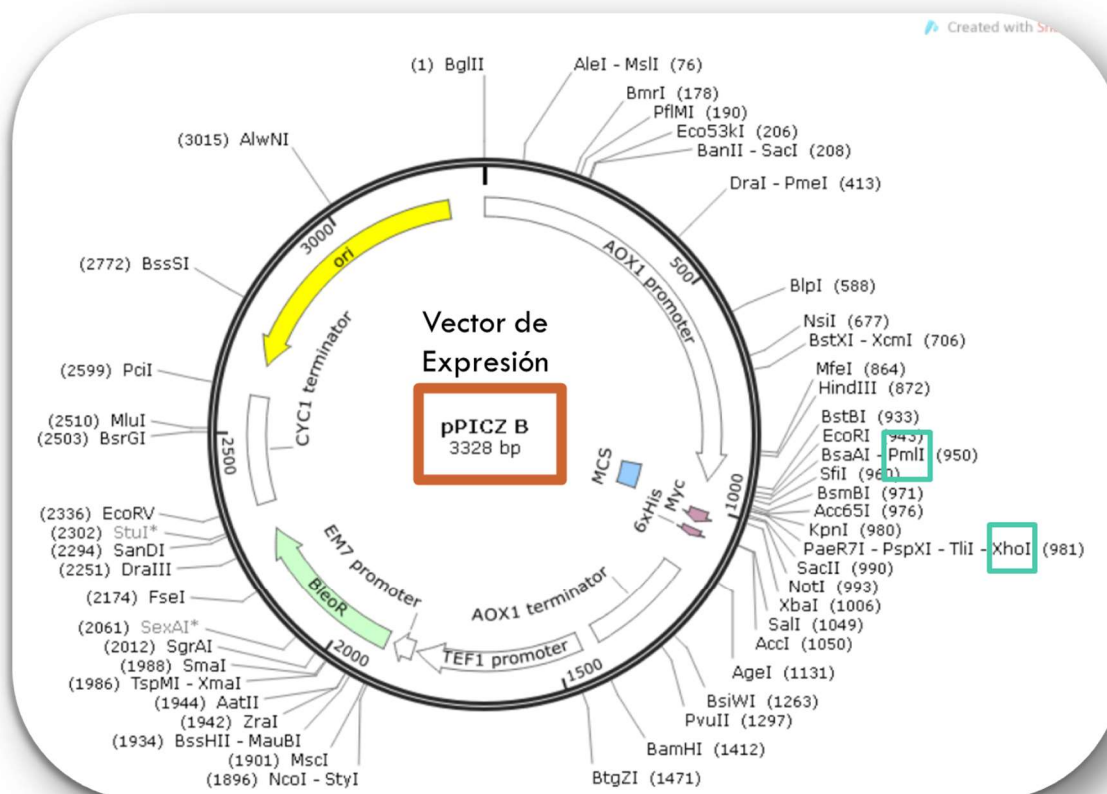


Figura 3.8 Mapa del vector pPICZ-B para la expresión heteróloga de proteínas en *P. pastoris*. Los sitios de restricción enmarcados en color verde corresponden a los sitios utilizados para insertar la secuencia codificante de la lipasa 135964.

El vector recombinante conteniendo a la lipasa de interés se clonó en *E. coli*. Las células transformantes se verificaron por PCR en colonia utilizando los cebadores diseñados que contienen los sitios de restricción y los resultados se muestran en la Figura 3.9.

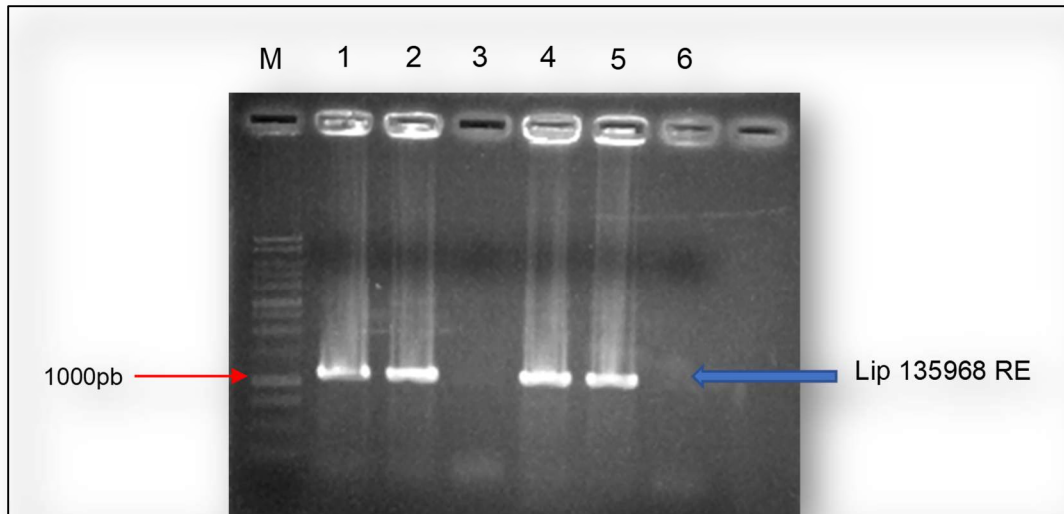


Figura 3.9 Gel de agarosa al 1% que muestra productos de PCR a partir de constructos PICZ-lip13. La PCR se llevó a cabo utilizando los plásmidos PICZ-Lip13NH y PICZ-Lip13CH como templado y los oligos N-His y C-His (con sitios de restricción) de la lipasa 135964. M: Marcador molecular GeneRuler 1kb DNA Ladder. Carril 1 y 2: Amplicón de lipasa 135964 a partir de plasmido PICZ-Lip13NH. Carril 3: Control negativo de reactivos con oligos N-His. Carril 4 y 5: Amplicón de lipasa 135964 a partir de plasmido PICZ-Lip13CH. Carril 6: Control negativo de reactivos con oligos C-His.

Por último, para confirmar la inserción de la lipasa en el vector pPICZ-B, se llevaron a cabo reacciones PCR utilizando los oligos que flanquean el sitio de clonación múltiple del vector, provistos con el vector en el paquete comercial. En las reacciones se utilizaron como plantados el constructo PCZ-Lip13NH y el vector vacío pPICZ-B. Los resultados se muestran en la Figura 3.10.

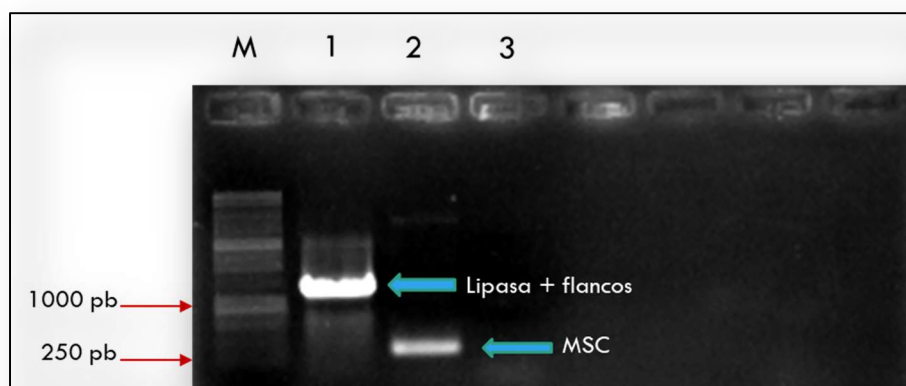


Figura 3.10 Gel de agarosa al 1% que muestra productos de PCR amplificados a partir del constructo PICZ-Lip13NH y del vector pPICZ-B. M: marcador molecular generuler 1kb DNA ladder. Carril 1: Amplicón de 1.3kb correspondiente a la lipasa 135964 con secuencias flanqueantes de oligos del constructo PICZ-Lip13NH. Carril 2: Amplicón de 303 pb que corresponde al sitio multiple de clonación del vector pPICZ-B. Carril 3: Control negativo.

Como se esperaba, la banda mayor a 1000pb representa a la secuencia de la lipasa 135964 incluyendo los flancos del sitio múltiple de clonación, mientras que en el vector vacío solo se presenta el amplicon que resulta de la amplificación de la zona que flanquea al sitio de clonación múltiple, presente en el vector pPICZ-B.

2.3. Secuenciación de vector de expresión

Las secuencias recibidas del laboratorio del servicio de secuenciación se depuraron mediante el análisis puntual de los electroferogramas y de esta manera se confirmó que la secuencia codificante de la lipasa 135964 insertada en el vector pPICZ-B se encuentra en marco de lectura y que, además, la etiqueta de histidina colocada en el N-terminal, se encuentra presente de manera correcta. En la Figura 3.11 se muestra la secuencia de la lipasa 135964 depurada y traducida a aminoácidos.

5' Frame 1																											
atg	cat	cat	cac	cat	cac	cat	atg	aag	caa	tgg	ccc	cat	tgg	cgc	ggc	act	cgc	ctc	ccg								
M	H	H	H	H	H	H	M	K	Q	W	P	H	W	R	G	T	R	L	P								
cgc	tcc	ttg	cta	agc	cta	cag	cca	tcg	acc	ttg	cgg	gtc	ttt	agt	acc	gca	aaa	ccg	ctc								
R	S	L	L	S	L	Q	P	S	T	L	R	V	F	S	T	A	K	P	L								
cgt	cac	gat	cct	cgc	atc	cgt	gac	ctc	ggg	cga	ctt	ata	cac	gat	gac	tac	gct	acc	atc								
R	H	D	P	R	I	R	D	L	G	R	L	I	H	D	D	Y	A	T	I								
cgc	gag	acc	tac	gct	acg	cca	aag	tac	ccg	att	gtc	ctg	gct	cac	ggc	cta	ttc	ggc	ttc								
R	E	T	Y	A	T	P	K	Y	P	I	V	L	A	H	G	L	F	G	F								
tcc	gag	ctc	aga	gtc	tcg	cca	ctt	cta	ccc	acg	atc	gag	tac	tgg	aac	ggc	atc	aag	cag								
S	E	L	R	V	S	P	L	L	P	T	I	E	Y	W	N	G	I	K	Q								
gcc	ctc	acg	gca	aac	aac	tgc	acc	gtc	atc	acc	gcc	acc	gtc	ccg	ccc	tcc	ggc	tcc	atc								
A	L	T	A	N	N	C	T	V	I	T	A	T	V	P	P	S	G	S	I								
gag	gag	cgc	gcc	gac	ctc	gcc	gac	atc	ctc	gcg	cag	aca	acc	gcc	gac	tcg	ctc										
E	E	R	A	A	K	L	A	A	D	I	L	A	Q	T	T	A	A	S	L								
ccc	tcc	gcc	cag	gac	gca	gac	ggc	cat	gcg	act	acg	ccg	ccc	gcc	gtc	aac	atc	atc	gcc								
P	S	A	Q	D	A	D	G	H	A	T	T	P	P	A	V	N	I	I	A								
cac	agc	atg	gga	ggg	ctg	gac	gcc	cgg	tac	atg	atc	tcc	ctg	ctg	cgc	ccg	tcg	ggc	ata								
H	S	M	G	G	L	D	A	R	Y	M	I	S	L	L	R	P	S	G	I								
cgg	atc	gcc	tcg	ctc	gtg	acg	att	gcc	acg	ccg	cat	cgc	ggg	agc	agc	ttt	gcg	gat	tac								
R	I	A	S	L	V	T	I	A	T	P	H	R	G	S	S	F	A	D	Y								
ctg	gtc	gag	cgc	ggc	ggc	ccg	ctc	cac	ctg	ccg	cgg	ttg	tac	ggc	gtg	att	cgg	cgc									
L	V	E	R	G	A	G	P	L	H	L	P	R	L	Y	G	V	I	R	R								
gct	gga	ttg	ggt	acg	tct	gcg	ttt	ggg	cag	ctc	acg	acg	cgg	tac	atg	cgc	gag	gag	ttc								
A	G	L	G	T	S	A	F	G	Q	L	T	T	R	Y	M	R	E	F									
aac	ccg	cgg	gtg	gac	gac	gag	gcg	gtg	cgc	tac	ttt	tcg	tac	ggg	gcg	gcc	att	gac									
N	P	R	V	R	D	D	E	A	V	R	Y	F	S	Y	G	A	A	I	D								
gag	ccg	tcg	ctg	cta	ggg	gca	ttt	cgg	ctt	ccg	cac	ggc	gtc	gtg	gac	aag	agg	gag	ggg								
E	P	S	L	L	G	A	F	R	L	P	H	G	V	V	D	K	R	E	G								
gag	aat	gat	ggg	ttg	gtc	agc	gtc	aag	agc	agt	cgt	tgg	gga	gtg	tac	aag	ggg	acg	ctg								
E	N	D	G	L	V	S	V	K	S	S	R	W	G	V	Y	K	G	T	L								
atg	ggg	ggt	agc	cat	ttg	gat	ctg	atc	aat	tgg	tcg	aat	cgc	gcg	agg	tgg	acg	gtg	agg								
M	G	V	S	H	L	D	L	I	N	W	S	N	R	A	R	W	T	V	R								
gag	tgg	atg	ggc	atg	agg	agg	acg	ttt	aat	gct	gtg	gcg	ttc	tac	ctg	gat	gtg	gcc	gac								
E	W	M	G	M	R	R	T	F	N	A	V	A	F	Y	L	D	V	A	D								
atg	ttg	gcc	aag	gaa	gga	ttg	tga																				
M	L	A	K	E	G	L	-																				

Figura 3.11 Secuencia codificante de la lipasa 135964, con etiqueta de histidina en el N-terminal. La secuencia fue confirmada mediante secuenciación de nucleótidos y traducida *in silico* a la secuencia de aminoácidos.

2.4. Transformación de la levadura *P. pastoris*

La transformación de las células competentes de *P. pastoris* requiere que el plásmido (vector de expresión con inserto de interés) se encuentre linealizado, por lo cual, los constructos PICZ-Lip13NH y PICZ-Lip13CH se digirieron con la enzima BglII. La Figura 3.12 muestra el resultado de la digestión, en la que se aprecian bandas de 4kb que es el tamaño esperado del vector pPICZ-B (3.3 kb) con la lipasa 135964 (1 kb).

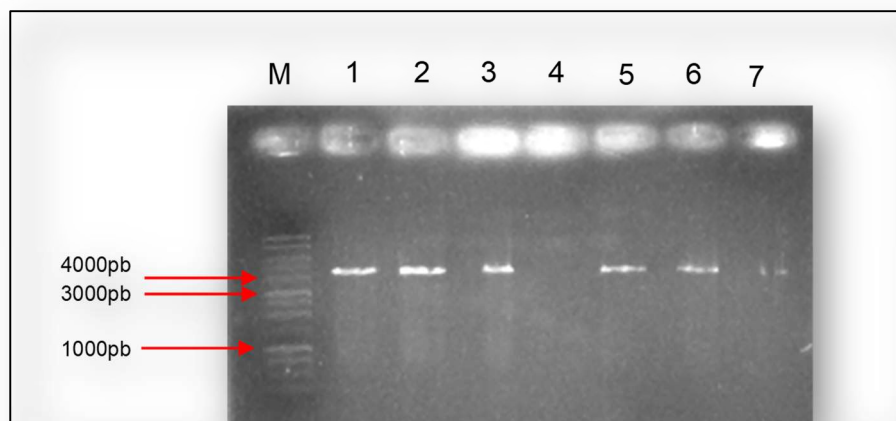


Figura 3.12 Gel de agarosa al 0.8% que muestra los constructos PICZ-Lip13NH y PICZ-Lip13CH linealizados. La digestión del vector recombinante se realizó como se describe en materiales y métodos . M: Marcador molecular GeneRuler 1kb DNA Ladder. Carril 1 al 3: Plásmido PICZ-Lip13NH linealizado (4kb). Carril 5 al 7: Plásmido PICZ-Lip13CH linealizado (4kb).

Así mismo, el vector vacío pPICZ-B se linealizó mediante una digestión con *SacI*, el resultado de la digestión se muestra en la Figura 3.13.

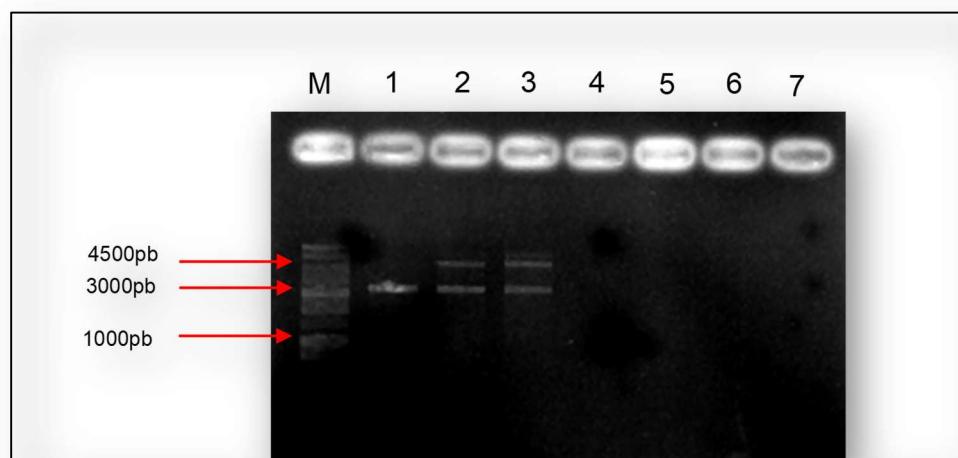


Figura 3.13 Gel de agarosa al 0.8% que muestra el vector vacío pPICZ-B linealizado. M: Marcador molecular GeneRuler 1kb DNA Ladder. Carril 1: Plásmido pPICZ-B linealizado (3kb). Carril 2 y 3: De arriba a abajo, plásmido pPICZ-B enrollado (aprox 4.5 kb) y plásmido pPICZ-B linealizado (3kb).

Los constructos PICZ-Lip13NH y PICZ-Lip13CH, así como del vector vacío pPICZ-B, linealizados se purificaron a partir del gel de agarosa y se usaron 500 ng para la transformación de las células competentes de *P. pastoris* GS115. Las colonias recombinantes putativas se recuperaron y se sometieron a PCR en colonia, utilizando los oligos nativos de la lipasa 135964. Las Figuras 3.14 y 3.15 muestran los resultados obtenidos para los constructos PICZ-Lip13NH y PICZ-Lip13CH, respectivamente.

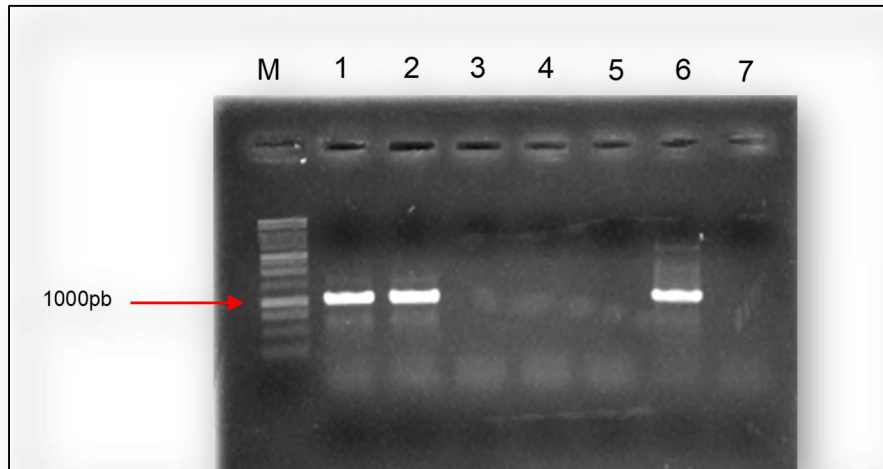


Figura 3.14 Análisis en gel de 1% de agarosa de los productos de PCR en colonia de *P. pastoris* transformadas con el constructo PICZ-Lip13NH. M: marcador molecular Generuler 1kb DNA. Carril 1 y 2: Amplicón de lipasa 135964 perteneciente a colonias positivas. Carril 6: control positivo de reactivos con oligos nativos y plásmido PICZ-Lip13NH como templado. Carril 7: control negativo de reactivos con oligos nativos sin templado.

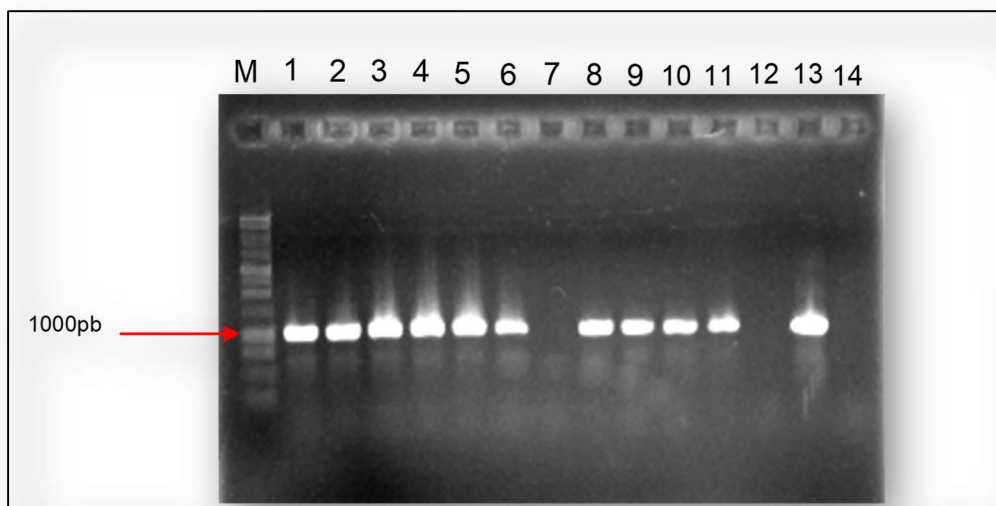


Figura 3.15 Gel de agarosa al 1% que muestra los productos de PCR en colonia de *Pichia p.* transformada con el constructo PICZ-Lip13CH. M: marcador molecular Generuler 1kb DNA ladder. Carril 1-6 y 8-11: Amplicón de lipasa 135964 perteneciente a colonias positivas. Carril 13: control positivo, amplicon de lipasa 135964.. Carril 14: control negativo de reactivos

Ambos geles demuestran la presencia de colonias positivas, es decir, que contienen a la lipasa 135964, por lo que la transformación de *P. pastoris* fue exitosa.

Con la finalidad de confirmar la integración de la secuencia de la lipasa 135964 en el genoma de *P. pastoris*, se extrajo ADN genómico de células transformadas con el constructo PICZ-Lip13NH, el cual se utilizó como templado (2 µg) para realizar una PCR usando los oligos nativos de la lipasa 135964. En la Figura 3.16 se muestra el perfil electroforético obtenido.

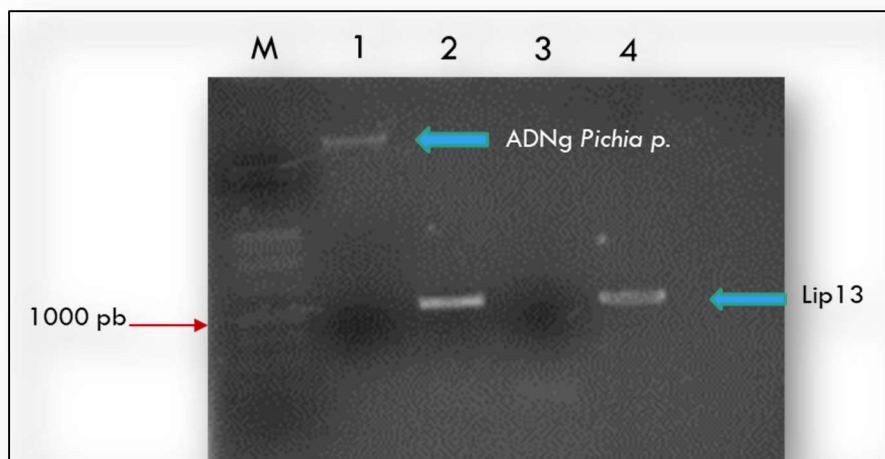


Figura 3.16 Gel de agarosa al 1% que muestra el ADN genómico de *Pichia pastoris* transformada con el constructo PICZ-Lip13NH y el producto de PCR, lipasa 135964, usando el ADNg como templado. M: marcador molecular Generuler 1kb DNA ladder. Carril 1: ADN genómico de *Pichia pastoris*. Carril 2: Amplicón de lipasa 135964 amplificado a partir de ADN genómico con oligos nativos de la lipasa. Carril 3: control negativo de reactivos. Carril 4: control positivo de lipasa 135964.

La presencia de la banda de 1000pb demuestra la presencia de la lipasa 135964 en *Pichia pastoris* y confirma la integración del vector de expresión PICZ-Lip13NH en el genoma de *P. pastoris*.

3. CARACTERIZACIÓN

Una vez terminado el tiempo de inducción de las células transformadas (PICZ-Lip13-NH, PICZ-Lip13-CH, vector vacío) y silvestres de *Pichia pastoris*, se procedió a tratar las muestras de cada tiempo de muestreo (0, 48, 72 y 96 horas, nombradas así por el tiempo de inducción con metanol) para lisis y recuperación del extracto crudo de proteínas. Inmediatamente después, con el extracto crudo se realizó un ensayo de actividad lipolítica. En el ensayo cualitativo, llevado a cabo de manera similar al ensayo electroforético, pero únicamente observando el cambio de color a amarillo, los resultados de las células transformadas con el vector vacío fueron muy similares a los de las células tipo silvestre, mientras con el extracto de las células transformadas con el vector

PICZ-Lip13-NH, se observó que en 15 minutos la reacción viró a amarillo, aunque el color no fue intenso.

Las Figuras 3.17 y 3.18, muestran los resultados cualitativos obtenidos del ensayo de actividad lipolítica con las células de *Pichia pastoris* transformadas con el vector PICZ-Lip13-NH.

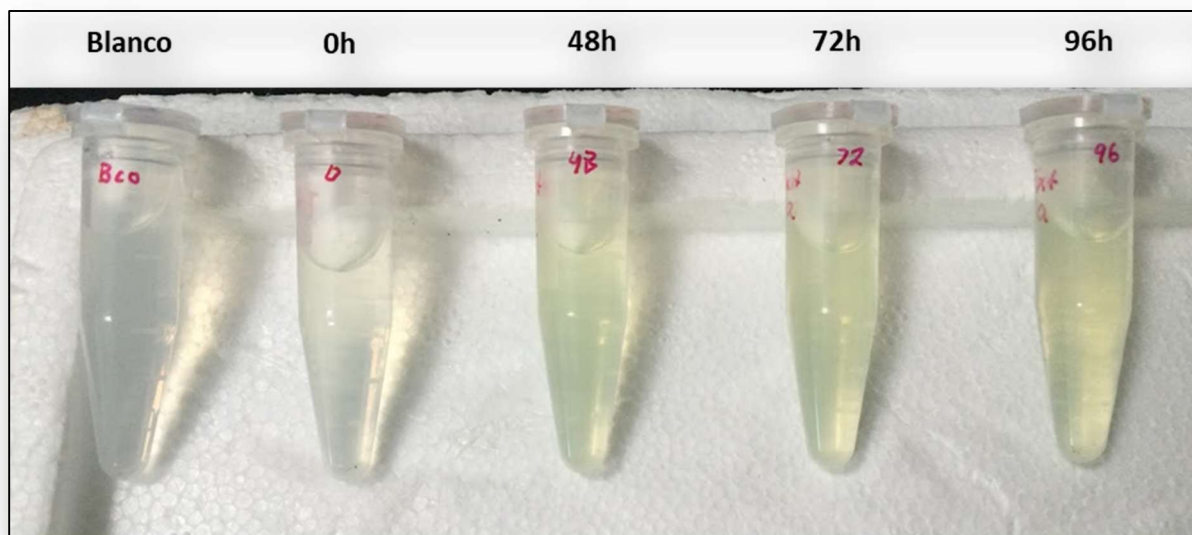


Figura 3.17. Resultados cualitativos de la actividad lipolítica del extracto crudo correspondiente a las células transformadas con el constructo PICZ-Lip13-NH, inducidas 0, 48, 72 y 96 horas.

El cambio en la coloración de la solución (amarillo) indica la existencia de actividad lipolítica. La intensidad fue mayor al compararla con el de las células silvestres (Figura 3.18), aunque correspondió a baja actividad por ser un color no intenso.

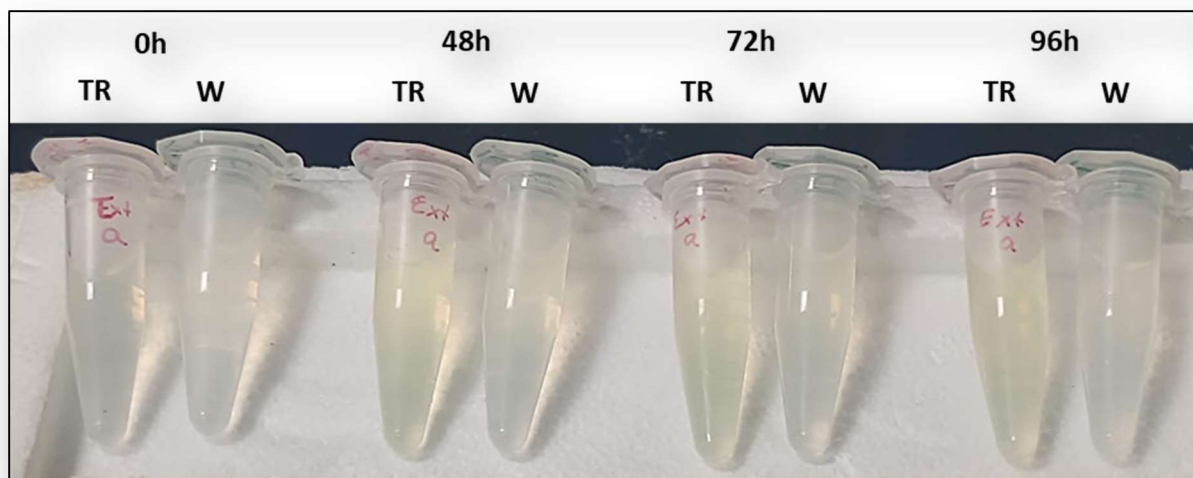


Figura 3.18. Comparación de resultados cualitativos de la actividad lipolítica del extracto crudo de células transformadas con el constructo PICZ-Lip13-NH y de células tipo silvestre, inducidas por 0, 48, 72 y 96 horas.

Los resultados fueron, sin embargo, débiles y no se observaron con las células transformadas con el constructo PICZ-Lip13-CH; en este caso no se detectó diferencia observable respecto a las células silvestres y las transformadas con el vector vacío. Por este motivo, los análisis siguientes se realizaron con el material proveniente de las células transformadas con el constructo PICZ-Lip13-NH.

3.1. Purificación de la lipasa

En la Figura 3.19 se muestran las columnas en las que se llevó a cabo la interacción de la resina Ni-NTA con los extractos de proteína y los lavados con diferentes concentraciones de imidazol, tal como se describió en materiales y métodos.

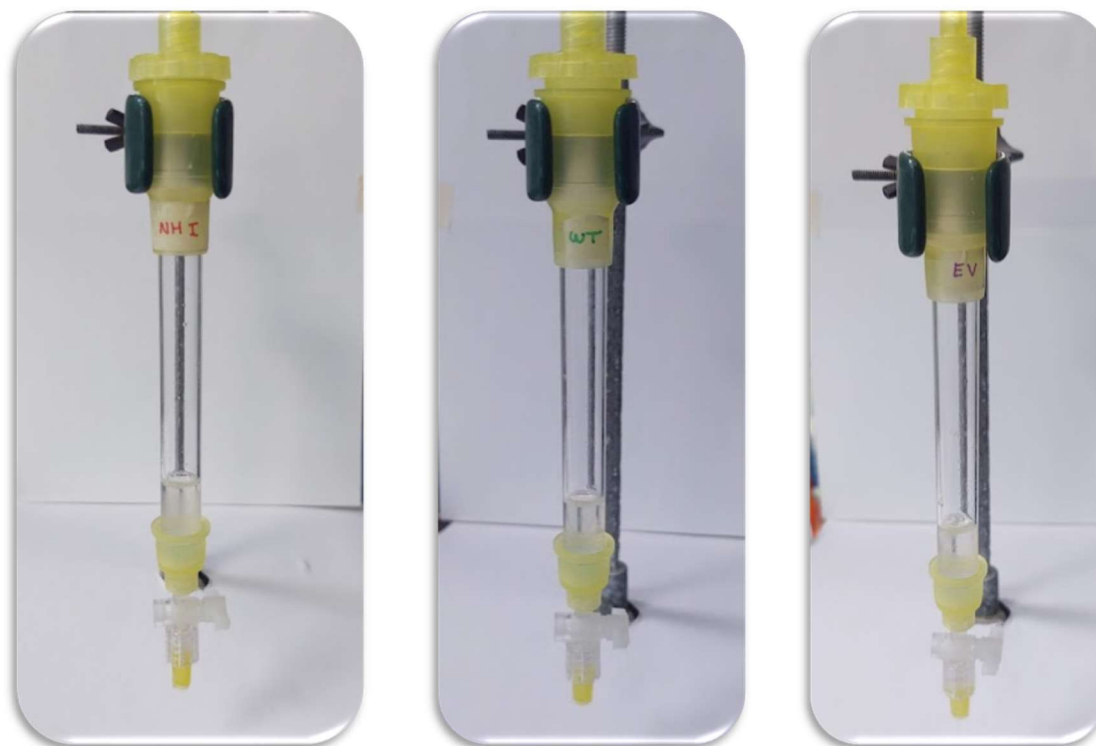


Figura 3.19 Columnas para cromatografía de afinidad níquel-histidina.

3.2. Actividad enzimática

En la primera evaluación de la actividad enzimática en todas las muestras (extractos crudos, la fracción soluble y la insoluble) las proteínas se eluyeron con 20, 100, 150, 250 y 300 mM de imidazol; los valores de absorbancia a partir de la levadura transformada fueron semejantes a los de la cepa silvestre. Es decir, no se detectó la actividad esperada en la cepa transformante.

Algunas lipasas mejoran su actividad catalítica en presencia de iones en el medio de reacción, por lo que se decidió realizar un ensayo enzimático de actividad de lipasa en presencia de 20 mM de Ca^{2+} y 20 mM de Mg^{2+} , respectivamente. Las fracciones analizadas fueron la soluble e insoluble de la muestra inducida por 96h; este tiempo de inducción fue el máximo posible de acuerdo a las disposiciones institucionales de acceso a las instalaciones, y se encuentra en el límite inferior del periodo de inducción reportado en otros trabajos de expresión de proteínas en *Pichia pastoris*, que va de las 96 horas (Barba Cedillo *et al.*, 2012; Bou Ali *et al.*, 2011) a las 120 horas (Nurul Furqan y Akhmaloka, 2020; Yang *et al.*, 2009), incluso, 168 horas (J.-R. Wang *et al.*, 2013). La tabla 2.3 muestra los promedios de las lecturas de absorbancia a 410 nm después de 60 min de incubación a 50°C.

Tabla 3.1 Absorbancias registradas a 410nm para el ensayo enzimático de lipasa en ausencia de iones (ST) y en presencia de 20mM de Ca^{2+} o 20mM de Mg^{2+} en los extractos crudos de la fracción soluble y la fracción insoluble de la muestra T96*.

Extractos 96h fracción SOLUBLE				Extractos 96h fracción INSOLUBLE			
	ST	Ca	Mg		ST	Ca	Mg
TR	0.085	-	0.153		0.185	0.260	0.708
WT	0.618	-	0.121		0.175	0.594	0.521

* con 96 horas de inducción.

Las lecturas obtenidas para la fracción soluble en el ensayo en ausencia de iones (primera columna) mostraron un comportamiento contrario al esperado, pues los valores fueron superiores a aquellos de la muestra transformada. En el caso del ensayo con presencia de Ca^{2+} , no se pudieron obtener lecturas válidas, debido a que la mezcla de reacción se tornó turbia y el equipo reportó lecturas de absorbancia de 3.14 para cada muestra. Dichas lecturas no son congruentes ni válidas para estos análisis. Los valores registrados para el ensayo en presencia de Mg^{2+} fueron muy cercanos, no apoyando tampoco que hay actividad diferencial en la cepa transformada.

Los análisis de la fracción insoluble no mostraron diferencia significativa de actividad lipolítica entre la muestra transformada y la silvestre, lo cual resultó desconcertante debido a que este comportamiento registrado en la fracción soluble sugería que sería en la fracción insoluble donde se encontraría la actividad lipolítica. Las lecturas obtenidas en los ensayos con iones indicaron que con la presencia de Ca^{+} la muestra silvestre registró el valor de lectura más grande, comportamiento opuesto al esperado, mientras que en el ensayo con presencia de Mg^{+} los valores de absorbancia registrados en la muestra transformada fueron superiores a los de la muestra silvestre; si bien esto concuerda con el comportamiento esperado, no se puede relacionar de manera directa que el aumento en la actividad lipolítica sea producto de la lipasa 135964, ya que la muestra contiene todas las proteínas que se solubilizaron a partir de los restos celulares después de la lisis.

3.3. Electroforesis SDS-PAGE

Todos los elementos obtenidos después de la inducción de las células de *P. pastoris* transformadas con el constructo PICZ-Lip13NH y de su interacción con la resina de níquel (extractos crudos: fracción soluble y fracción insoluble, y eluatos de cada fracción) se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio. Esto con el objetivo de identificar a la lipasa 135964 a través de su masa molecular (aproximadamente 38kD con la etiqueta de histidina).

Los primeros análisis se realizaron con las muestras correspondientes a los extractos crudos de proteína (fracción soluble) de los tiempos 0h y 48h. El gel obtenido se muestra en la Figura 3.20.

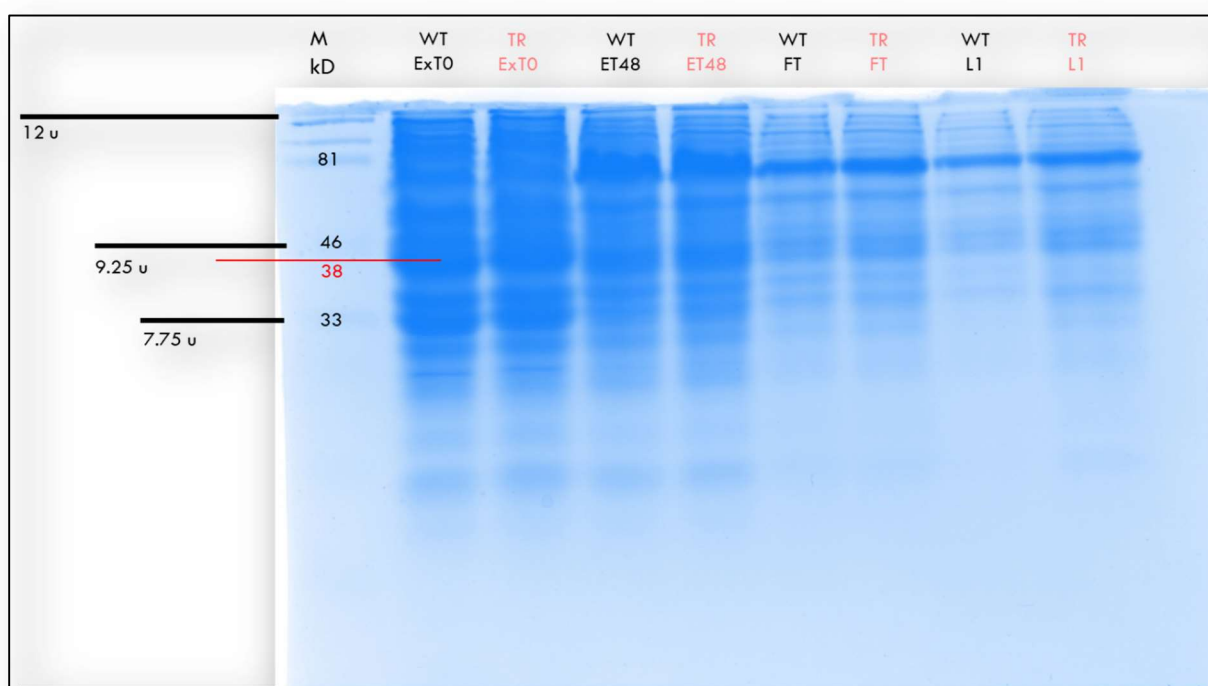


Figura 3.20 Perfil electroforético de polipéptidos presentes en extractos crudos de proteína de muestras tomadas a 0 y 48h de inducción de *Pichia pastoris* transformada con PICZ-Lip13NH. M: marcador de masa molecular en kDa. WT: wild type (control). TR: NH I (muestra). ExT0: Extracto crudo de 0h. ET48: Extracto crudo de 48h. FT: Flow through. L1: Lavado 1. Línea roja: altura correspondiente al tamaño de la proteína de interés (lipasa 135964)

En las muestras T0 no se observó diferencia en el perfil de polipéptidos, tal como se esperaba. Resultados similares se obtuvieron, en las muestras del extracto crudo de la cepa transformante TR ET48 o en el de la cepa silvestre (WT), incubadas bajo condiciones de inducción por 48 horas, donde no se observaron diferencias, pues los perfiles de polipéptidos se ven muy similares (Figura 3.20)

El análisis fue del perfil de polipéptidos en los eluatos obtenidos de la cromatografía de afinidad del extracto crudo (fracción soluble) de las muestras T48 (Figura 3.21).

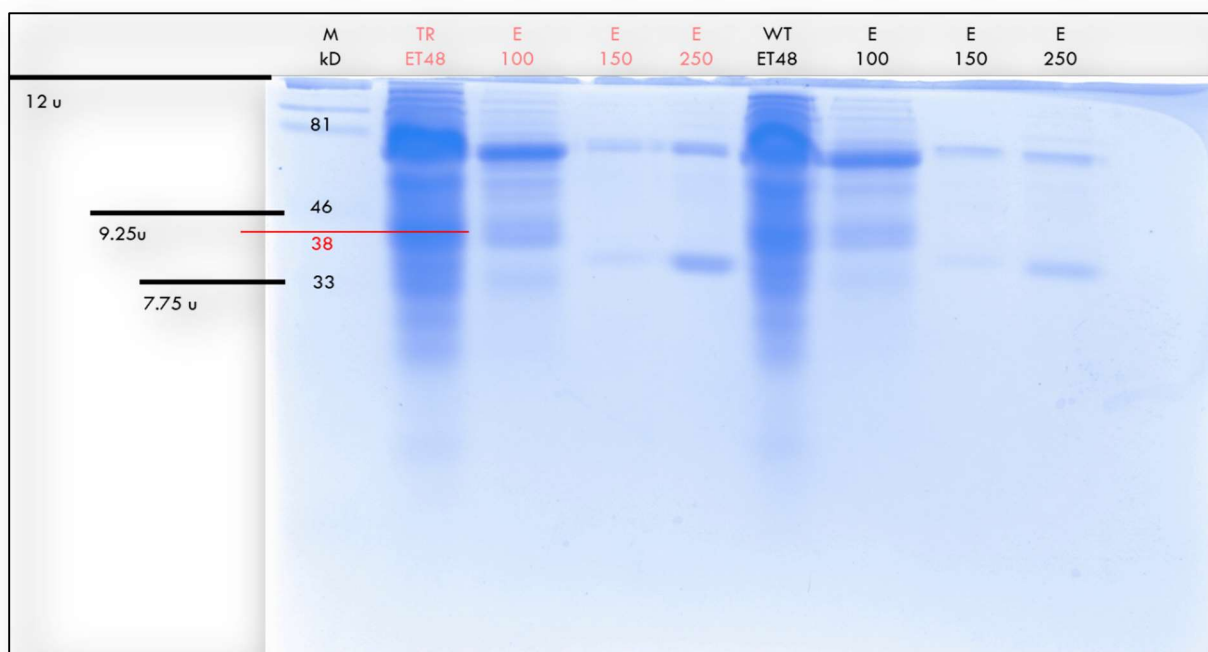


Figura 3.21 Perfil electroforético de polipéptidos presentes en las fracciones eluadas con diferente concentración de imidazol a partir de los extractos crudos de células de *P. pastoris* silvestre (WT) o transformada (TR) inducidas por 48 h,. M: marcador de masa molecular en kD. WT: silvestre (control). TR ET48: Extracto crudo de 48h de muestra NH I. EE100: Eluato con 100mM de imidazol. E150: Eluato con 150mM de imidazol. E250: Eluato con 250mM de imidazol. Línea roja: altura correspondiente al tamaño de la proteína de interés (lipasa 135964).

En esta ocasión, se esperaba encontrar una banda bien definida a la altura de los 38kD, en una o dos de las eluciones con imidazol de la cepa transformante TR ET48, que no estuviera presente en la muestra silvestre, lo cual indicaría la presencia de la lipasa 135964. Sin embargo, los tres

eluatados, E100, E150 y E250 de la cepa transformante presentan el mismo perfil de polipéptidos que sus contrapartes de la muestra silvestre (control).

En las Figuras 3.22 y 3.23 se muestran los análisis de proteínas después de someter las muestras a 72h y 96h de inducción, tanto la fracción soluble (Figura 3.22) como la insoluble (Figura 3.23).

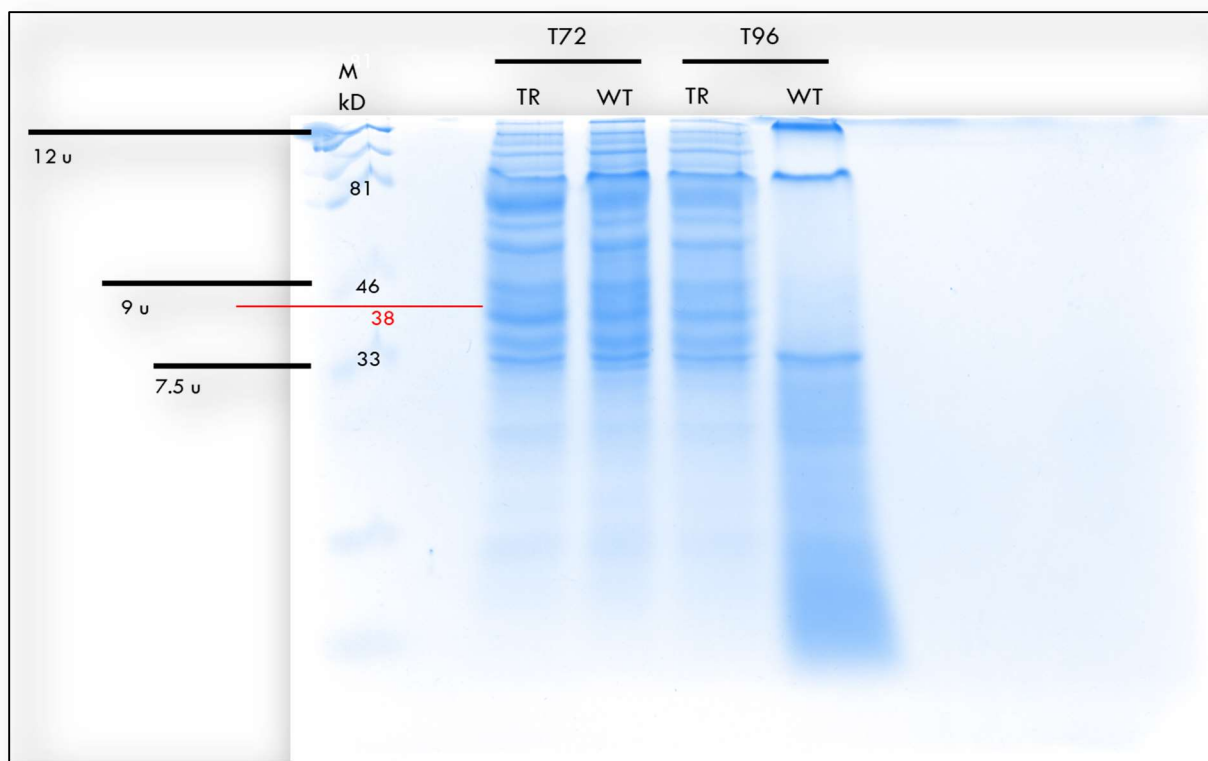


Figura 3.22 Perfil electroforético en geles SDS-PAGE de polipéptidos presentes en la fracción soluble de los extractos crudos de células de *P. pastoris* silvestre (WT) o transformada (TR) inducidas 72h (T72) y 96h (T96). Línea roja: altura correspondiente al tamaño de la proteína de interés (lipasa 135964).

Las concentraciones de proteína registradas en las muestras fueron desde el rango de ng/ μ l hasta los μ g/ μ l, por este motivo aquellas con menor cantidad (ng) se agruparon y analizaron en un solo gel SDS-PAGE, el cual se tiñó con plata debido a la pequeña cantidad de proteína con la que se contaba.

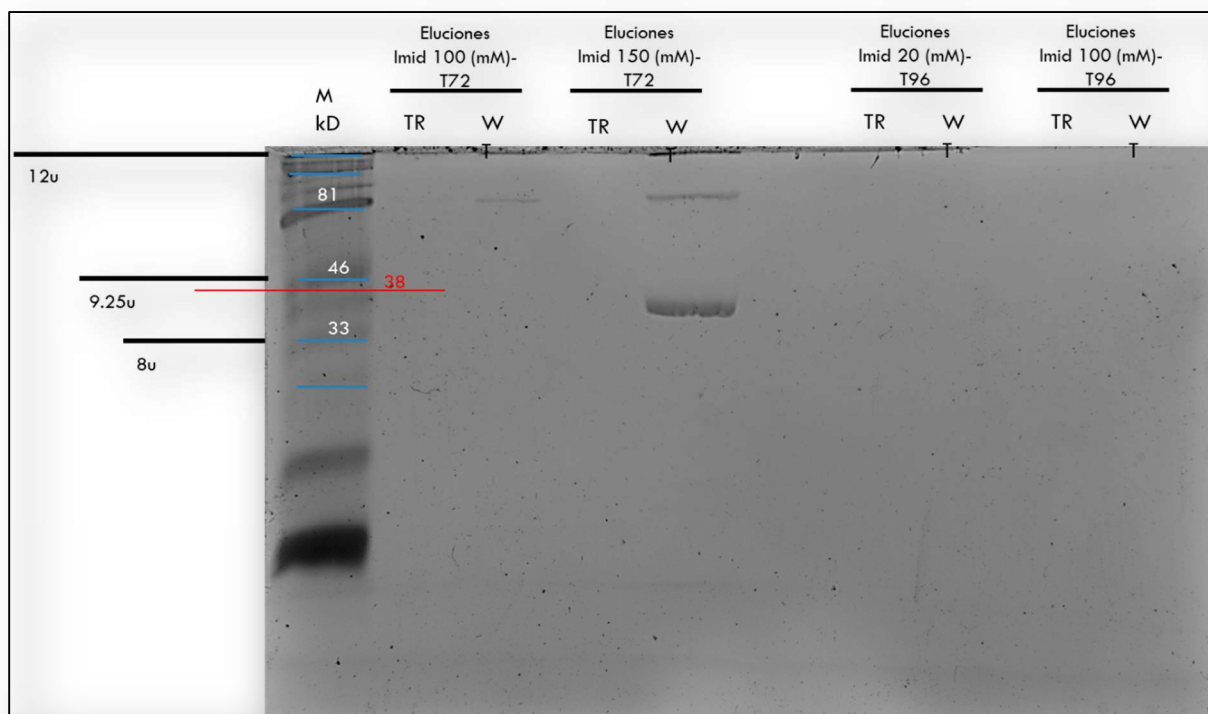


Figura 3.23 Perfil electroforético de polipéptidos teñidos con nitrato de plata en gel SDS-PAGE conteniendo extractos crudos, de la fracción insoluble, de las muestras de 72h (T72) y 96h (T96). WT: silvestre (control). TR: NH I (muestra). Línea roja: altura correspondiente al tamaño de la proteína de interés (lipasa 135964).

En ninguna de las muestras analizadas se logró identificar alguna banda diferencial en el rango de tamaño esperado, lo que representó un resultado inconveniente respecto a lo que se estaba buscando,

Dado que es posible que la expresión de la lipasa 135964 fuera baja, entonces se realizó un Western blot, en el que se analizaron las fracciones recuperadas con 100mM de imidazol. Cabe mencionar que dicho procedimiento se llevó a cabo con fines exploratorios, buscando la presencia de la lipasa 135964 a través de una técnica más sensible. Desafortunadamente los resultados fueron negativos, pero no concluyentes porque para su desarrollo no se contó con un control positivo que permitiera la validación

del proceso técnico. La Figura 3.24, muestra la membrana después del revelado de la fosfatasa alcalina acoplada al anticuerpo secundario.

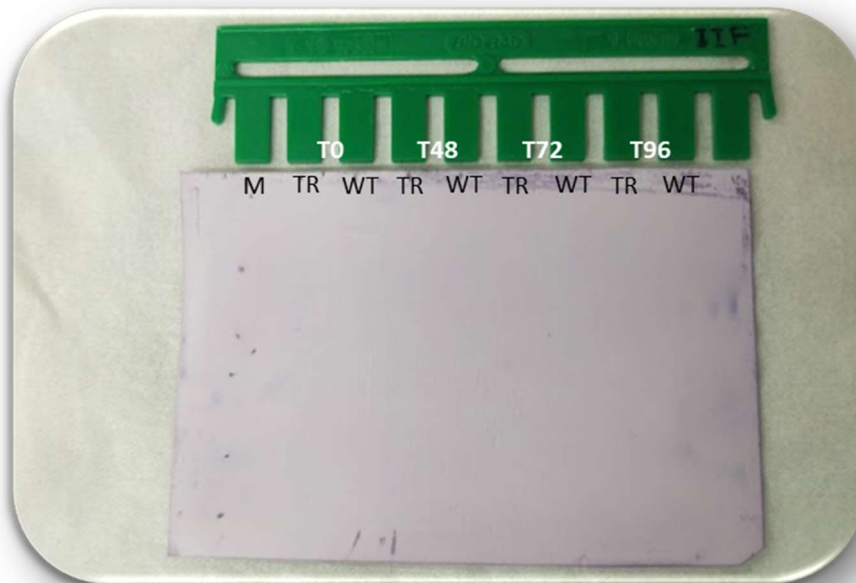


Figura 3.24 Western blot en membrana de PVDF conteniendo a las proteínas de los eluatos solubles eluidos con 100mM de imidazol. Las muestras correspondientes a 0h, 48h, 72h y 96h de inducción, tanto transformadas (TR) como silvestres (WT).

La ausencia de bandas coloreadas indica que el anticuerpo anti-His no detectó proteínas con etiquetas de histidina porque no se expresó la proteína o porque se encuentra en cantidades muy bajas.

DISCUSIÓN

Las proteínas termoestables son muy solicitadas para aplicarlas en procesos industriales, por lo que para poder cubrir la demanda la estrategia que más se utiliza es la expresión heteróloga, sin embargo, este proceso ha resultado tener una tasa de éxito bastante baja (Gasser *et al.*, 2007).

Hasta ahora no es posible determinar, a partir de la secuencia primaria, las condiciones en las cuales una proteína se exprese de manera óptima. Aun cuando la secuencia codificante de interés se haya integrado correctamente en el vector de expresión, la baja o nula expresión de una proteína puede deberse a diferencias con el organismo original respecto a compartimentalización y ambiente, chaperonas, sesgos en uso de codones, modificaciones postraduccionales o formación de puentes disulfuro (Duong-Ly y Gabelli, 2014). Entre los factores ambientales que influyen en la expresión de una proteína se encuentran el pH, osmolaridad, disponibilidad de oxígeno y temperatura; además, se ha demostrado que las respuestas de estrés a factores ambientales están altamente relacionadas con el plegamiento/agregación y secreción de proteínas (Gasser *et al.*, 2007).

El tiempo de incubación es uno de los factores más críticos para obtener un alto nivel de expresión de proteína en el sistema *P. pastoris*. En este sistema el tiempo de producción es relativamente largo (alrededor de 100h) y el tiempo de incubación está relacionado al número de células de levadura y el grado de degradación de la proteína de interés. En un estudio se demostró que el pico de crecimiento de las células de *P. pastoris* es a las 96h de incubación, mientras que la expresión más alta de proteína ocurre a las 48h, y, por otra parte, se ha discutido que la óptima expresión de proteína ocurre entre las 72 y 96h de incubación (Karbalaei *et al.*, 2020). En el presente estudio, la temperatura tuvo que controlarse manteniendo el aire acondicionado encendido; debido a lineamientos institucionales de ahorro de energía, el tiempo máximo de incubación fue de 96h, lapso que teóricamente se encuentra dentro de lo requerido para la expresión de proteínas, pero que pudo no haber sido suficiente para nuestro sistema, considerando que concuerda con el pico de crecimiento de la levadura.

La expresión de proteínas heterólogas puede ejercer un estrés severo en las células hospederas a diferentes niveles, y los potenciales cuellos de botella son el sesgo en uso de codones, el número de copias del gen, una transcripción deficiente, señales de traducción, procesamiento y plegamiento incorrectos en el retículo endoplásmico y Aparato de Golgi, así como recambio de la proteína por proteólisis; todos estos factores son interdependientes, por lo que la optimización del sistema depende de muchas variables (Hohenblum *et al.*, 2004).

Los genes que se trasladan a hospederos heterólogos para la expresión recombinante generalmente resultan en proteínas pobremente expresadas, ya que los genes silvestres no han sido adaptados para expresión óptima en dicho hospedero. El sesgo en el uso de codones en los organismos se atribuye a la selección natural, mutación o a la deriva genética, y se ha demostrado su correlación con el nivel de expresión de un gen. Por este motivo, el sesgo en el uso de codones se considera un importante parámetro de diseño para mejorar la producción de proteínas recombinantes en un huésped de expresión heteróloga (Chung y Lee, 2012). La optimización de codón implica también el ajuste en el contenido GC, remoción de secuencias repetidas y las modificaciones en secuencias motivo no deseadas; todos estos factores permiten que las estructuras secundarias de ARNm sean más estables y se incremente la eficiencia de traducción, prolongando la vida media del ARNm para finalmente producir un incremento en la síntesis de proteína (Che *et al.*, 2020). En este caso, la secuencia codificante de la lipasa135964 se utilizó tal cual se amplificó del ADNc de conidios de *T. harzianum*, sin ninguna modificación de nucleótidos para optimización de codones.

Los genes foráneos se integran de manera muy específica en los casetes de expresión para *Saccharomyces cerevisiae*, sin embargo, en el caso los casetes para levaduras no convencionales, como *P. pastoris*, a menudo se integran en posiciones genómicas aleatorias, por lo que células derivadas de un mismo evento de transformación frecuentemente se comportan de manera diferente, y con una variación clonal significativa, se requiere de un escrutinio de un número grande de clones (Vogl *et al.*, 2018). Un problema frecuente durante la generación de clones de *P. pastoris* a través de integración por homología de los casetes de expresión es la baja eficiencia en la especificidad de inserción (<1% en algunos casos); además, inserciones fuera de sitio pueden ocasionar la disrupción del gen y potencialmente afectar las características de producción. Inserciones aleatorias pueden afectar la productividad en *P. pastoris*, por lo que eventos desconocidos durante la integración del cassette de expresión puede llevar a cambiar drásticamente las características de los clones derivados de un experimento de transformación (Schwarzahns *et al.*, 2016). En nuestro trabajo se confirmó la presencia de la lipasa135964 en el genoma de *P. pastoris* mediante PCR. Sin embargo, no se secuenció el genoma de la clona por lo que no se sabe si se integró en la posición y sentido correcto.

El sistema de expresión heteróloga *P. pastoris* tiene la característica de requerir grandes cantidades de plásmido (orden de microgramos) en la etapa de transformación, lo cual influye en el número de copias del gen que se integran a la células (Karbalaei *et al.*, 2020). En su estudio, Schwarzahns y colaboradores reportaron que las cepas de *P. pastoris* con alta producción de

proteína heteróloga poseían un alto número de copias del gen de interés y presentaron un alto nivel de expresión estableciendo una correlación directa entre estos dos factores (Schwarzahns *et al.*, 2016). En nuestro caso, la cantidad de plásmido utilizada en el paso de transformación estuvo en el orden de los nanogramos (aprox. 500 ng) y se recuperó un numero pequeño de colonias (menor a 10) transformadas, respecto al aproximado que menciona el protocolo (alrededor de 50 colonias) cuando se utiliza la cantidad recomendada. Esto representaría otro punto crítico en nuestro trabajo ya que sugiere que no se cuenta con un número suficiente de copias del gen para una buena producción de proteína.

En este trabajo, a pesar de haber verificado y confirmado la presencia de la lipasa 135964 tanto en el vector de expresión como en el genoma de la levadura, no fue posible detectar su expresión, y por ende, aislarla para su caracterización, lo cual, pudo deberse a la suma de los diferentes factores descritos, particularmente la falta de optimización del uso de codones de *P. pastoris* en la secuencia original de la lipasa 135964; el uso de una cantidad “pequeña” de plásmido (orden de ng) en el proceso de transformación (lo cual se evidenció por la generación de pocas clonas, <10) que posiblemente impactó en el número de copias del gen que se integraron a la levadura, y la falta de verificación en la secuencia de la lipasa para presencia de señales de degradación. Además de todos los eventos posibles de inserción no canónicas del casete de expresión o deleciones de regiones. En este caso, el factor limitante para obtener mayor cantidad de plásmido fue la eficiencia y tiempo de vida útil de la enzima utilizada para linearizar el vector, ya que después de cada digestión se recuperaba alrededor de la tercera parte de la carga inicial de plásmido.

También es pertinente mencionar que, además de los desafíos técnicos propios de esta investigación, también se enfrentaron circunstancias derivadas de la pandemia por SARS-CoV-2 que significativamente redujeron el tiempo de calidad disponible para el desarrollo del presente trabajo. A partir de marzo de 2020 no se tuvo acceso a las instalaciones los siguientes 5 meses y en los 19 meses siguientes, el tiempo permitido para trabajar en el laboratorio era limitado; aunado a los eventos de cierre de la unidad por casos de COVID-19 o fenómenos naturales (huracanes).

Finalmente, el análisis retrospectivo del presente trabajo coincide con reportes que mencionan que la expresión heteróloga de proteínas recombinantes es un proceso principalmente basado en prueba y error, por lo que para aumentar las probabilidades de obtener una clona exitosa es recomendable iniciar el trabajo con un análisis y diseño meticuloso de cada elemento y su

influencia en cada una de las etapas requeridas, lo cual, también hay que considerar, implica un proceso muy largo de tiempo.

CAPÍTULO IV

IDENTIFICATION OF A NOVEL LIPASE WITH AHSMG PENTAPEPTIDE IN HYPOCREALES AND GLOMERELLALES FILAMENTOUS FUNGI.

Artículo publicado: International Journal of Molecular Sciences. MDPI.

Gutiérrez-Domínguez DE, Chí-Manzanero B, Rodríguez-Argüello MM, Todd JNA, Islas-Flores I, Canseco-Pérez MÁ, Canto-Canché B. Identification of a Novel Lipase with AHSMG Pentapeptide in Hypocreales and Glomerellales Filamentous Fungi. *Int J Mol Sci.* 2022 Aug 19;23(16):9367. doi: 10.3390/ijms23169367. PMID: 36012636; PMCID: PMC9408867.

Denise Esther Gutiérrez-Domínguez¹, Bartolomé Chí-Manzanero¹, María Mercedes Rodríguez-Argüello¹, Jewel Nicole Anna Todd ¹, Ignacio Islas-Flores ², Miguel Ángel Canseco-Pérez ³ and Blondy Canto-Canché ^{1,*}.

1 Unidad de Biotecnología, Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., Calle 43 No. 130 x 32 y 34, Colonia Chuburná de Hidalgo, Mérida C.P. 97205, Yucatán, México.

2 Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., Calle 43 No. 130 x 32 y 34, Colonia Chuburná de Hidalgo, Mérida C.P. 97205, Yucatán, México.

3 Dirección de Investigación, Evaluación y Posgrado, Universidad Tecnológica de Tlaxcala, Carretera a el Carmen Xalplatlahuaya s/n. El Carmen Xalplatlahuaya, Huamantla C.P. 90500, Tlaxcala, México.

* Correspondence: cantocanche@cicy.mx; Tel.: +52-999-942-8330

Abstract: Lipases are enzymes that hydrolyze triglycerides to fatty acids and glycerol. A typical element in lipases is a conserved motif of five amino acids (the pentapeptide), most commonly G-X-S-X-G. Lipases with the pentapeptide A-X-S-X-G are present in species of *Bacillus*, *Paucimonas lemoignei*, and the yeast *Trichosporon asahii*; they are usually thermotolerant and solvent resistant. Recently, while searching for true lipases in the *Trichoderma harzianum* genome, one lipase containing the pentapeptide AHSMG was identified. In this study, we cloned from *T. harzianum* strain B13-1 the lipase ID135964, renamed here as ThaL, which is 97.65% identical with the reference. We found that ThaL is a lid-containing true lipase of cluster III that belongs to a large family comprising highly conserved proteins in filamentous fungi in the orders Hypocreales and Glomerellales, in which predominantly pathogenic fungi are found. ThaL was expressed in conidia, as well as in *T. harzianum* mycelium, where it was cultured in liquid minimal medium. These results—together with the amino acid composition, absence of a signal peptide, mitochondrial sorting prediction, disordered regions in the protein, and lineage-specific phylogenetic distribution of its homologs—suggest that ThaL is a non-canonical effector. In summary, AHSMG-lipase is a novel lipase family in filamentous fungi, and is probably involved in pathogenicity.

Keywords: extreme enzymes; thermotolerant and solvent resistant lipases; AHSMG pentapeptide; pathogenicity factors; non-canonical effectors; filamentous fungi.

1. INTRODUCTION

Lipases are enzymes identified with E.C. 3.1.1.3 that hydrolyze the ester bond of triglycerides to yield fatty acids and glycerol. True lipases have activity on long-chain fatty acids (triacylglycerols, TAGs), and their catalysis requires interfacial activation (Casas-Godoy *et al.*, 2018). This phenomenon occurs when the lid that covers the catalytic site changes its conformation in the presence of a lipid–water interface; this structural switch allows the substrate to access the catalytic domain, and catalysis starts (Negi, 2019). Lipases are also involved in biosynthetic reactions like esterification, interesterification and transesterification. These enzymes have characteristic domains such as the α/β hydrolase fold, a catalytic triad usually composed of serine (S), histidine (H) and aspartate (D) amino acid residues, and the oxyanion hole–[HG sequence, for histidine (H) and glycine (G)] (Rani Gupta *et al.*, 2015).

Another typical element shared among lipases is a conserved motif of five amino acids (the pentapeptide) which contains the catalytic residue Ser (S). The most common pentapeptide is G-X-S-X-G, where X is whatever amino acid (Pérez *et al.*, 2019). The majority of the lipases share this pentapeptide, reported in the PROSITE database as the PS00120 domain (Hulo, 2006). Arpigny y Jaeger (1999) proposed a lipid classification based on the similarity of primary protein sequences and physiological properties, identifying eight families at that time. Currently, lipases comprise 35 families and eleven true lipase subfamilies (Verma *et al.*, 2021; Kovacic *et al.*, 2019; Hausmann y Jaeger, 2010).

Another classifier is the Lipase Engineering Database (LED); the LED classifies lipases into three classes according to the oxyanion hole (GX, GGGX and Y), and into 15 superfamilies based on the pentapeptide (Fischer, 2003).

The pentapeptide is essential for lipase activity; however, little is known about its role in catalytic performance (Bai *et al.*, 2022). In order to explore its function, Hosseini *et al.*, (2013) replaced the pentapeptide AHSMG in the lipase BTL2 of *Bacillus thermocatenuatus* with the pentapeptide GGSAG, found in CRL lipase of *Candida rugosa*. It was observed that the native AHSMG-lipase retained 50% of its activity after 60 min at 65 °C, 80% at pH 9, and about 75% at pH 10. Additionally, it was active in the presence of detergents. Comparatively, the performance of the mutant was lower; it retained 40% of its activity after 60 min at 65 °C, and 65% and 55% of its activity at pH 9 and pH 10, respectively.

The families 1.4 and 1.5 in the Arpigny and Jaegger classification contain lipases with the pentapeptide A-X-S-X-G, where the amino acid alanine replaces the first glycine. The AHSMG pentapeptide is present in various species of *Bacillus* (Sangeetha *et al.*, 2014; Kanjanavas *et al.*, 2010) in *Paucimonas* (formerly *Pseudomonas*) *lemoignei* (Handrick *et al.*, 2001) and in *Paenibacillus amylolyticus* (Masaki *et al.*, 2005) Interestingly, PlaA, an AHSMG-lipase from *P. amylolyticus*, is able to degrade high-molecular-weight polylactic acid, a bioplastic that only a few bacterial enzymes can degrade (Masaki *et al.*, 2005). Chakravorty *et al.*, (2011) compared thermostable and mesostable lipases in silico, and found that thermostable lipases contained the AHSMG pentapeptide.

Rani Gupta *et al.*, (2015) reviewed the functional diversity of lipases in yeast and fungi; among them, they only identified one AHSMG-lipase, TaLipA, in the yeast *Trichosporon asahii*. Sequence analysis showed that it contains an unconventional oxyanion hole (GL); meanwhile, phylogenetic

analysis showed that TaLipA is more related to bacterial and actinobacterial lipases than to fungal lipases (Kumari y Gupta, 2015). TaLipA was cloned and heterologously expressed in *Pichia pastoris*, and was characterized. This lipase was thermostable, with an optimum temperature and pH of 60 °C and 8.0, respectively (Kumari y Gupta, 2015), as is consistent with the deduction of Chakravorty *et al.*, (2011) regarding the potential relationship between the AHSMG pentapeptide and thermostability.

Recently, Canseco-Pérez *et al.*, (2018) carried out an in silico genome-wide search of true lipases in the *Trichoderma harzianum* genome; among them, they found the lipase ID135964, which possesses the pentapeptide AHSMG. To the best of our knowledge, that was the first time that the AHSMG pentapeptide was identified in a lipase from a filamentous fungus, although these authors did not describe the enzyme in detail.

Here, we have cloned from the *T. harzianum* strain B13-1, the lipase that corresponds to protein ID135964 in the *T. harzianum* genome portal (<https://mycocosm.jgi.doe.gov/Triha1/Triha1.home.html>, accessed on 24 March 2022), called “ThaL” in this report. This protein is a true lipase with a lid and a catalytic triad composed of S, D, H, sharing a common ancestor with the AHSMG-lipases TaLipA and RN2, which are thermotolerant and resistant to alcohols and other solvents. When fungal genomes were Blasted, largely conserved orthologs were found in Hypocreales and Glomerellales orders, mostly in the former, making us suspect that this lipase may be involved in pathogenicity. In order to test this hypothesis, *T. harzianum* was cultured in liquid minimal medium, as this condition induces pathogenicity genes (Chakravarty y Varadarajan, 2000; Kumar *et al.*, 2000) and triggers antagonism (Trivedi *et al.*, 2006; Russell *et al.*, 1994). As expected, the expression of ThaL was observed in starvation conditions, supporting a possible role of ThaL in *T. harzianum* microbial antagonism. The predicted structural analysis and mitochondrial localization, disordered regions in the protein, and lineage-specific phylogenetic distribution suggest that ThaL is a non-canonical effector (Nur *et al.*, 2021; Wood *et al.*, 2020).

In summary, this is the first report of the AHSMG-lipase family in filamentous fungi, a large and conserved novel family to which ThaL belongs. Interestingly, these lipases may have a role in fungal pathogenesis and microbial antagonism.

2. RESULTS

2.1. Expression of Lipase 135964 in *T. harzianum*

In order to investigate in which conditions the 135964 lipase is expressed in *T. harzianum*, RT-PCR was conducted on cDNA prepared from mycelia cultured in different culture media (minimal medium-agar added with 1% or 2% olive oil, or with egg yolk, or leaf macerate or cockroach exoskeleton; and PDA medium), or cDNA from conidia. The expression of lipase 135964 was only observed in conidia (Figure 4.1). The expected size for the ORF of lipase 135964 is 1020 bp; the size of the PCR product is in the expected range (Figure 4.1).

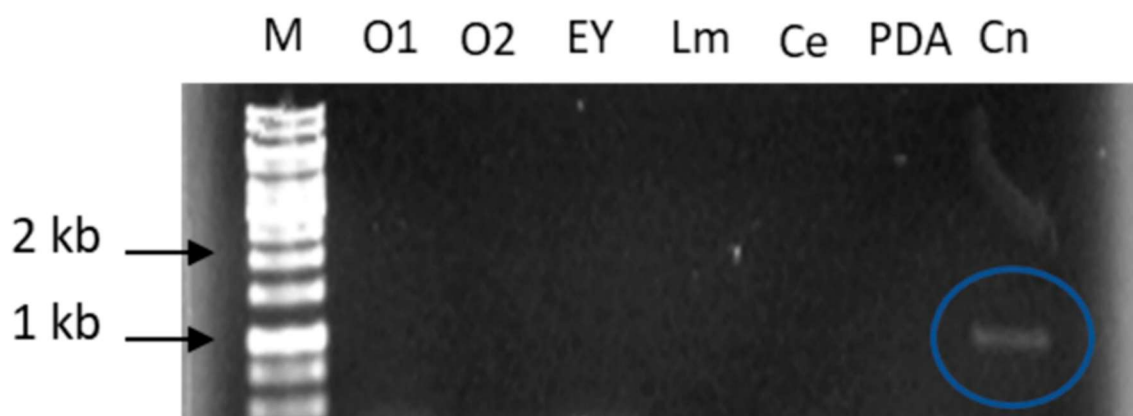


Figure 4.1 Analysis in 1% agarose gel of the expression of *T. harzianum* 135964 lipase using mycelial cDNA from different culture media and conidial cDNA as templates. M: 1 kb DNA Ladder. O1: Medium with 1% olive oil. O2: Medium with 2% olive oil. Ey: Medium with 2.5% egg yolk. Lm: Medium with 12 g/L leaf macerate (*Zephyranthes citrina*). Ce: Medium with 20 g/L cockroach exoskeleton (*Periplaneta americana*). PDA: 39 g/l medium. Cn: Conidia cDNA. The blue circle encloses the transcript of lipase135964.

2.2. Sequencing

The full ORF of the putative lipase 135964 was cloned in pGEM-T Easy vector; the sequencing confirmed 5'-3' orientation, and it comprises 1023 bp, with three additional nucleotides in comparison with the 1020 bp in the sequence from *T. harzianum* CBS 226.95 v1.0 (<https://mycocosm.jgi.doe.gov/pages/search-for-genes.jsf?organism=Triha1>, accessed on 24 March 2022). The deduced amino acid sequence confirmed the isolation in *T. harzianum* strain B13-1 of the lipase homologous to lipase 135964, henceforth called 'ThaL' in this report. ThaL

has one extra amino acid that corresponds to the insertion of one threonine at position 144, such that its total length is 340 amino acids; meanwhile, lipase 135964 has 339 amino acids. Curiously, at GenBank, the sequence KKO99473.1 (hypothetical protein THAR02_08412 [*Trichoderma harzianum*]) is also 340 amino acids in length, with one additional threonine, and it shares 98.23% identity with lipase 135964 from the genome portal. ThaL lipase shares 97.65% identity with lipase 135964 and 99.71% with KKO99473.1 (Table 4.1). ThaL differs from KKO99473.1 at the amino acid residue in position 24, where ThaL has a serine (S) while the hypothetical protein KKO99473.1 has a leucine (L).

Table 4.1 Comparison of the deduced protein sequence from the cDNA obtained in this study, with *T harzianum* lipase 135964 at JGI and KKO99473.1 from Gen Bank.

Name	Source	<i>T. harzianum</i> strain	Length (amino acids)	% identity with 135964	% identity with KKO99473.1	% identity with ThaL
135964	CBS 226.95 v1.0, JGI	CBS 226.95	339	-----	98.23	97.65
KKO99473.1	GenBank	T6776	340	98.23	-----	99.71
ThaL	From this study	B13-1	340	97.65	99.71	-----

The amino acid sequence analysis also shows several conservative changes among *T. harzianum* strains CBS 226.95 and B13-1 lipases in positions 23, 30, 140, 145, 174 and 242, where ThaL has T, A, D, T, R and A, respectively, while lipase 135964 has A, T, E, S, Q and G in those positions (Figure S1).

Secondary structures and the principal motifs were identified on this multiple sequence alignment (Figure S1). ThaL lipase has six α -sheets and eleven α -helices. After α_3 , before the following α_4 helix, the pentapeptide AHSMG is found, which contains the catalytic serine (S). The catalytic triad is composed of S135, D276 and H298. The oxyanion hole comprises the amino acids G 69, L70, F71, G72, S155, M156, and G157, with the last three harbored in the pentapeptide.

2.3. *In silico* Characterization

As previously mentioned, the ThaL lipase is predicted to have 340 amino acids; the most abundant amino acids are leucine (37 residues, 10.9%), alanine (35 residues, 10.3%) and arginine (32, 9.4%). The minor composition corresponds to cysteine, with only one residue, corresponding to 0.3% of the total amino acid composition. ProtParam and CLC bioinformatics tools calculated a molecular mass of 37.67 kDa; the predicted isoelectric point was 9.78. The instability index (II) was computed to be 40.13, which classifies this protein as unstable. IUPred3 predicts a disordered region at amino acid positions 115–194. One potential N-glycosylation site was predicted by NetNGlyc-1.0 on the ninth residue. The aliphatic index was of 90.44, and the estimated half-life was 30 h in vitro and 20 h in yeast, according to ProtParam predictions.

SignalP server and DeepTMHMM server both predict no signal peptide for ThaL lipase; meanwhile, WolfPsort predicts mitochondrial localization.

ThaL shares 20.0% identity with TaLipA, 19.58% with RN2, and 29.28% with Z25G. The identity between TaLipA and RN2 is 25%. The pentapeptide AHSMG is observed in the alignment of ThaL, TaLipA and RN2, but in Z25G, the sequence is AHSQG (Figure S2). These lipases share conservation in part of the oxyanion hole (shown in green lines), but their catalytic triads differ because the amino acids D and H in ThaL (shown in purple *) are not observed in those positions in the other sequences (Figure S2). Although these lipases share the same or similar pentapeptides, they appear to be largely divergent in sequence from one another.

2.4. Orthologs and the Phylogenetic tree

Largely conserved sequences were retrieved by ThaL from GenBank at NCBI. The statistical parameters for the first 100 hits were: a minimum coverage of 77%, an identity percentage ranging from 59.02 to 99.7%, an E value from 3.00×10^{-130} to 0, and a total score from 382 to 658 (Table S1).

Figure S3A corresponds to the multiple sequence alignment from ClustalW-ESPrIt 3.0. Sequence divergence in these lipases was observed at the N-end, and large conservation, with similar or identical amino acids, was observed throughout the sequences of these AHSMG-lipases from filamentous fungi. Additionally, a subclass of AHSMG-lipase containing the motif QTTAASLPSAQ was observed (highlighted in yellow). When lipases TaLipA, RN2, and Z25G are included in this

multi-alignment, conservation is only observed at the oxyanion hole and pentapeptide (Figure S3B), as is congruent with the previous result in Figure S2.

In order to better explore the relationship of TaLipA, RN2, and Z25G with ThaL at the primary sequence level, independent multiple alignments were performed for each one of these lipases, and also for ThaL and its top ten homologs. Each of these lipases (TaLipA, RN2, and Z25G) showed conservation with ThaL and its homologs in the pentapeptide and part of the oxyanion hole, but also in other regions (Figure S4A). However, the pattern of regions highlighted with red shadows (which correspond to the conserved regions), are different in the alignments that include TaLipA, or RN2, or Z25G (Figure S4A). These differences explain the lack of conservation in the alignments of AHSMG-lipases from filamentous fungi when they include at the same time these three proteins (Figure S4B), warning us to be careful with the interpretation of these results.

Immediately next to the AHSMG pentapeptide, in ThaL and its top ten homologs, is the tripeptide GLD; meanwhile, in TalipA, it is TLV; in RN2 it is GAN; and in Z25G, GQT is found (Figure S4B). All of the filamentous fungi retrieved by ThaL contain the tripeptide GLD after the pentapeptide AHSMG (Figure S3A).

In order to investigate the phylogenetic distribution of the ThaL homologs, the NCBI taxonomy tool was used. It was found that the fungi belong to six families (Hypocreaceae, Ophiocordycipitaceae, Nectriaceae, Stachybotryaceae, Bionectriaceae, and Clavicipitaceae) in the Hypocreales order, and the Glomerellaceae family in Glomerellales order. Table 4.2 shows the genera and species that these fungal families comprised. The most frequent are the genera *Fusarium* (49 sequences) and *Trichoderma* (22 sequences). We observed multiple accessions in some fungal species, which were sequences with similar lengths and statistical parameters. Multiple sequence alignments were conducted in ClustalW for sequences arising from the same fungus; high conservation was observed in all of the alignments, but a few conservative changes and in/dels were observed as well (not shown), supporting the supposition that they are not redundant sequences. The alignment allowed us to identify sequences that are extremely similar, each time from the same organisms. In order to avoid bias in the following results, a single sequence from each group of almost identical sequences was arbitrarily selected to continue with the subsequent analyses.

Table 4.2 Taxonomic classification of organisms with orthologs of ThaL lipase of *T. harzianum*.

Order	Family	Genus	Species
Hypocreales	Hypocreaceae	Trichoderma	<i>harzianum</i>
			<i>lentiforme</i>
			<i>simmonsii</i>
			<i>guizhouense</i>
			<i>virens</i>
			<i>asperellum</i>
			<i>arundinaceum</i>
			<i>asperelloides</i>
			<i>semiorbis</i>
			<i>atroviride</i>
			<i>gracile</i>
			<i>reesei</i>
			<i>longibrachiatum</i>
	Ophiocordycipitaceae	Hirsutella	<i>gamsii</i>
			<i>citrinoviride</i>
			<i>cornu-damae</i>
		Drechmeria	<i>minnesotensis</i>
			<i>rhossiliensis</i>
			<i>coniospora</i>
		Tolypocladium	<i>capitatum</i>
			<i>ophioglossoides</i> CBS 100239
			<i>paradoxum</i>
		Ophiocordyceps	<i>sinensis</i> CO18
			<i>unilateralis</i>
			<i>lilacinum</i>
		Purpureocillium	
	Nectriaceae	Fusarium	<i>AF-6(solani species complex)</i>
			<i>solani</i>
			<i>kuroshium</i>
			<i>AF-8</i>
			<i>vanettenii</i>
			<i>floridanum</i>
			<i>euwallaceae</i>
			<i>ambrosium</i>
			<i>albosuccineum</i>
			<i>decemcellulare</i>
			<i>sarcochroum</i>
			<i>flagelliforme</i>
			<i>FIESC-RH6</i>
			<i>sporotrichioides</i>
			<i>avenaceum</i>
			<i>heterosporum</i>
			<i>poae</i>
			<i>venenatum</i>
			<i>pseudograminearum</i>
			<i>graminearum</i>

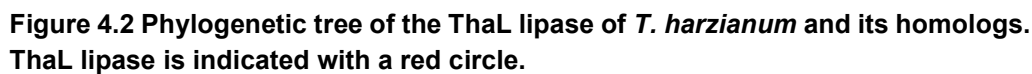
		MPI-SDFR-AT-0072
		<i>oxyporum</i> f. sp. <i>Rapae</i>
		<i>graminearum</i> PH-1
		<i>austroamericanum</i>
		<i>culmorum</i>
		<i>redolens</i>
		<i>longipes</i>
		<i>tricinctum</i>
		<i>austroafricanum</i>
		<i>pseudograminearum</i> CS3096
		<i>mangiferae</i>
		<i>xylarioides</i>
		<i>proliferatum</i>
		<i>proliferatum</i> ET1
		<i>oxysporum</i> NRRL 32931
		<i>fujikuroi</i>
		<i>fujikuroi</i> IM158289
		<i>pseudocircinatum</i>
		<i>verticillioides</i>
		<i>oxysporum</i> f. sp. <i>Lycopersici</i> 4287
		<i>oxysporum</i> f. sp. <i>Melonis</i> 26406
		<i>oxysporum</i> f. sp. <i>Cepae</i>
		<i>oxysporum</i>
		<i>pseudoanthophilum</i>
	<i>Ilyonectria</i>	<i>destructans</i>
		MPI-CAGE-AT-0026
		<i>robusta</i>
	<i>Thelonectria</i>	<i>olida</i>
	<i>Dactylonectria</i>	<i>estremocensis</i>
		<i>macrididyma</i>
<i>Stachybotryaceae</i>	<i>Stachybotrys</i>	<i>chartarum</i>
		<i>chlorohalonata</i>
<i>Bionectriaceae</i>	<i>Clonostachys</i>	<i>solani</i>
		<i>rosea</i>
		<i>rhizophaga</i>
<i>Clavicipitaceae</i>	<i>Pochonia</i>	<i>chlamydosporia</i> 170
<i>Hypocreales incertae sedis</i>	<i>Emericellopsis</i>	<i>atlantica</i>
	<i>Acremonium</i>	<i>chrysogenum</i>
<i>Clavicipitaceae</i>	<i>Epichloe</i>	<i>festucae</i>
Glomerellales		
<i>Glomerellaceae</i>		
	<i>Colletotrichum</i>	<i>spaethianum</i>
		<i>simmondsii</i>
		<i>sojae</i>

The phylogenetic tree (Figure 4.2) shows that *ThaL*, as expected, groups with KKO99473.1, and it is located in the cluster of *Trichoderma*. *Fusarium* species constitute the largest cluster in the Hypocreales order, followed by *Trichoderma*. The sequences from Glomerellales are located at

one end of the tree, next to the *Tolypocladium* clade, as represented by two *Colletotrichum* species. It is also observed that the species of each genus are grouped together, which suggests that the enzyme is transferred between nearby species. Possibly the oldest genus to have acquired it is *Fusarium*, followed by *Trichoderma*, both of which are Hypocreales. The most recent genus to acquire it is possibly *Colletotrichum* (Glomerellales), as only two species possess it.

In order to investigate the classification of the ThaL lipase, the phylogenetic tree published by Canseco-Pérez *et al.*, (2018) was reconstructed. In addition to ThaL, the top ten closest homologs and the lipases RN2, TaLipA, and 2Z5G were included. Members of the AHSMG family cluster together in cluster III, as reported by Canseco-Pérez *et al.*, (2018) for protein ID 135964. The AHSMG-lipases group together in two sister clades, one of them comprising TaLipA (*T. asahii*) and RN2 (*Bacillus licheniformis*), and the other Split into two subgroups, one for 2Z5G (*Geobacillus* sp.) and the largest one, comprising the filamentous fungal AHSMG lipases, suggesting that these lipases arise from a common ancestor. This supports the supposition that ThaL really shares a phylogenetic relationship with TaLipA, RN2 and 2Z5G, although high divergence in their sequences is observed (Figures S2, S3B and S4B).

In order to improve on the existing knowledge of this lipase family and visualize similarities and differences with other lipases, a multiple sequence alignment was conducted with members of the AHSMG-lipase family and some members of the other clusters observed in Figure 4.3. Sequence divergence in the oxyanion hole and catalytic triad among the AHSMG-family and the other lipases was observed. Close to the pentapeptide, a stretch of hydrophobic amino acids (valine, isoleucine, alanine) is present in all of the lipases (Figure S5). A few motifs are unique to members of this family, such as ASLVTIATPH and ENDGLV. The tripeptide GLD, mentioned above, next to the AHSMG pentapeptide, is absent in all other families. Therefore, it is a putative marker for these filamentous fungal lipases, making it interesting for further investigations.



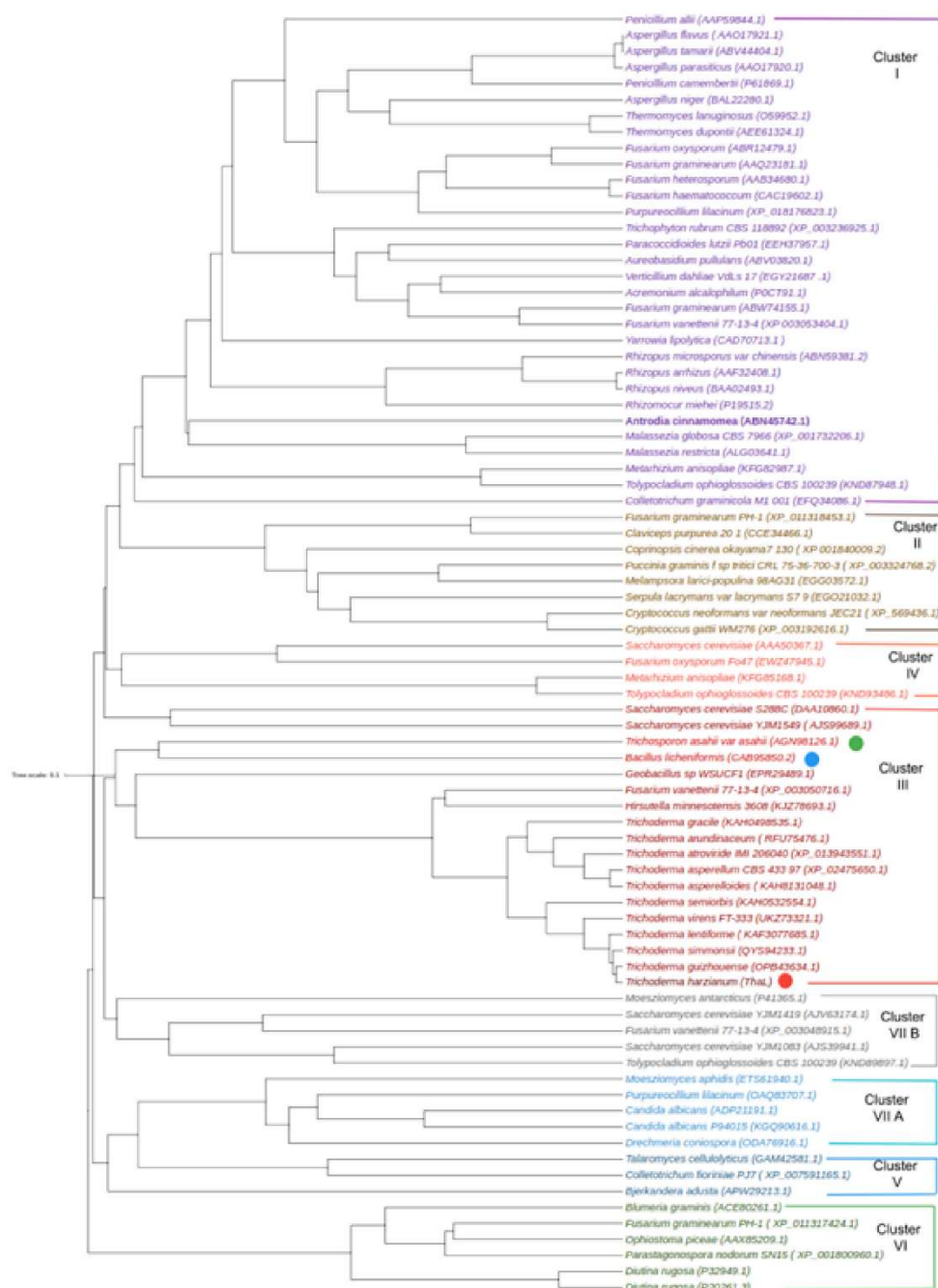


Figure 4.3 Phylogenetic tree of lipase families. The phylogenetic tree from Canseco-Pérez *et al.*, (2018) was reconstructed, and at this time the sequences of ThaL (red circle) and its top ten hits, along with TaLipA (green circle), RN2 (blue circle), and 2Z5G (purple circle), were included. The accession numbers in parenthesis in all of the sequences correspond to GenBank IDs. The tree was generated with the MAFFT program v7.0, using the UPGMA average linkage algorithm (Rozewicki *et al.*, 2019). The tree was edited in iTOL v6 (Letunic y Bork 2007).

2.5. Three-Dimensional Model of the ThaL Lipase

The protein in the PDB database with the closest sequence to the AHSMG pentapeptide was the 2Z5G lipase from *Geobacillus zalihae* (GenBank EPR29489.1), which has the pentapeptide AHSQG. This PDB model of 2Z5G lipase was downloaded and used as a template to generate the 3D model of ThaL (Figure 4.4A–C). In Figure 4.4A, β -sheets are in red and α -helices are in blue. The spatial distribution of the catalytic triad (S135, D276 and H298) is shown. Figure 4.4B is a close up showing the oxyanion hole (in purple), and the triad (in grey); the cyan clouds represent the Van der Waals forces established by interactions between amino acids from the catalytic triad and the oxyanion hole. Figure 4.4C shows the superposition of ThaL and 2Z5G; the β -sheets are superposed, but only a few α -helices overlap. The grey spheres correspond to the catalytic triad of ThaL. In Figure 4.4D, the Orange region represents the lid in ThaL (A199-A214), but in this case, using PDB 1EX9 as a template. The lid is comprised of the α -helices 4, 5, 6 and 8 according to Nardini *et al.*, (2000) in their analysis of the 1EX9 protein.

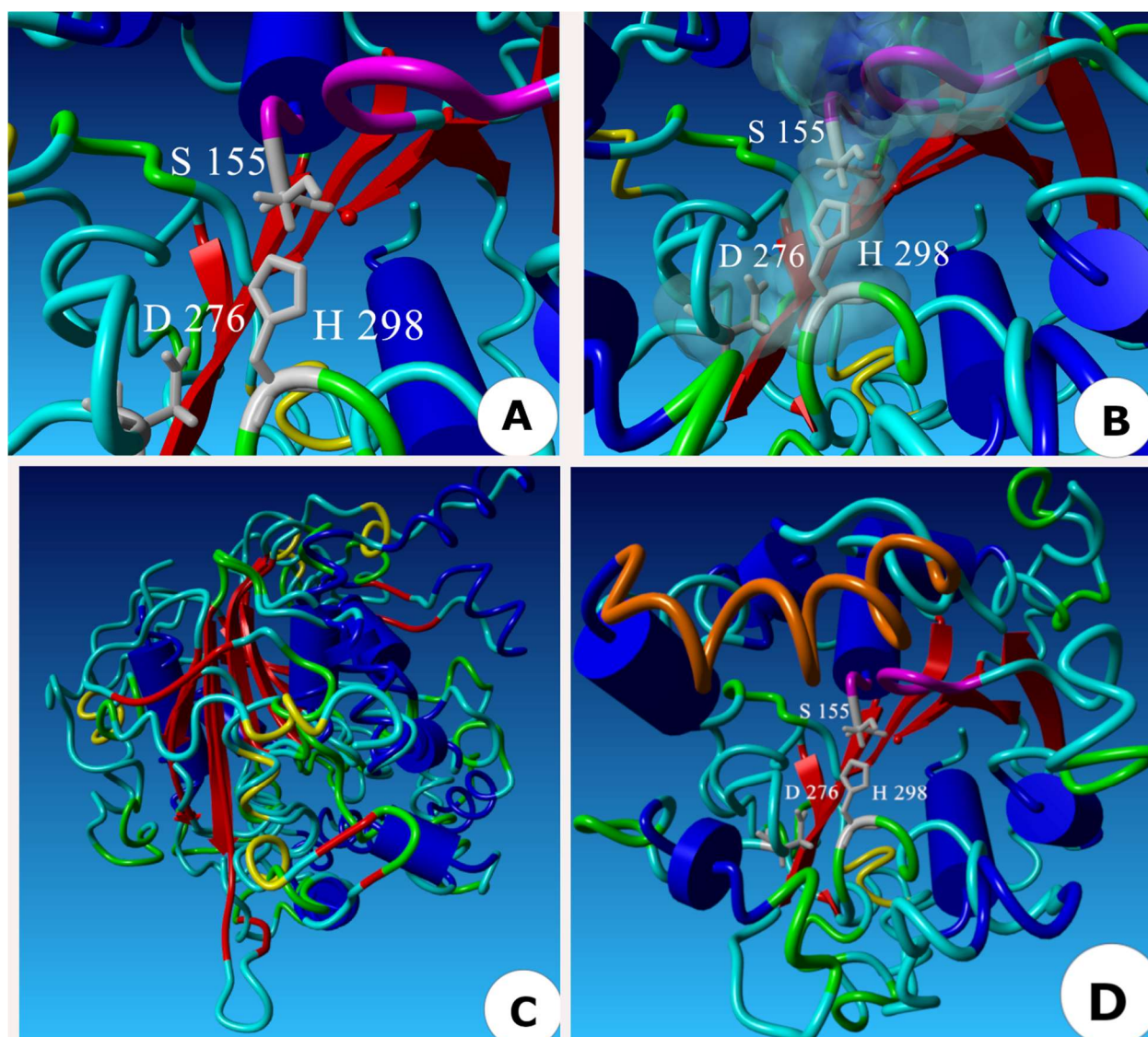


Figure 4.4 Three-dimensional model of the ThaL lipase of *T. harzianum*. (A) 3D model based on the protein 2Z5G from *Geobacillus zalihae* as a template; the β -sheets are in red, and α -helices are in blue. The catalytic triad, in gray. (B) Close up of catalytic triad and oxyanion hole; Van der Waals forces are shown as cyan clouds. (C) Superposition of ThaL and 2Z5G. (D) Lid identification in ThaL (orange) based on PDB 1EX9.

2.6. Pathogenicity induction by starvation

Curiously, homologs of ThaL lipase were found to be distributed in pathogenic fungi. In order to explore whether this lipase is involved in *T. harzianum* antagonism, the fungus was grown in a liquid minimal medium, as starvation conditions mimic the environment in the host and are used to induce genes involved in pathogenesis and antagonism (Burgos-Canul *et al.*, 2019; Oh *et al.*,

2017; Ramírez R. *et al.*, 2015). The expression of ThaL was evaluated by performing RT-PCR on cDNA prepared from mycelia collected on days 0, 1, 3, 5 and 7, in order to determine whether ThaL is transcribed under these conditions.

As expected from the hypothesis, ThaL expression was observed in cDNAs from *T. harzianum* mycelia, when the fungus was starved in a nutrient-poor medium (Figure 3.5A); the expression of ThaL was observed on day zero, that is, after the fungus was inoculated in the minimal medium and it sensed its environment. The expression of ThaL continued over the 7 days evaluated. As a reference gene, an elongation factor that is expressed constitutively was amplified from *T. harzianum* mycelia (Figure 4.5B).

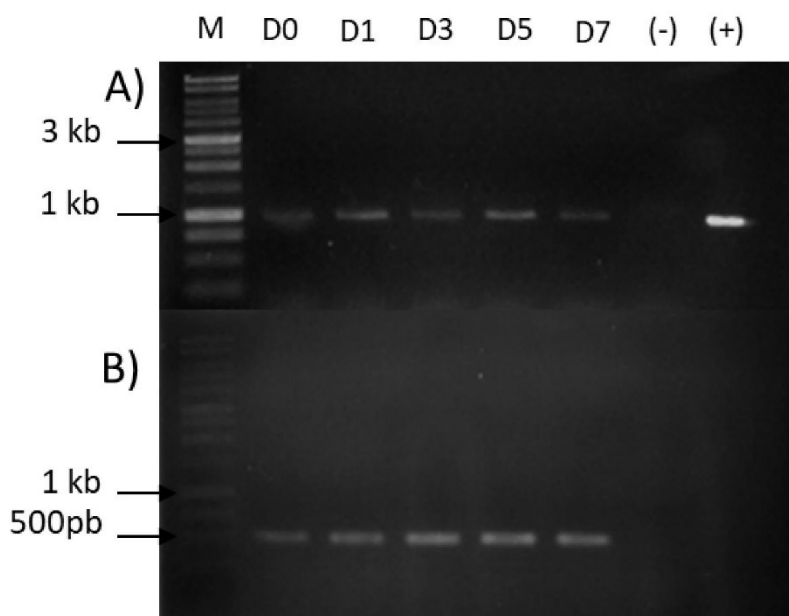


Figure 4.5 Expression of ThaL lipase *T. harzianum* cultured in liquid minimal medium. (A) Expression of ThaL in *T. harzianum*. (B) Elongation factor amplification. The temporal course corresponds to the days 0, 1, 3, 5 and 7 (labeled on the lanes as D0–D7). M: molecular marker, 1Kb DNA Ladder. (-) negative PCR control, without template. (+) positive PCR control, with gDNA as a template.

3. DISCUSSION

Lipases are versatile enzymes with a wide range of catalytic properties that make them suitable for industrial processes related to food (dairy, fat and oil, bakery, cheese flavoring, wine, meat and fish), pharmaceuticals and medicine, cosmetics, textiles, and detergents (Ramesh *et al.*, 2020). Additionally, lipases have applications in agriculture (for example, CalB lipase is used to produce the herbicide dimethenamide-P catalyzing enantioselective transamination), environmental cleaning (bioremediation, the paper industry, leather degreasing, and plastic biodegradation), bioenergy and biodiesel production, and as enzyme biosensors (Darwish *et al.*, 2021; Chandra *et al.*, 2020; Ramesh *et al.*, 2020). Nowadays, the main sources of lipases are microorganisms: bacteria and fungi. However, fungi are preferred because of their ability to degrade materials with a high content of carbon and nitrogen (Geoffry y Achur, 2018). Thus, the relevance of these biocatalysts in industry, biotechnology and academic areas makes the search for lipase-producing fungi the focus of dynamic research.

Lipases, at the sequence level, are a very diverse class of enzymes; there are currently 35 registered families, in comparison with the eight which were initially identified (Arpigny y Jaeger, 1999; Verma *et al.*, 2021). The pentapeptide is the motif that distinguishes lipase subfamilies: family III (GX SXG) and family V (GDSAG), for example (Arpigny y Jaeger, 1999). Characteristic fungal lipases harbor the pentapeptide form GX SXG.

AHSMG-lipases were reported earlier in the *Bacillus* genus, and then in the yeast *T. asahii*, although the biological function of this pentapeptide has not been determined so far. Eggert *et al.*, (2002) (Eggert *et al.*, 2002) characterized a *Bacillus subtilis* LipB, changing alanine 76 to glycine in the AHSMG pentapeptide sequence. This mutation affected the stability of the lipase at different pHs. Moreover, Bai *et al.*, (2022) changed the X site in the GX SXG domain of *Penicillium expansum* lipase (PEL), and observed a decrease in the activity of the mutant lipase. Liu *et al.*, (2021) found similar results in a hormone-sensitive lipase of *Pseudomonas* sp. E2-15. Together, those findings support the supposition that the substitution of any amino acid residue in the pentapeptide sequence impacts the catalytic performance of the lipase.

AHSMG lipases from *Bacillus* spp. (RN2) (Kanjanasavas *et al.*, 2010) and *T. asahii* (TaLipA) are biotechnologically attractive because they are thermotolerant (50–60 °C) and solvent resistant (to different alcohols, DMSO, ethyl acetate, toluene and hexane) (Kumari y Gupta, 2015), which makes ThaL, also with the pentapeptide AHSMG, attractive for further heterologous expression

and characterization. The amino acid composition of ThaL shows that its most abundant residue is leucine, followed by alanine and arginine; these amino acids contribute to the aliphatic index of 90.44 of ThaL lipase. The aliphatic index of ThaL is higher than those found in mesophilic proteins, which suggests that ThaL is a thermophilic protein. Furthermore, the alanine and arginine residues contribute to protein stability, with alanine increasing the rigidity (Chakravarty y Varadarajan, 2000) and arginine promoting the establishment of electrostatic interactions (Kumar *et al.*, 2000). Statistically, thermophilic proteins contain a greater amount of these two amino acids (Trivedi *et al.*, 2006). As is consistent with this hypothesis, the ThaL sequence only has one cysteine residue. This amino acid is found in disulfide bridges involved in protein folding; however, it is thermolabile, and becomes oxidized at high temperatures (Russell *et al.*, 1994). Usually, its presence in thermophilic proteins is very low (Kumar *et al.*, 2000).

Previously, an AHSMG-lipase was reported in the yeast *T. asahii*, but this family is novel in filamentous fungi. Curiously, the *Bacillus* genus and *T. asahii* are used in agriculture as biocontrol agents (Bosqueiro *et al.*, 2020; Duarte-Oliveira *et al.*, 2017; Khan *et al.*, 2017; Heidarzadeh y Baghaee-Ravari, 2015). Whether these lipases are implicated in microbial antagonism remains to be investigated.

Canseco-Pérez *et al.*, (2018) performed a genome-wide search of true lipases, and found a lipase with the pentapeptide AHSMG, lipase 135964. In this study, we found that this lipase is distributed in eight fungal families in the order Hypocreales, and three species of the *Colletotrichum* genus (Glomerellales order). Multiple alignment and statistical data (identity 59.02–99.71%, coverage 77–100%, E-value 3.00E-128-0, and score 382–658) show that AHSMG-lipases comprise a novel, largely conserved protein family in Hypocreales and Glomerellales fungi (Figure S3A, and Table S1). It was found that lipases from filamentous fungi have distinctive motifs, such as the tripeptide GLD next to pentapeptide AHSMG, while the GLD tripeptide is not present in AHSMG-lipases of non-filamentous fungi (Figures S3B and S4B) or in other lipase families (Figure S5). Curiously, most of the fungal species with homologs of ThaL are pathogens of plants or other microorganisms. Lipases have been reported as virulence factors in both human (Park *et al.*, 2013) and plant fungal pathogens (Chandra *et al.*, 2020; Voigt, Schäfer, y Salomon, 2005; Stehr *et al.*, 2003), and they have even been described as effectors in fungi (Blümke *et al.*, 2014); most of these lipases are overexpressed during the infection of the hosts (Voigt *et al.*, 2005; Stehr *et al.*, 2003). According to Schuster y Schmoll (2010), many fungi contain enzymatic elements that allow them to establish a successful interaction with the host, with these being mainly lytic enzymes such as lipases.

Fungi can produce lipases in three ways: (1) only in the presence of an inducer (lipid); (2) without the need of an inducer, but the expression is incremented by it; and (3) constitutively (Geoffroy y Achur, 2018). In the beginning, we were unable to induce the expression of *T. harzianum* AHSMG-lipase ThaL even in the presence of classic lipase inducers (olive oil and egg yolk, among others). This lipase was only observed when RT-PCR was conducted on cDNA from conidia. The lipid contents of the spores of many fungi range from 5 to 17% dry weight, and can increase to 35% dry weight in some fungi such as rusts (Pupin *et al.*, 2000), such that the importance of lipases during conidial germination is evident. However, although the involvement of ThaL in conidial metabolism cannot be discarded, it is probably not its primary role, as it is not widely distributed in all fungal kingdoms, such as genes involved in conidial processes, e.g., autophagy. According to Keyhani (2018), the recycling or assimilation of host lipids is essential for fungal invasion, and the capability of conidia to metabolize and assimilate lipids from the host might increase virulence. Conidial-specific lipases have been previously identified in *Alternaria brassicicola*, a pathogen that infects cauliflower leaves (Berto *et al.*, 1999), and in *Nectria haematococca* (anamorph *Fusarium solani*), a pathogen that infects tomato leaves (Nasser Eddine *et al.*, 2001). In both cases, lipases are localized on the surface of conidia. Interestingly, anti-lipase antibodies suppressed the virulence of the conidia of these fungi, and they became unable to infect host leaves; in the case of *A. brassicicola*, anti-lipase antibodies reduced 90% of the lesions on intact cauliflower leaves. The expression of ThaL only in *T. harzianum* conidia supports a potential role of this lipase during the interaction of *T. harzianum* with its hosts.

In order to explore whether ThaL is involved in pathogenicity, *T. harzianum* was cultured in a liquid minimal medium, as this mimics the environment found in the host apoplast, and induces the expression of the proteins involved in fungal pathogenesis and antagonism (Burgos-Canul *et al.*, 2019; Oh *et al.*, 2017; Ramírez R. *et al.*, 2015). The transcription of ThaL was observed when *T. harzianum* was subjected to starvation. Curiously, this result is contrary to the usual behavior of lipase regulation, as nitrogen is commonly necessary in a culture medium for optimal enzyme production (Adetunji y Olaniran, 2021). Here, minimal medium—which means nitrogen starvation—induced the expression of ThaL. Likewise, ThaL was not induced in the presence of different lipid substrates (Figure 4.1), which usually induce lipases, suggesting that the role of ThaL is not in nutrition, but it may be involved in other processes.

It was interesting that the transcript of ThaL lipase was observed when *T. harzianum* was cultured in a liquid minimal medium, but not when the fungus was cultured on solid minimal medium. It is known that the fermentation conditions influence the yield of fungal lipase production; although

growth in a solid state is more similar to natural conditions, liquid culture allows the better control and homogenization of physicochemical parameters (Geoffroy y Achur, 2018). Similarly, Akao *et al.*, (2002), reported the differential expression of enzymes in *Aspergillus oryzae* in solid and liquid cultures, and these authors were able to identify the expression of specific genes related to solid culture (AOS) and others for liquid culture (AOL).

All of the fungal lipases with roles as virulence factors have been described as extracellular, and their protein sequences contain signal peptides for secretion. On the contrary, the signal peptide was not identified in *T. harzianum* ThaL lipase, even when various signal peptide predictors, including SignalP v 2.0 and v3.0 (Teufel *et al.*, 2021), were employed. Instead, ThaL was predicted to be sorted to the mitochondria.

Although early fungal effectors (microbial proteins used by the microbe to manipulate the host metabolism and their fundamental processes) were described as small secreted, cysteine-rich, extracellular proteins (Carreón-Anguiano *et al.*, 2020), knowledge about these pathogenicity factors has changed recently. Currently, it is known that many effectors target nuclei or mitochondrial proteins in the hosts, instead of functioning in the extracellular space (Navarrete *et al.*, 2021; Tzelepis *et al.*, 2021). In addition, some effectors/pathogenicity factors which have no signal peptide are secreted through multivesicular bodies (which is called an “unconventional secretion system”), which become extracellular vesicles called “virulence bags” (Garcia-Ceron *et al.*, 2021; Liebana-Jordan *et al.*, 2021). The effector predictors EffHunter (Carreón-Anguiano *et al.*, 2020) and EffectorP (Sperschneider *et al.*, 2018) do not recognize ThaL as an effector (data not shown). However, some validated true effectors such as PIIN 08944 and AvrSr355, which do not meet the classical properties of effectors, are elusive to current effector predictors (Carreón-Anguiano *et al.*, 2020). Therefore, the predicted mitochondrial localization and the absence of a signal peptide in ThaL do not disqualify it as a potential pathogenicity factor, and based on these findings, ThaL probably belongs to the “non-canonical effector” classification.

Other points supporting the hypothesis of an effector role for ThaL are its sequence variability in different strains (Table 4.1), as well as the presence of disordered regions in the protein, which was recently reported in effectors (Nur *et al.*, 2021), and the lineage-specific phylogenetic distribution (Table 4.2) common to effectors (Nur *et al.*, 2021; Wood *et al.*, 2020).

None of the known fungal lipase virulence factors are retrieved using Blastp with ThaL as the query. One of the fungal genera in which lipases related to pathogenicity have been studied is

Fusarium. F. solani surface-bound-conidial lipase (GenBank AY292529), contains the pentapeptide GHSLG (Nasser Eddine, Hannemann, y Schäfer 2001); meanwhile, FGL1 from *F. graminearum* (GenBank AAQ23181.1) is secreted, and contains the pentapeptide GHSLG. Therefore, functional orthology between these lipases and ThaL is not supported, suggesting that ThaL lipase belongs to a novel family involved in fungal pathogenesis.

Based on structural characteristics, that is, the oxyanion hole, catalytic triad, and the lid (Figure 4.4), ThaL is a true lipase, belongs to cluster III of lipases (Figure 4.3), and shares a common ancestor with TaLipA, RN2 and Z25G lipases (Figure 4.3). Whether ThaL is thermotolerant and solvent resistant—like the AHSMG-lipases characterized so far—needs to be determined.

In summary, the *T. harzianum* lipase, ThaL, belongs to a novel and conserved AHSMGlipase family in (filamentous) Hypocreales and Glomerellales fungal phytopathogens, and is probably a novel virulence factor. Further studies are necessary to confirm whether this protein is actually an effector.

4. MATERIALS AND METHODS

4.1. Biological Material

T. harzianum strain B13-1 was used for this study. The mycelia were cultured at 25 °C in Petri dishes on potato dextrose agar (PDA), as well as minimal medium (yeast nitrogen base without amino acids and ammonium sulfate, Sigma-Aldrich) added with 1.5% agar and supplemented with 1% or 2% olive oil (v/v), 2.5% (w/v) egg yolk, 12 g/L leaf macerate (*Zephyranthes citrina*) or 20 g/L cockroach exoskeleton (*Periplaneta americana*), in order to investigate conditions where the AHSMG-lipase 135964 is expressed. In each case, the mycelia were harvested on days 1, 3 and 5, and were conserved at -80 °C until use.

For conidia production, mycelia were cultured in PDB liquid medium, harvested, filtered, and homogenized in PDB in a food processor. One milliliter of fungal fragments was placed on PDA solid medium, in the center of the Petri dish. The cultures were sealed and incubated at 23 °C and exposed to light; after 72 h, the seal was removed to allow aeration. After five days, the conidia were harvested in 2% gelatin solution by gently sweeping them with a natural hairbrush.

4.2. Pathogenicity Induction by Starvation

T. harzianum strain B13-1 was cultured in 50 mL PDB liquid medium for 5 days at 25 °C and 100 rpm. The mycelia were centrifuged at 1700 x g for 15 min, washed three times with sterile distilled water, and centrifuged each time as above. The mycelia were inoculated in liquid minimal medium (1.7 g yeast nitrogen base without amino acids and ammonium sulfate, Sigma-Aldrich, 5 g dextrose, 100 mL distilled water). Three grams of mycelia were placed in a 250 mL flask with 50 mL minimal medium. The mycelia were harvested on days 1, 3, 5 and 7, and the samples were centrifuged at 1700 x g for 10 min at 4 °C, weighted, and stored in liquid nitrogen.

All of the experiments were conducted with three replicates.

4.3. RNA Extraction and cDNA Synthesis

The total RNA was extracted from conidia or mycelia with Trizol® (Invitrogen). Briefly, the samples were macerated with liquid nitrogen until a fine powder was obtained, which was then homogenized with 2 mL Trizol. The mixtures were transferred to Eppendorf tubes and incubated at room temperature for 5 min; 0.2 mL of chloroform was added, incubated for 3 min, and centrifuged at 12,000 x g at 4 °C for 15 min. The supernatants were transferred to new tubes, and to each one 0.5 mL of isopropanol was added. They were then incubated for 10 min and centrifuged at 12,000 x g for 10 min at 4 °C. The supernatants were discarded, and the RNAs were washed with 1 mL 75% ethanol. The pellets were air-dried for 5–10 min, and then each was resuspended in 30 μ L RNase-free distilled water. The RNA samples were frozen at -80 °C until use.

cDNAs were synthesized from 1 μ g RNA; the reaction mixtures were composed of 1 μ L 50 μ Moligo dT, 1 μ L 10 mM dNTP Mix, 4 μ L 5X First-Strand Buffer, 1 μ L 100 mM DTT, 1 μ L RNaseOUT™ Recombinant RNase Inhibitor, and 1 μ L (200 units/ μ L) SuperScript™ III RT, in a final volume of 13 μ L. The reactions were heated at 65 °C for 5 min, and then immediately cooled in ice for 1 min; cDNA synthesis was carried out at 50 °C for 1 h. The cDNAs were aliquoted and stored at -80 °C until use.

4.4. Cloning and Sequencing

The full coding region of the AHSMG-lipase 135964 (ThaL) was amplified with the primers Forward 5'-ATGAAGCAATGGCCCCATTGG-3' and Reverse 5'-TCACAATCCTTCCTTGGCCAACATG-3' (expected size 1020 bp) in a thermal cycler BioRad T100. The reaction mixture included 7.5 µL Dream Taq Hot Start Green PCR Master Mix 2X (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA); Forward primer and Reverse primer, 0.4 µM each; 1 µg cDNA as a template; and RNase-free ultrapure water, to a final volume of 15 µL. The PCR conditions were: 3 min at 95 °C for initial denaturation; 30 cycles of 95 °C x 30 s, 65 °C x 30 s and 72 °C x 1 min; and a final extension time of 5 min at 72 °C.

For the cloning and sequencing, the coding sequence ThaL was PCR-amplified on cDNA from conidia using the high-fidelity DNA polymerase Phusion High Fidelity (Thermo Fisher Scientific).

The PCR product was purified from gel with a QIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN, Germantown, MD, USA), quantified in Nanodrop 2000c (ThermoScientific), and cloned into the pGEM-T Easy plasmid (PROMEGA, Madison, WI, USA) according to the supplier manual. *Escherichia coli* Top 10 chemically competent cells were transformed and then cultured in LB medium with ampicillin, X-Gal and IPTG. The positive clones were confirmed by colony PCR with M13 forward and reverse primers (Thermo Fisher).

DNA from the positive clones was extracted and purified with QIAprep Spin Miniprep kit (QIAGEN). The DNA samples were sent to Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LANBAMA, IPICYT, México) for sequencing; universal T7 and SP6 primers were used for the sequencing of both DNA strands.

4.5. Expression Analysis

The analysis of the expression of ThaL was conducted by RT-PCR, using each of the cDNAs produced in this study and the primers described above. As a positive and loading control, the elongation factor was amplified as an endogenous reference (Puglisi *et al.*, 2012).

4.6. Bioinformatics

4.6.1. In Silico Characterization

The physicochemical properties of ThaL lipase (amino acid composition, molecular mass, charge, aliphatic index, and estimated half-life) were determined with the ProtParam tool from Expasy portal (Gasteiger *et al.*, 2005). The presence of a signal peptide sequence was determined using SignalP v.6.0 (Teufel *et al.*, 2021) and DeepTMHMM servers (Hallgren *et al.*, 2022). The subcellular location of the protein was predicted using WolfPsort (Horton *et al.*, 2007), and the disordered regions were predicted by IUPred3 (Mészáros *et al.*, 2018). The N-glycosylation was predicted by NetNGlyc-1.0 (Ramneek Gupta y Brunak, 2002).

For the comparison with known AHSMG-lipases, ThaL lipase was aligned with the RN2 of *Bacillus sp.* (GenBank ABQ81810.1 (Kanjnavas *et al.*, 2010)) and the TaLipA of *T. asahii* (Gen-Bank AGN98126.1 (Kumari y Gupta, 2015)). Similarly, the protein 2Z5G from *Geobacillus zalihae* (GenBank EPR29489.1) was included in the analyses, as this thermoalkalophilic lipase is the crystallized protein that is retrieved by ThaL (first hit with the closest pentapeptide, AHSQG) from the PDB database.

Multiple sequence alignments were conducted by ClustalW (Larkin *et al.*, 2007), and information on the identity shared among these lipases was downloaded from the Percent Identity Matrix by Clustal2.1. Likewise, the ClustalW alignment outputs were submitted to EsPript 3.0 in order to highlight the consensus sequences (Robert y Gouet, 2014). For the alpha helix and beta strand prediction, the multi-alignment was analyzed using the EsPript 3.0 secondary structure depiction tool (Robert y Gouet, 2014).

4.6.2. Ortholog Identification and Phylogenetic Analysis

The Blastp analysis was performed using the default parameters and the amino acid sequence of ThaL lipase as the query against the non-redundant taxid 4751 (fungi) protein data base at GenBank (NCBI). The amino acid sequences of the first 100 hits were downloaded and used to perform an alignment in the ClustalW server using the default parameters; the output was submitted to the EsPript 3.0 program for alignment consensus visualization (Robert y Gouet, 2014). The statistical results for the percentage identity, coverage, E value and Total score were downloaded as a description table in the CSV format.

Lipase-conserved domains (pentapeptide and catalytic triad) were identified by manual comparison with results from Canseco-Pérez *et al.*, (2018) and Matsumura *et al.*, (2007). The alpha helices and beta sheets were identified with EsPript 3.0 program, and are indicated in the alignments.

A phylogenetic tree was constructed using the MEGA 11.0 software for ThaL lipase, along with its homologous sequences retrieved from GenBank; the maximum-likelihood method was employed with the default settings, and 1000 bootstrap was used.

In order to classify ThaL lipase and its close homologs, the phylogenetic tree reported by Canseco-Pérez *et al.*, (2018), was reconstructed with lipase amino acid sequences reported by Rani Gupta *et al.*, (2015) and Yadav *et al.*, (2012), along with the RN2 of *Bacillus sp.*, the TaLipA of *T. asahii*, the 2Z5G of *Geobacillus zalihaev*, and ThaL lipase and its top ten closest homologs retrieved in Blastp.

In order to identify all of the regions defining this fungal lipase family and the differences with other lipase families, a multiple-sequence alignment was conducted with ThaL, its top ten closest homologs, *Geobacillus zalihaev* 2Z5G lipase, and selected lipases from each lipase cluster, according to Canseco-Pérez *et al.*, (2018). The selected lipases were as follows: cluster I, *Fusarium oxysporum* (ABR12479.1) and *Verticillium_dahliae* (EGY21687.1); cluster II, *Melampsora larici-populina* (EGG03572.1) and *Cryptococcus gattii* (XP_003192616.1); cluster III, ThaL and its homologs; cluster V, *Talaromyces cellulolyticus* (GAM42581.1); cluster VI, *Parastagonospora nodorum* (XP_001800960.1); cluster VIIA, *Candida albicans* (ADP21191.1); and cluster VIIB, *Fusarium vanettenii* (XP_003048915.1). Cluster IV was not included because it comprises very large lipases, which makes alignment difficult and prevents the observation of conserved motifs among clusters.

4.6.3. 3D Modeling

The protein in the PDB database with the highest score and the closest pentapeptide to ThaL was selected as the best model; this was the protein 2Z5G from *Geobacillus zalihaev*. Three-dimensional modeling was performed using the protein 2Z5G as a template. Alignment was conducted with the MUSTANG program (Konagurthu *et al.*, 2006), previously uploaded in YASARA software (Krieger *et al.*, 2009). The identification of the catalytic triad and oxyanion hole

was conducted in the alignment with the PDB model for 2Z5G. The lid was identified in ThaL by superposition with PDB 1EX9 as a template, and was based on Nardini *et al.*, (2000).

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms23169367/s1>.

Author Contributions: Conceptualization, D.E.G.-D. and B.C.-C.; methodology, B.C.-M., M.M.R.-A., J.N.A.T. and D.E.G.-D.; software, M.Á.C.-P. and B.C.-C.; validation, I.I.-F. and B.C.-C.; formal analysis, D.E.G.-D., M.Á.C.-P. and B.C.-C.; investigation, B.C.-M., M.M.R.-A., J.N.A.T., D.E.G.-D.; resources, B.C.-C.; data curation, M.Á.C.-P. and B.C.-C.; writing—original draft preparation, D.E.G.-D.; writing—review and editing, B.C.-C., M.Á.C.-P. and I.I.-F.; supervision, B.C.-C.; project administration, B.C.-M. and B.C.-C.; funding acquisition, B.C.-C. All coauthors contributed to the writing and correction of the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received partial funding from CONACyT-Mexico projects FOSEC-SEP No. 220957 and FOP16-2021-01 No. 320993, Fellowships No. 371872 for Gutiérrez-Domínguez D.E. and No. 291236 for Todd J.N.A., and the CICY fiscal budget for scholarship for Rodríguez-Argüello M.M.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES GENERALES

Las características estructurales de la lipasa ThaL (oxyanión, triada catálítica y lid) confirman que es una lipasa verdadera perteneciente al grupo III de lipasas.

El análisis de la secuencia primaria de la lipasa ThaL concuerda con las características de composición de aminoácidos de las proteínas termoestables.

Las lipasas fúngicas que presentan pentapéptido AHSMG constituyen una nueva familia en lipasas de hongos filamentosos, por lo tanto, se acepta la primera hipótesis planteada.

Bajo las condiciones empleadas en este estudio, no fue posible recuperar en cantidad suficiente la lipasa ThaL a través de la expresión heteróloga usando el sistema de *P. pastoris*, por lo que no se realizó la evaluación de su desempeño catalítico, ni se confirmó experimentalmente su termoestabilidad. Por lo tanto, no se pudo confirmar o rechazar la segunda hipótesis planteada.

PERSPECTIVAS

Dados los resultados obtenidos en este trabajo se propone que el proceso de expresión heteróloga se optimice en la parte correspondiente a la clonación y expresión, para lo cual se propone:

- ✓ Optimizar el uso de codones para *P. pastoris*.
- ✓ Asegurar la inserción de múltiples copias del gen de interés al sistema de expresión.
- ✓ Generar las condiciones para un escrutinio a gran escala de transformantes.

Además, conducir análisis bioinformáticos más exhaustivos en la comparación a nivel genómico y de secuencia primaria de esta lipasa con aquellas de tipo termofílico, como complemento a las predicciones obtenidas que indican que la lipasa 136954 de *Trichoderma harzianum* es termoestable.

ANEXOS

Material complementario del artículo: Identification of a Novel Lipase with AHSMG Pentapeptide in Hypocreales and Glomerellales Filamentous Fungi.

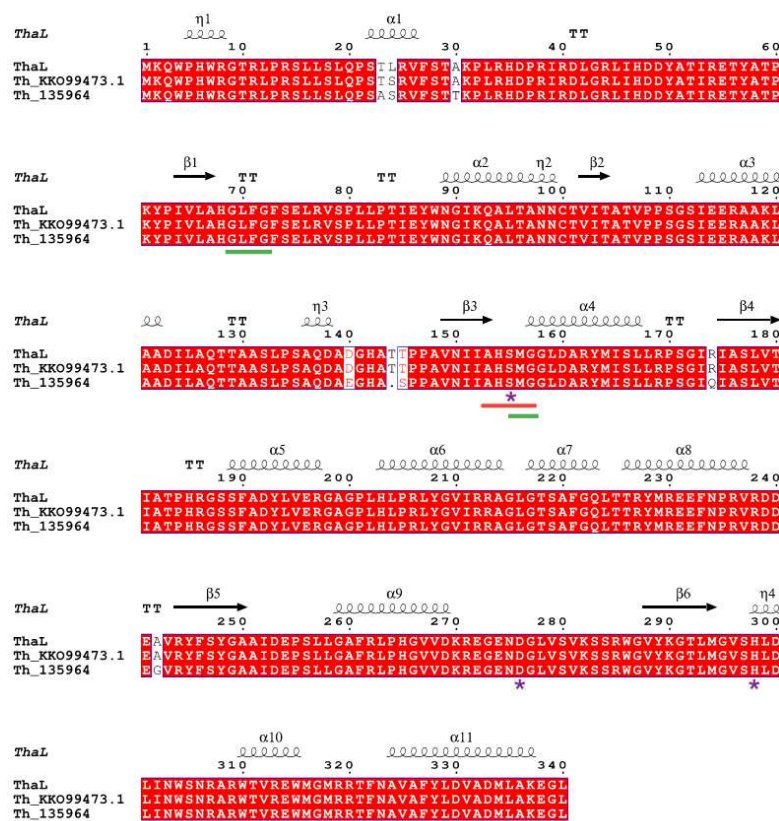


Figure S1. ThaL lipase and closest hits in *Trichoderma harzianum*.

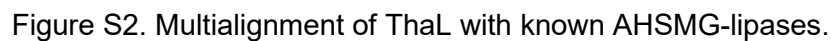


Table S1. Description Table of ThaL homologs.

Scientific Name	Accession	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. ident	Acc. Len
Trichoderma	KKO9473.1	hypothetical	658	658	100%	0	99.71	340
Trichoderma	KAF3077685	Lipase 2 [Tric	645	645	100%	0	97.08	343
Trichoderma	XP_02477702	hypothetical	644	644	100%	0	97.65	339
Trichoderma	PK42226.1	hypothetical	642	642	100%	0	97.35	339
Trichoderma	QYS94233.1	GPI inositol-c	637	637	100%	0	96.76	336
Trichoderma	OPB43634.1	Triacylglycer	635	635	100%	0	97.35	334
Trichoderma	UK273321.1	hypothetical	596	596	100%	0	88.92	337
Trichoderma	XP_0139607	hypothetical	594	594	100%	0	89.5	337
Trichoderma	PNP59423.1	hypothetical	542	542	83%	0	96.11	284
Trichoderma	XP_0247565	hypothetical	527	527	100%	0	78.55	335
Trichoderma	RFU75476.1	triacylglycer	525	525	92%	0	83.28	338
Trichoderma	KAH8131048	Alpha/Beta h	522	522	100%	0	77.68	335
Trichoderma	KAH0532554	hypothetical	521	521	81%	0	98.57	304
Trichoderma	XP_0139435	hypothetical	521	521	92%	0	83.07	337
Trichoderma	KAH0498535	hypothetical	520	520	100%	0	76.47	357
Trichoderma	XP_0069682	uncharacteri	518	518	100%	0	76.75	355
Trichoderma	PTB78011.1	alpha/beta-h	510	510	100%	2.00E-180	75.93	349
Trichoderma	PNP38305.1	hypothetical	503	503	100%	2.00E-177	73.02	356
Trichoderma	XP_0186632	hypothetical	502	502	100%	3.00E-177	73.02	356
Trichoderma	XP_0247533	alpha/beta-h	496	496	100%	3.00E-175	75.72	330
Trichoderma	KAH6604852	triacylglycer	441	441	77%	2.00E-154	84.53	264
Hirsutella	mi KJZ78693.1	hypothetical	427	427	92%	8.00E-148	66.67	354
Fusarium	sp. RSL54391.1	hypothetical	416	416	92%	2.00E-143	65.08	332
Fusarium	sol XP_0461344	Alpha/Beta h	414	414	92%	9.00E-143	64.76	332
Fusarium	kui RMJ16314.1	hypothetical	414	414	92%	9.00E-143	65.08	332
Fusarium	sol UPL00669.1	hypothetical	414	414	92%	1.00E-142	64.76	332
Fusarium	du RSL70798.1	hypothetical	413	413	92%	3.00E-142	64.44	332
Fusarium	var XP_0030507	uncharacteri	412	412	92%	3.00E-142	64.44	332
Fusarium	flo RSL80024.1	hypothetical	412	412	92%	4.00E-142	65.08	332
Fusarium	am RSM11997.1	hypothetical	410	410	89%	2.00E-141	65.79	332
Fusarium	alb KAF4468415	hypothetical	410	410	92%	3.00E-141	63.61	352
Fusarium	dei KAF5011412	hypothetical	410	410	92%	4.00E-141	63.92	352
Tolypocladiu	PNY29418.1	Lipase 2 [Tol	409	409	89%	2.00E-140	67.78	367
Fusarium	sar KAF4964785	hypothetical	407	407	92%	4.00E-140	63.09	334
Stachybotrys	KEY69997.1	hypothetical	407	407	92%	6.00E-140	63.21	335
Stachybotrys	KFA50745.1	hypothetical	407	407	92%	6.00E-140	63.21	335
Fusarium	flaj XP_0459869	Alpha/Beta h	407	407	90%	7.00E-140	64.29	334
Stachybotrys	KFA62815.1	hypothetical	406	406	92%	1.00E-139	62.58	335
Ilyonectria	di KAH7011941	Alpha/Beta h	406	406	92%	1.00E-139	66.67	341
Thelonectria	KAH6899778	Alpha/Beta h	406	406	92%	2.00E-139	64.35	340
Fusarium	sp. KAI1056250	hypothetical	405	405	90%	2.00E-139	63.96	338
Fusarium	sp. RGP72309.1	triacylglycer	405	405	90%	4.00E-139	63.64	351
Ilyonectria	sj KAH6985660	Alpha/Beta h	404	404	92%	8.00E-139	66.35	341
Dactylonectr	KAH7149692	Alpha/Beta h	404	404	92%	1.00E-138	64.47	341
Fusarium	avi KAH6968652	Alpha/Beta h	403	403	90%	1.00E-138	64.29	334
Fusarium	hei KAF5663380	triacylglycer	405	405	89%	2.00E-138	64.5	369
Fusarium	avi KIL96274.1	triacylglycer	403	403	90%	2.00E-138	63.96	334
Fusarium	avi KAG5656265	hypothetical	404	404	90%	2.00E-138	63.96	375
Drechmeria	(ODA83100.1	hypothetical	403	403	91%	2.00E-138	62.89	346
Ilyonectria	rc XP_0461049	Alpha/Beta h	403	403	92%	3.00E-138	66.04	341
Fusarium	po XP_0447135	hypothetical	402	402	90%	6.00E-138	62.99	334
Fusarium	vei XP_0255906	uncharacteri	401	401	90%	1.00E-137	62.46	334
Fusarium	psi KAF0641638	hypothetical	401	401	89%	2.00E-137	62.87	351
Fusarium	gra CAG1993854	unnamed pri	401	401	89%	2.00E-137	62.87	351
Fusarium	gra PCD31638.1	hypothetical	401	401	89%	2.00E-137	62.87	351
Fusarium	gra CAF3606094	unnamed pri	401	401	89%	2.00E-137	62.87	351
Fusarium	sp. KAH7164412	Alpha/Beta h	402	402	92%	2.00E-137	61.83	367
Tolypocladiu	KND88898.1	Lipase 2 [Tol	401	401	89%	2.00E-137	69.16	343
Drechmeria	(XP_0406574	triacylglycer	402	402	91%	2.00E-137	62.89	386
Fusarium	oxi KAG7414252	Lipase 2 [Fus	400	400	92%	2.00E-137	61.83	330
Fusarium	gra CZ578629.1	unnamed pri	400	400	89%	2.00E-137	62.87	334
Fusarium	gr XP_0113189	hypothetical	400	400	89%	2.00E-137	62.87	334
Hirsutella	rh XP_0447250	lipase [Hirsu	400	400	89%	2.00E-137	67.21	320
Fusarium	cul QPC68571.1	hypothetical	400	400	89%	3.00E-137	62.87	351
Fusarium	rec XP_0460513	Alpha/Beta h	400	400	90%	3.00E-137	62.74	336
Fusarium	lori RGP79158.1	triacylglycer	400	400	90%	3.00E-137	62.14	351
Tolypocladiu	POR38551.1	Lipase 2 [Tol	400	400	92%	5.00E-137	66.77	338
Mariannaea	KAI5462700	Alpha/Beta h	399	399	92%	7.00E-137	64.04	342
Fusarium	tric KAH7262197	Alpha/Beta h	399	399	89%	7.00E-137	64.05	334
Clonostachy	CAH0059244	unnamed pri	398	398	89%	1.00E-136	64.59	333
Fusarium	au: KAF4458007	triacylglycer	399	399	90%	3.00E-136	62.66	364
Clonostachy	VUC39640.1	unnamed pri	396	396	89%	1.00E-135	63.93	333
Ophiocordyc	EQK99704.1	triacylglycer	396	396	90%	2.00E-135	66.77	354
Dactylonectr	KAH7148923	Alpha/Beta h	394	394	92%	6.00E-135	63.64	341
Pochonia	chl XP_0181481	triacylglycer	392	392	89%	4.00E-134	64.82	330
Emericellops	XP_0461141	Alpha/Beta h	392	392	91%	5.00E-134	63.34	335
Trichoderma	UK262414.1	hypothetical	389	389	72%	6.00E-134	80.16	272
Fusarium	psi XP_0092559	hypothetical	389	389	89%	2.00E-132	59.02	371
Fusarium	psi QPC77441.1	hypothetical	389	389	89%	2.00E-132	59.02	371
Epichloe fest	QPG98063.1	hypothetical	387	387	92%	2.00E-132	62.22	328
Fusarium	m2 XP_0416818	uncharacteri	387	387	90%	4.00E-132	63.31	330
Fusarium	xtl KAG5746670	hypothetical	386	386	90%	9.00E-132	63.31	330
Ophiocordyc	PHF57814.1	hypothetical	386	386	92%	1.00E-131	62.7	328
Fusarium	prc CVL11341.1	related to TG	385	385	90%	1.00E-131	63.31	330
Fusarium	prc XP_0310836	related to TG	385	385	90%	2.00E-131	62.99	330
Fusarium	oxi XP_0310397	triacylglycer	386	386	90%	3.00E-131	63.31	367
Clonostachy	CAG9949609	unnamed pri	385	385	89%	3.00E-131	59.63	326
Colletotrichu	KZL82863.1	triacylglycer	385	385	92%	4.00E-131	61.71	344
Acremonium	KFH46845.1	Lipase-like pi	385	385	89%	4.00E-131	63.07	345
Fusarium	fuj SCN78580.1	related to TG	384	384	90%	4.00E-131	62.99	330
Fusarium	fuj XP_0234307	related to TG	384	384	90%	5.00E-131	62.99	330
Fusarium	sp. KAF5626228	triacylglycer	386	386	89%	7.00E-131	63.19	393
Clonostachy	CAH0026503	unnamed pri	383	383	89%	9.00E-131	59.82	323
Fusarium	psi KAF5575212	triacylglycer	384	384	90%	1.00E-130	62.99	353
Purpureocilli	XP_0181749	triacylglycer	385	385	89%	1.00E-130	62.24	394
Fusarium	vei RBQ71412.1	hypothetical	383	383	90%	1.00E-130	62.66	330
Fusarium	ver XP_0187464	triacylglycer	383	383	90%	2.00E-130	62.66	330
Fusarium	oxi XP_0182406	triacylglycer	382	382	90%	2.00E-130	62.99	330
Fusarium	oxi RKK20771.1	hypothetical	382	382	90%	3.00E-130	63.31	330
Colletotrichu	KXH39849.1	triacylglycer	382	382	89%	3.00E-130	63.64	342

[Trichoderma harzianum]_ThaL	1
[Trichoderma harzianum]_ThaL	MRQ
[Trichoderma harzianum]_KKO99473.1	MRQ
[Trichoderma guizhouense]_OPB43634.1	MRQ
[Trichoderma simmonsii]_QYS94233.1	MRQ
[Trichoderma harzianum_CBS_226.95]_XP_024777038.1	MRQ
[Trichoderma harzianum]_PKK42226.1	MRQ
[Trichoderma lentiforme]_KAF3077685.1	MRQ
[Trichoderma harzianum]_PNP59423.1	MTT
[Trichoderma virens_FT-333]_UKZ73321.1	MRQ
[Trichoderma virens_Gv29-8]_XP_013960763.1	MRQ
[Trichoderma asperellum_CBS_433.97]_XP_024756506.1	MRK
[Trichoderma atroviride_IMI_206040]_XP_013943551.1	MRK
[Trichoderma gamsii]_PNP38305.1	MRK
[Trichoderma gamsii]_XP_018663207.1	MRK
[Trichoderma arundinaceum]_RFU75476.1	MTK
[Trichoderma gracile]_KAH0498535.1	MRQ
[Trichoderma reesei_QM6a]_XP_006968245.1	MRQ
[Trichoderma citrinoviride]_XP_024753310.1	MRQ
[Trichoderma longibrachiatum_ATCC_18648]_PTB78011	MRQ
[Hirsutella minnesotensis_3608]_KJZ78693.1	MT
[Hirsutella rhosiliensis]_XP_044725020.1	MT
[Ophiocordyceps sinensis_CO18]_EQK99704.1	MTN
[Tolypocladium capitatum]_PNY29418.1	MSR
[Tolypocladium ophioglossoides_CBS_100239]_KND888	MSR
[Tolypocladium paradoxum]_POR38551.1	MSR
[Drechmeria coniospora]_ODA83100.1	MNR
[Drechmeria coniospora]_XP_040657415.1	MTSVA.....RTRIRPQPAHFHFLNVLYRPVLTAPWTHWQPSRV
[Ophiocordyceps unilateralis]_PFH57814.1	MSR
[Fusarium_sp._AF-6]_RSL54391.1	MSR
[Fusarium_kuroshium]_RMJ16314.1	MSR
[Fusarium_sp._AF-8]_RSL70798.1	MSR
[Fusarium_ambrosium]_RSM11997.1	MSR
[Fusarium_floridanum]_RSL80024.1	MSR
[Fusarium_vanettenii_77-13-4]_XP_003050716.1	MSR
[Fusarium_solani]_XP_046134414.1	MSK
[Fusarium_albosuccineum]_KAF4468415.1	MSR
[Fusarium_decemcellulare]_KAF5011412.1	MSR
[Fusarium_sarcochromum]_KAF4964785.1	MSR
[Fusarium_avenaceum]_KIL96274.1	MNR
[Fusarium_avenaceum]_KIL96274.1	MNR
[Fusarium_avenaceum]_KAG5656265.1	MVQQAICTRTVTSPISDFVPR.CDIPQPPSIANCIHAT.....RSS
[Fusarium_tricinatum]_KAH7262197.1	MNR
[Fusarium_heterosporum]_KAF5663380.1	MR.....TVTSPMYRTSSHATTVLQPPSSAHCTHAI.....QSS
[Fusarium_sp._MPI-SDFR-AT-0072]_KAH7164412.1	MHSR....RDVTSS.RHSFHLTTRTLPTLLSHCAHAT.....QSS
[Fusarium_oxysporum_f._sp._rapae]_KAG7414252.1	MNR
[Fusarium_mangiferae]_XP_041681833.1	MNR
[Fusarium_proliferatum]_CVL11341.1	MNR
[Fusarium_proliferatum_ET1]_XP_031083673.1	MNR
[Fusarium_fujikuroi]_SCW7880.1	MNR
[Fusarium_fujikuroi_IMI_58289]_XP_023430709.1	MNR
[Fusarium_sp._NRRL_25303]_KAF5626228.1	MNR
[Fusarium_xylarioides]_KAG5746670.1	MNR
[Fusarium_xylarioides]_KAG5788219.1	MNR
[Fusarium_pseudocircinatum]_KAF5575212.1	...
[Fusarium_pseudoanthophilum]_KAF5575021.1	MNR
[Fusarium_verticilliioides]_RBQ71412.1	MNR
[Fusarium_verticilliioides_7600]_XP_018746479.1	MNR
[Fusarium_oxysporum_NRL_32931]_XP_031039788.1	MHSR....RDVISS.LQSFYLTIRTLPTLLSHCAHAT.....QSS
[Fusarium_oxysporum_f._sp._lyopersici_4287]_XP_0	MNR
[Fusarium_oxysporum_f._sp._cepae]_RKK20771.1	MNR
[Fusarium_redolens]_XP_046051341.1	MNR
[Fusarium_austroafricanum]_KAF4458007.1	MT.....LDLHNSNATLNNNASMEFCAYAT.....RQFM
[Fusarium_flagelliforme]_XP_045986929.1	MNR
[Fusarium_sp._FIESC_RH6]_KAI1056250.1	M.....ARSM
[Fusarium_sporotrichioides]_RGP72309.1	MSPQHSIVSSTHAI.....RKFM
[Fusarium_poeae]_XP_044713592.1	MNR
[Fusarium_venenatum]_XP_025590637.1	MNR
[Fusarium_pseudograminearum]_KAF0641638.1	MSPQHSIVSSTHAI.....QKSM
[Fusarium_graminearum]_CAE1993854.1	MSPQHSIVSSTHAI.....QKSM
[Fusarium_graminearum]_PCD31638.1	MSPQHSIVSSTHAI.....QKSM
[Fusarium_graminearum]_CZS78629.1	MSPQHSIVSSTHAI.....QKSM
[Fusarium_graminearum]_CAF3606094.1	MSPQHSIVSSTHAI.....QKSM
[Fusarium_graminearum_PH-1]_XP_011318944.1	MSPQHSIVSSTHAI.....QKSM
[Fusarium_culmorum]_QPC68571.1	MSPQHSIVSYTHAI.....QKSM
[Fusarium_pseudograminearum]_QPC77441.1	MSPQHSIVSSTHAI.....QKSM
[Fusarium_longipes]_RGP79158.1	MSPQLIASFTHAV.....QKSM
[Ilyonectria destructans]_KAH7011941.1	MSR
[Ilyonectria.sp._MTI-CAGE-AT-0026]_KAH6985660.1	MSR
[Ilyonectria_robusta]_XP_046104990.1	MSR
[Dactylonectria estremocensis]_KAH7149692.1	MSR
[Dactylonectria macrodidyma]_KAH7148923.1	MSR
[Thelonectria olida]_KAH6899778.1	MTQ
[Stachybotrys chartarum_IBT_7711]_KEY69997.1	MNK
[Stachybotrys chartarum_IBT_40293]_KFA50745.1	MNK
[Stachybotrys chlorohalonata_IBT_40285]_KFA62815.1	MNK
[Purpureocillium lilacinum]_XP_018174914.1	M.
[Clonostachys solani]_CAH0059244.1	ITR
[Clonostachys rosea]_VUC36940.1	MS
[Clonostachys rhizophaga]_CAH0026503.1	MS
[Emeriocloopsis atlantica]_XP_046114137.1	MRP
[Acremonium chrysogenum_ATCC_11550]_KFH46845.1	MT
[Pochonia chlamydosporia_170]_XP_018148143.1	MSK
[Epichloe festucae_F11]_QPG98063.1	MRP
[Colletotrichum incanum]_KZL82863.1	LTR
[Colletotrichum simmondsii]_KXH39849.1	LTR
[Colletotrichum sojae]_KAF6819546.1	LAR

Figure S3A. Multialignment of ThaL and its homologs. (Imagen representativa de la primera página de alineamiento. Para obtener el alineamiento completo, utilice el link proporcionado al final del artículo).

2Z5G_1|Chains

2Z5G_1 Chains	..
[Trichoderma harzianum]_ThaL	..
[Trichoderma harzianum]_KKO99473.1	..
[Trichoderma guizhouense]_OPB43634.1	..
[Trichoderma simmonsii]_QVS94233.1	..
[Trichoderma harzianum_CBS_226.95]_XP_024777038.1	..
[Trichoderma harzianum]_PKK42226.1	..
[Trichoderma lentiforme]_KAF3077685.1	..
[Trichoderma harzianum]_PNP59423.1	..
[Trichoderma virens_FT-333]_UKZ73321.1	..
[Trichoderma virens_Gv29-8]_XP_013960763.1	..
[Trichoderma asperellum_CBS_433.97]_XP_024756506.1	..
[Trichoderma atroviride_IMI_206040]_XP_013943551.1	..
[Trichoderma gamsii]_PNP38305.1	..
[Trichoderma gamsii]_XP_018663207.1	..
[Trichoderma arundinaceum]_RFU75476.1	..
[Trichoderma gracile]_KAH0498535.1	..
[Trichoderma reesei_QM6a]_XP_006968245.1	..
[Trichoderma citrinoviride]_XP_024753310.1	..
[Trichoderma longibrachiatum_ATCC_18648]_PTB78011	..
[Hirsutella minnesotensis_3608]_KJZ78693.1	..
[Hirsutella rhossiliensis]_XP_044725020.1	..
[Ophiocordyceps sinensis_COI8]_EQK99704.1	..
[Tolypocladium capitatum]_PNY29418.1	..
[Tolypocladium ophioglossoides_CBS_100239]_KND888	..
[Tolypocladium paradoxum]_POR38551.1	..
[Drechmeria coniospora]_ODA83100.1	..
[Drechmeria coniospora]_XP_040657415.1	..
[Ophiocordyceps unilateralis]_PFH57814.1	..
[Fusarium sp._AF-6]_RSL54391.1	..
[Fusarium kuroshium]_RMJ16314.1	..
[Fusarium sp._AF-8]_RSL70798.1	..
[Fusarium ambrosium]_RSM11997.1	..
[Fusarium floridanum]_RSL80024.1	..
[Fusarium vanettenii_77-13-4]_XP_003050716.1	..
[Fusarium solani]_XP_046134414.1	..
[Fusarium albosuccineum]_KAF4468415.1	..
[Fusarium decemcellulare]_KAF5011412.1	..
[Fusarium sarcochrom]_KAF4964785.1	..
[Fusarium avenaceum]_KAH6968652.1	..
[Fusarium avenaceum]_KIL96274.1	..
[Fusarium avenaceum]_KAG5656265.1	..
[Fusarium tricinctum]_KAH7262197.1	..
[Fusarium heterosporum]_KAF5663380.1	..
[Fusarium sp._MPI-SDFR-AT-0072]_KAH7164412.1	..
[Fusarium oxysporum f. sp. rapae]_KAG7414252.1	..
[Fusarium mangiferae]_XP_041681833.1	..
[Fusarium proliferatum]_CVL11341.1	..
[Fusarium proliferatum_ET1]_XP_031083673.1	..
[Fusarium fujikuroi]_SCN78580.1	..
[Fusarium fujikuroi_IMI_58289]_XP_023430709.1	..
[Fusarium sp._NRRL_25303]_KAF5662228.1	..
[Fusarium xylarioides]_KAG5746670.1	..
[Fusarium xylarioides]_KAG5788219.1	..
[Fusarium pseudocircinatum]_KAF5575212.1	..
[Fusarium pseudanthophilum]_KAF5575021.1	..
[Fusarium verticillioides]_RBQ71412.1	..
[Fusarium verticillioides_7600]_XP_018746479.1	..
[Fusarium oxysporum_NRRL_32931]_XP_031039788.1	..
[Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici_4287]_XP_0	..
[Fusarium oxysporum f. sp. cepae]_RKK20771.1	..
[Fusarium redolens]_XP_046051341.1	..
[Fusarium austroafricanum]_KAF4458007.1	..
[Fusarium flagelliforme]_XP_045986929.1	..
[Fusarium sp._FIESC_RH6]_KAI1056250.1	..
[Fusarium sporotrichioides]_RGP72309.1	..
[Fusarium poae]_XP_044713592.1	..
[Fusarium venenatum]_XP_025590637.1	..
[Fusarium pseudograminearum]_KAF0641638.1	..
[Fusarium graminearum]_CAG1993854.1	..
[Fusarium graminearum]_PCD31638.1	..
[Fusarium graminearum]_CZS78629.1	..
[Fusarium graminearum]_CAP3606094.1	..
[Fusarium graminearum_PH-1]_XP_011318944.1	..
[Fusarium culmorum]_QPC68571.1	..
[Fusarium pseudograminearum]_QPC77441.1	..
[Fusarium longipes]_RGP79158.1	..
[Ilyonectria destructans]_KAH7011941.1	..
[Ilyonectria sp._MPI-CAGE-AT-0026]_KAH6985660.1	..
[Ilyonectria robusta]_XP_046104990.1	..
[Dactylonectria estremoensis]_KAH7149692.1	..
[Dactylonectria macrodidyma]_KAH7148923.1	..
[Thelonectria olida]_KAH6899778.1	..
[Stachybotrys chartarum_IBT_7711]_KEY69997.1	..
[Stachybotrys chartarum_IBT_40293]_KFA50745.1	..
[Stachybotrys chlorohalonata_IBT_40285]_KFA62815.1	..
[Purpureocillium lilacinum]_XP_018174914.1	..
[Clonostachys solani]_CAH0059244.1	..
[Clonostachys rosea]_VUC36940.1	..
[Clonostachys rhizophaga]_CAH0026503.1	..
[Emericellopsis atlantica]_XP_046114137.1	..
[Acremonium chrysogenum_ATCC_11550]_KFH46845.1	..
[Pochonia chlamydosporia_170]_XP_018148143.1	..
[Epichloe festucae_F11]_QPG98063.1	..
[Colletotrichum ancanum]_KZL82863.1	..
[Colletotrichum simmondsii]_KXH39849.1	..
[Colletotrichum sojae]_KAF6819546.1	..
[Bacillus licheniformis]_CAB95850.2_RN2	..
[Trichosporon asahii_var._asahii]_AGN98126.1_TaLi	..

Figure S3B. Multialignment of ThaL and its homologs.



Figure S4A. Individual alignment of ThaL and its top ten homologs with either TaLipA, RN2 or 2Z5G.

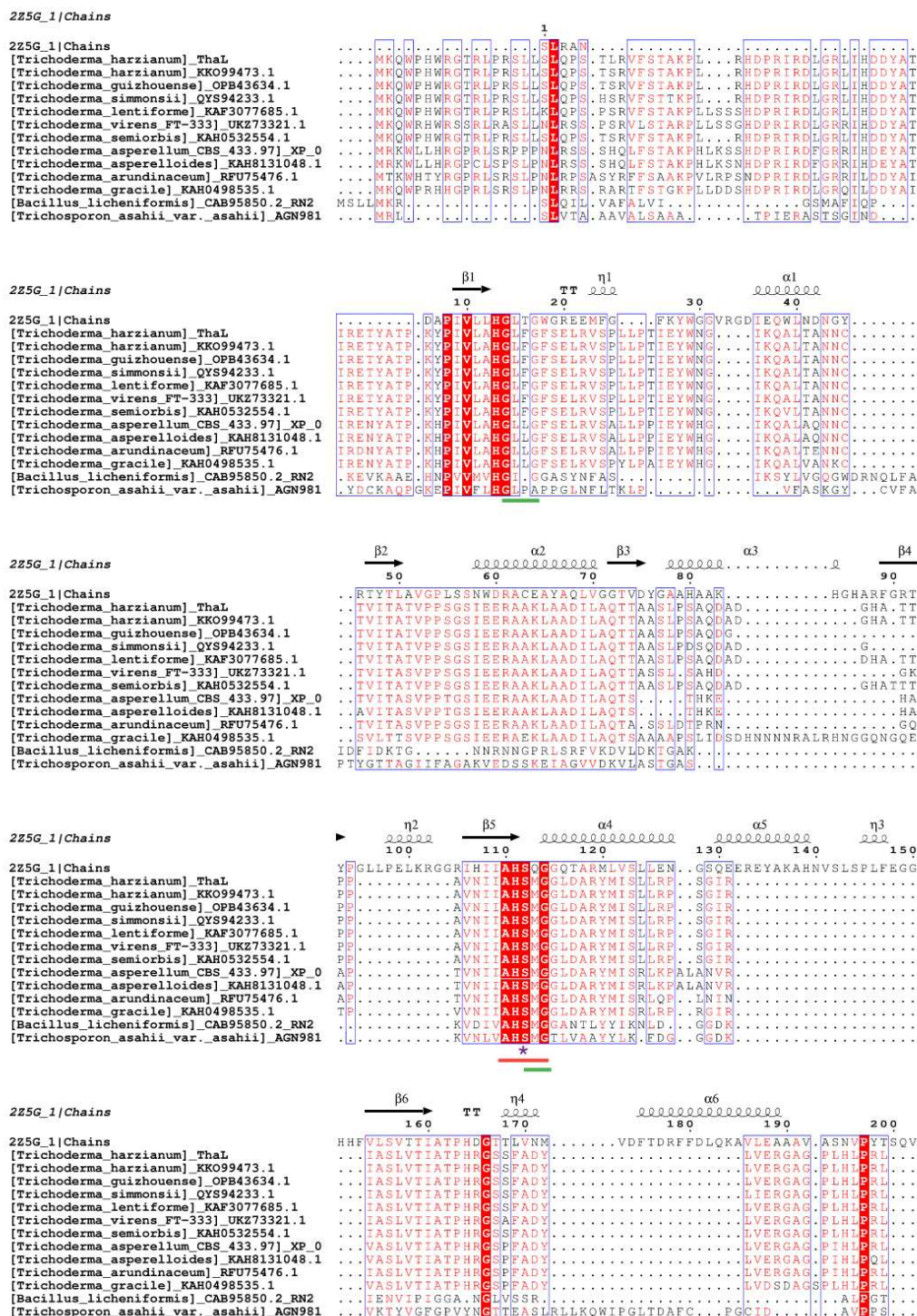


Figure S4B. Individual alignment of ThaL and its top ten homologs with either TaLipA, RN2 or 2Z5G. (Primera página).

Figure S5. Multialignment of ThaL and other ASMG-lipases (cluster III) with lipases from other clusters. (Primera página).

BIBLIOGRAFÍA

- Adetunji, Adegoke Isiaka, Ademola Olufolahan Olaniran. 2021. "Production Strategies and Biotechnological Relevance of Microbial Lipases: A Review". *Brazilian Journal of Microbiology* 52 (3): 1257–69. <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00503-5>.
- Adrio Jose, Arnold Demain. 2014. "Microbial Enzymes: Tools for Biotechnological Processes". *Biomolecules* 4 (1): 117–39. <https://doi.org/10.3390/biom4010117>.
- Ahmad, Nurul Nadirah, Nor Hafizah Ahmad Kamarudin, Adam Thean Chor Leow, Raja Noor Zaliha Raja Abd. Rahman. 2020. "The Role of Surface Exposed Lysine in Conformational Stability and Functional Properties of Lipase from Staphylococcus Family". *Molecules* 25 (17): 3858. <https://doi.org/10.3390/molecules25173858>.
- Akao, Takeshi, Katsuya Gomi, Kuniyasu Goto, Naoto Okazaki, Osamu Akita. 2002. "Subtractive cloning of cDNA from *Aspergillus oryzae* differentially regulated between solid-state culture and liquid (submerged) culture". *Current Genetics* 41 (4): 275–81. <https://doi.org/10.1007/s00294-002-0314-y>.
- Alabdalall, Amira Hassan, Norah Ayad ALanazi, Sumayh A. Aldakeel, Sayed AbdulAzeez, J. Francis Borgio. 2020. "Molecular, Physiological, and Biochemical Characterization of Extracellular Lipase Production by *Aspergillus Niger* Using Submerged Fermentation". *PeerJ* 8 (julio): e9425. <https://doi.org/10.7717/peerj.9425>.
- Ali, Shahid, Xiaohui Liu, Lin Sen, Dongming Lan, Jiaqi Wang, Md. Imtiyaz Hassan, Yonghua Wang. 2021. "Sequence and Structure-Based Method to Predict Diacylglycerol Lipases in Protein Sequence". *International Journal of Biological Macromolecules* 182 (julio): 455–63. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.04.011>.
- Argos, P, M. G. Rossmann, U. M. Grau, H. Zuber, G. Frank, J.D. Tratschin. 1979. "Thermal stability and protein structure" 18 (25): 5698–5703.
- Arpigny, Jean Louis, Karl-Erich Jaeger. 1999. "Bacterial Lipolytic Enzymes: Classification and Properties". *Biochemical Journal* 343 (1): 177–83. <https://doi.org/10.1042/bj3430177>.
- Baghban, Roghayyeh, Safar Farajnia, Masoumeh Rajabibazl, Younes Ghasemi, AmirAli Mafi, Reyhaneh Hoseinpoor, Leila Rahbarnia, Maryam Aria. 2019. "Yeast Expression Systems:

- Overview and Recent Advances". *Molecular Biotechnology* 61 (5): 365–84. <https://doi.org/10.1007/s12033-019-00164-8>.
- Bai, Qiaoyan, Yuzhen Cai, Lifang Yang, Qingqing Wu, Min Su, Lianghua Tang. 2022. "Substitution of L133 with Methionine in GX SXG Domain Significantly Changed the Activity of *Penicillium Expansum* Lipase". *Catalysis Letters* 152 (7): 2047–55. <https://doi.org/10.1007/s10562-021-03795-2>.
- Barba Cedillo, Víctor, Francisco J Plou, María Jesús Martínez. 2012. "Recombinant Sterol Esterase from *Ophiostoma Piceae*: An Improved Biocatalyst Expressed in *Pichia Pastoris*". *Microbial Cell Factories* 11 (1): 73. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-73>.
- Batumalaie, Kalaivani, Mohamed Faraj Edbeib, Naji Arafat Mahat, Fahrul Huyop, Roswanira Abdul Wahab. 2018. "In Silico and Empirical Approaches toward Understanding the Structural Adaptation of the Alkaline-Stable Lipase KV1 from *Acinetobacter Haemolyticus*". *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 36 (12): 3077–93. <https://doi.org/10.1080/07391102.2017.1377635>.
- Berto, Philippe, Pascal CommÃ©nil, Lionel Belingheri, Bertrand Dehorter. 1999. "Occurrence of a Lipase in Spores of *Alternaria Brassicicola* with a Crucial Role in the Infection of Cauliflower Leaves". *FEMS Microbiology Letters* 180 (2): 183–89. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb08794.x>.
- Blümke, Antje, Christian Falter, Cornelia Herrfurth, Björn Sode, Rainer Bode, Wilhelm Schäfer, Ivo Feussner, Christian A. Voigt. 2014. "Secreted Fungal Effector Lipase Releases Free Fatty Acids to Inhibit Innate Immunity-Related Callose Formation during Wheat Head Infection". *Plant Physiology* 165 (1): 346–58. <https://doi.org/10.1104/pp.114.236737>.
- Bosqueiro, Ariane Silva, Rodolfo Bizarria Júnior, Márcia Maria Rosa-Magri. 2020. "Potential of *Trichosporon asahii* against *Alternaria* sp. and mechanisms of actions". *Summa Phytopathologica* 46 (1): 20–25. <https://doi.org/10.1590/0100-5405/220861>.
- Bou Ali, Madiha, Yassine Ben Ali, Aida Karray, Ahmed Fendri, Youssef Gargouri. 2011. "Purification and Characterization of the First Recombinant Bird Pancreatic Lipase Expressed in *Pichia Pastoris*: The Turkey". *Lipids in Health and Disease* 10 (1): 24. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-10-24>.

- Burgos-Canul, Yamily Y., Blondy Canto-Canché, Maxim V. Berezovski, Gleb Mironov, Víctor M. Loyola-Vargas, Ana Paulina Barba de Rosa, Miguel Tzec-Simá, et al. 2019. "The Cell Wall Proteome from Two Strains of *Pseudocercospora fijiensis* with Differences in Virulence". *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 35 (7): 105. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2681-2>.
- Canseco-Pérez, Miguel, Genny Castillo-Avila, Bartolomé Chi-Manzanero, Ignacio Islas-Flores, Max Apolinar-Hernández, Gerardo Rivera-Muñoz, Marcela Gamboa-Angulo, Felipe Sanchez-Teyer, Yeny Couoh-Uicab, Blondy Canto-Canché. 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 (2): 62. <https://doi.org/10.3390/genes9020062>.
- Carreón-Anguiano, Karla Gisel, Ignacio Islas-Flores, Julio Vega-Arreguín, Luis Sáenz-Carbonell, Blondy Canto-Canché. 2020. "EffHunter: A Tool for Prediction of Effector Protein Candidates in Fungal Proteomic Databases". *Biomolecules* 10 (5): 712. <https://doi.org/10.3390/biom10050712>.
- Casas-Godoy, Leticia, Francisco Gasteazoro, Sophie Duquesne, Florence Bordes, Alain Marty, Georgina Sandoval. 2018. "Lipases: An Overview". En *Lipases and Phospholipases*, editado por Georgina Sandoval, 1835:3–38. Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8672-9_1.
- Chakravarty, Suvobrata, Raghavan Varadarajan. 2000. "Elucidation of Determinants of Protein Stability through Genome Sequence Analysis". *FEBS Letters* 470 (1): 65–69. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01267-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01267-9).
- Chakravorty, Debamitra, Saravanan Parameswaran, Vikash Kumar Dubey, Sanjukta Patra. 2011. "In Silico Characterization of Thermostable Lipases". *Extremophiles* 15 (1): 89–103. <https://doi.org/10.1007/s00792-010-0337-0>.
- Challa, Surekha, Titash Dutta, Nageswara Rao Reddy Neelapu. 2019. "Fungal White Biotechnology Applications for Food Security: Opportunities and Challenges". En *Recent Advancement in White Biotechnology Through Fungi*, editado por Ajar Nath Yadav, Sangram Singh, Shashank Mishra, y Arti Gupta, 119–48. Fungal Biology. Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-14846-1_4.

- Chandra, Prem, Enespa, Ranjan Singh, Pankaj Kumar Arora. 2020. "Microbial Lipases and Their Industrial Applications: A Comprehensive Review". *Microbial Cell Factories* 19 (1): 169. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01428-8>.
- Che, Zhiquan, Xiaoyan Cao, Guiguang Chen, Zhiquan Liang. 2020. "An Effective Combination of Codon Optimization, Gene Dosage, and Process Optimization for High-Level Production of Fibrinolytic Enzyme in *Komagataella Phaffii* (*Pichia Pastoris*)". *BMC Biotechnology* 20 (1): 63. <https://doi.org/10.1186/s12896-020-00654-7>.
- Chen, Hui, Xiao Meng, Xiaoqing Xu, Wenbo Liu, Shengying Li. 2018. "The Molecular Basis for Lipase Stereoselectivity". *Applied Microbiology and Biotechnology* 102 (8): 3487–95. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8858-z>.
- Chung, Bevan, Dong-Yup Lee. 2012. "Computational Codon Optimization of Synthetic Gene for Protein Expression". *BMC Systems Biology* 6 (1): 134. <https://doi.org/10.1186/1752-0509-6-134>.
- Creighton, Thomas E. 1993. *Proteins: Structures and Molecular Properties*. 2nd ed. New York: W. H. Freeman.
- Curran, Brendan P. G., Virginia Bugeja. 2014. "Basic Investigations in *Saccharomyces cerevisiae*". En *Yeast Protocols*, editado por Wei Xiao, 1163:1–14. Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0799-1_1.
- Darwish, Amira Mohamed Galal, Hebatallah H. Abo Nahas, Yasmin H. Korra, Alaa A. Osman, Wedad M. El-Kholy, Maria Reyes-Córdova, Essa M. Saied, Ahmed M. Abdel-Azeem. 2021. "Fungal Lipases: Insights into Molecular Structures and Biotechnological Applications in Medicine and Dairy Industry". En *Industrially Important Fungi for Sustainable Development*, editado por Ahmed M. Abdel-Azeem, Ajar Nath Yadav, Neelam Yadav, y Minaxi Sharma, 461–514. Fungal Biology. Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-85603-8_13.
- Diniz, W.J.S., F. Canduri. 2017. "REVIEW-ARTICLE Bioinformatics: an overview and its applications". *Genetics and Molecular Research* 16 (1). <https://doi.org/10.4238/gmr16019645>.

- Doyle, Sharon A., ed. 2009. *High Throughput Protein Expression and Purification: Methods and Protocols*. Vol. 498. Methods in Molecular Biology. Totowa, NJ: Humana Press. <https://doi.org/10.1007/978-1-59745-196-3>.
- Drew, David, Hyun Kim. 2012. "Preparation of *Saccharomyces cerevisiae* Expression Plasmids". En *Recombinant Protein Production in Yeast*, editado por Roslyn M. Bill, 866:41–46. Methods in Molecular Biology. Totowa, NJ: Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-770-5_4.
- Duarte-Oliveira, Cláudio, Fernando Rodrigues, Samuel M. Gonçalves, Gustavo H. Goldman, Agostinho Carvalho, Cristina Cunha. 2017. "The Cell Biology of the Trichosporon-Host Interaction". *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 7 (abril). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00118>.
- Duong-Ly, Krisna C., Sandra B. Gabelli. 2014. "Explanatory Chapter: Troubleshooting Recombinant Protein Expression". En *Methods in Enzymology*, 541:209–29. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420119-4.00017-3>.
- Eggert, Thorsten, Gertie van Pouderoyen, Gaëlle Pencreac'h, Isabelle Douchet, Robert Verger, Bauke W. Dijkstra, Karl-Erich Jaeger. 2002. "Biochemical Properties and Three-Dimensional Structures of Two Extracellular Lipolytic Enzymes from *Bacillus Subtilis*". *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 26 (1–2): 37–46. [https://doi.org/10.1016/S0927-7765\(02\)00033-4](https://doi.org/10.1016/S0927-7765(02)00033-4).
- Ezema, Benjamin. O., Kingsley. O. Omeje, Roslyn M. Bill, Alan D. Goddard, Sabinus Oscar O. Eze, Alfred Fernandez-Castane. 2022. "Bioinformatic Characterization of a Triacylglycerol Lipase Produced by *Aspergillus Flavus* Isolated from the Decaying Seed of *Cucumeropsis Mannii*". *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, febrero, 1–15. <https://doi.org/10.1080/07391102.2022.2035821>.
- Fan, Guo-Liang, Yan-Ling Liu, Hui Wang. 2016. "Identification of Thermophilic Proteins by Incorporating Evolutionary and Acid Dissociation Information into Chou's General Pseudo Amino Acid Composition". *Journal of Theoretical Biology* 407 (octubre): 138–42. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2016.07.010>.
- Farrokhi, Naser, Maria Hrmova, Rachel A. Burton, Geoffrey B. Fincher. 2009. "Heterologous and Cell-Free Protein Expression Systems". En *Plant Genomics*, editado por J.P. Gustafson,

- Peter Langridge, y Daryl J. Somers, 513:175–98. *Methods in Molecular Biology*TM. Totowa, NJ: Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-427-8_10.
- Feng, Changli, Zhaogui Ma, Deyun Yang, Xin Li, Jun Zhang, Yanjuan Li. 2020. “A Method for Prediction of Thermophilic Protein Based on Reduced Amino Acids and Mixed Features”. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 8 (mayo): 285. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00285>.
- Filho, Danielle Gonçalves, Amanda Gonçalves Silva, Carla Zanella Guidini. 2019. “Lipases: Sources, Immobilization Methods, and Industrial Applications”. *Applied Microbiology and Biotechnology* 103 (18): 7399–7423. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10027-6>.
- Fischer, M. 2003. “The Lipase Engineering Database: a navigation and analysis tool for protein families”. *Nucleic Acids Research* 31 (1): 319–21. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg015>.
- Florczak, Tomasz, Maurycy Daroch, Mark Charles Wilkinson, Aneta Białkowska, Andrew Derek Bates, Marianna Turkiewicz, Lesley Ann Iwanejko. 2013. “Purification, Characterisation and Expression in *Saccharomyces Cerevisiae* of LipG7 an Enantioselective, Cold-Adapted Lipase from the Antarctic Filamentous Fungus *Geomyces* Sp. P7 with Unusual Thermostability Characteristics”. *Enzyme and Microbial Technology* 53 (1): 18–24. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2013.03.021>.
- Fojan, P. 2000. “What distinguishes an esterase from a lipase: A novel structural approach”. *Biochimie* 82 (11): 1033–41. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(00\)01188-3](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(00)01188-3).
- Garcia-Ceron, Donovan, Rohan G. T. Lowe, James A. McKenna, Linda M. Brain, Charlotte S. Dawson, Bethany Clark, Oliver Berkowitz, et al. 2021. “Extracellular Vesicles from *Fusarium Graminearum* Contain Protein Effectors Expressed during Infection of Corn”. *Journal of Fungi* 7 (11): 977. <https://doi.org/10.3390/jof7110977>.
- Gasser, Brigitte, Michael Maurer, Jari Rautio, Michael Sauer, Anamitra Bhattacharyya, Markku Saloheimo, Merja Penttilä, Diethard Mattanovich. 2007. “Monitoring of Transcriptional Regulation in *Pichia Pastoris* under Protein Production Conditions”. *BMC Genomics* 8 (1): 179. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-179>.
- Gasteiger, Elisabeth, Christine Hoogland, Alexandre Gattiker, S'everine Duvaud, Marc R. Wilkins, Ron D. Appel, Amos Bairoch. 2005. “Protein Identification and Analysis Tools on the

- ExPASy Server". En *The Proteomics Protocols Handbook*, editado por John M. Walker, 571–607. Totowa, NJ: Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-890-0:571>.
- Geoffry, Kiptoo, Rajeshwara N. Achur. 2018. "Screening and Production of Lipase from Fungal Organisms". *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 14 (abril): 241–53. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.03.009>.
- González-Bacerio, Jorge, Rodríguez Jairo, Alberto del Monte-Martínez. 2010. "Las lipasas: enzimas con potencial para el desarrollo de biocatalizadores inmovilizados por adsorción interfacial". *Revista Colombiana de Biotecnología* 12 (junio).
- Gündüz Ergün, Burcu, Damla Hücetoğulları, Sibel Öztürk, Eda Çelik, Pınar Çalık. 2019. "Established and Upcoming Yeast Expression Systems". En *Recombinant Protein Production in Yeast*, editado por Brigitte Gasser y Diethard Mattanovich, 1923:1–74. *Methods in Molecular Biology*. New York, NY: Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9024-5_1.
- Gupta, Ramneek, Søren Brunak. 2002. "Prediction of Glycosylation across the Human Proteome and the Correlation to Protein Function". *Pacific Symposium on Biocomputing. Pacific Symposium on Biocomputing*, 310–22.
- Gupta, Rani, Arti Kumari, Poonam Syal, Yogesh Singh. 2015. "Molecular and Functional Diversity of Yeast and Fungal Lipases: Their Role in Biotechnology and Cellular Physiology". *Progress in Lipid Research* 57 (enero): 40–54. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2014.12.001>.
- Guruprasad, Kunchur, B.V.Bhasker Reddy, Madhusudan W. Pandit. 1990. "Correlation between Stability of a Protein and Its Dipeptide Composition: A Novel Approach for Predicting *in Vivo* Stability of a Protein from Its Primary Sequence". *Protein Engineering, Design and Selection* 4 (2): 155–61. <https://doi.org/10.1093/protein/4.2.155>.
- Gutiérrez-Domínguez, Denise Esther, Bartolomé Chí-Manzanero, María Mercedes Rodríguez-Argüello, Jewel Nicole Anna Todd, Ignacio Islas-Flores, Miguel Ángel Canseco-Pérez, Blondy Canto-Canché. 2022. "Identification of a Novel Lipase with AHSMG Pentapeptide in Hypocreales and Glomerellales Filamentous Fungi". *International Journal of Molecular Sciences* 23 (16): 9367. <https://doi.org/10.3390/ijms23169367>.

- Hagen, Joel B. 2012. "Five Kingdoms, More or Less: Robert Whittaker and the Broad Classification of Organisms". *BioScience* 62 (1): 67–74. <https://doi.org/10.1525/bio.2012.62.1.11>.
- Hallgren, Jeppe, Konstantinos D. Tsirigos, Mads Damgaard Pedersen, José Juan Almagro Armenteros, Paolo Marcatili, Henrik Nielsen, Anders Krogh, Ole Winther. 2022. "DeepTMHMM Predicts Alpha and Beta Transmembrane Proteins Using Deep Neural Networks". Preprint. Bioinformatics. <https://doi.org/10.1101/2022.04.08.487609>.
- Handrick, René, Simone Reinhardt, Maria Letizia Focarete, Mariastella Scandola, Grazyna Adamus, Marek Kowalczyk, Dieter Jendrosseck. 2001. "A New Type of Thermoalkalophilic Hydrolase of *Paucimonas Lemoignei* with High Specificity for Amorphous Polyesters of Short Chain-Length Hydroxyalkanoic Acids". *Journal of Biological Chemistry* 276 (39): 36215–24. <https://doi.org/10.1074/jbc.M101106200>.
- Hausmann, S., K.-E. Jaeger. 2010. "Lipolytic Enzymes from Bacteria". En *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, editado por Kenneth N. Timmis, 1099–1126. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-77587-4_77.
- Heidarzadeh, Nahid, Sareh Baghaee-Ravari. 2015. "Application of *Bacillus Pumilus* as a Potential Biocontrol Agent of *Fusarium* Wilt of Tomato". *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 48 (13–16): 841–49. <https://doi.org/10.1080/03235408.2016.1140611>.
- Hernández-Gómez, E. 2017. "HONGOS PRODUCTORES DE LIPASAS, UNA ALTERNATIVA AMIGABLE PARA LA PRODUCCIÓN DE BIODIESEL EN MÉXICO" 10 (10). <https://www.revista-agroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/97>.
- Hohenblum, Hubertus, Brigitte Gasser, Michael Maurer, Nicole Borth, Diethard Mattanovich. 2004. "Effects of Gene Dosage, Promoters, and Substrates on Unfolded Protein Stress of Recombinant *Pichia Pastoris*". *Biotechnology and Bioengineering* 85 (4): 367–75. <https://doi.org/10.1002/bit.10904>.
- Horton, P., K.-J. Park, T. Obayashi, N. Fujita, H. Harada, C.J. Adams-Collier, K. Nakai. 2007. "WoLF PSORT: Protein Localization Predictor". *Nucleic Acids Research* 35 (Web Server): W585–87. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm259>.

- Horvath, Balint, Nesrine Khazami, Prespa Ymeri, Csaba Fogarassy. 2019. "INVESTIGATING THE CURRENT BUSINESS MODEL INNOVATION TRENDS IN THE BIOTECHNOLOGY INDUSTRY". *Journal of Business Economics and Management* 20 (1): 63–85. <https://doi.org/10.3846/jbem.2019.6880>.
- Hosseini, Mostafa, Ali Asghar Karkhane, Bagher Yakhchali, Mehdi Shamsara, Saeed Aminzadeh, Dena Morshedi, Kamahldin Haghbeen, Ibrahim Torktaz, Esmat Karimi, Zahra Safari. 2013. "In Silico and Experimental Characterization of Chimeric Bacillus Thermocatenulatus Lipase with the Complete Conserved Pentapeptide of Candida Rugosa Lipase". *Applied Biochemistry and Biotechnology* 169 (3): 773–85. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-0014-0>.
- Hulo, N. 2006. "The PROSITE Database". *Nucleic Acids Research* 34 (90001): D227–30. <https://doi.org/10.1093/nar/gkj063>.
- Ikai. 1980. "Thermostability and Aliphatic Index of Globular Proteins". *The Journal of Biochemistry*, octubre. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a133168>.
- Ishak, Siti, Sayangku Aris, Khairul Halim, Mohd Ali, Thean Leow, Nor Kamarudin, Malihe Masomian, Raja Rahman. 2017. "Molecular Dynamic Simulation of Space and Earth-Grown Crystal Structures of Thermostable T1 Lipase Geobacillus Zalihae Revealed a Better Structure". *Molecules* 22 (10): 1574. <https://doi.org/10.3390/molecules22101574>.
- Ishak, Siti Nor Hasmah, Nor Hafizah Ahmad Kamarudin, Mohd Shukuri Mohamad Ali, Adam Thean Chor Leow, Raja Noor Zaliha Raja Abd. Rahman. 2020. "Ion-Pair Interaction and Hydrogen Bonds as Main Features of Protein Thermostability in Mutated T1 Recombinant Lipase Originating from Geobacillus Zalihae". *Molecules* 25 (15): 3430. <https://doi.org/10.3390/molecules25153430>.
- Jaeger, Karl-Erich, Thorsten Eggert. 2002. "Lipases for Biotechnology". *Current Opinion in Biotechnology* 13 (4): 390–97. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(02\)00341-5](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00341-5).
- Javed, Saira, Farrukh Azeem, Sabir Hussain, Ijaz Rasul, Muhammad Hussnain Siddique, Muhammad Riaz, Muhammad Afzal, Ambreen Kouser, Habibullah Nadeem. 2018. "Bacterial Lipases: A Review on Purification and Characterization". *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 132 (enero): 23–34. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2017.07.014>.

- Juturu, Veeresh, Jin Chuan Wu. 2018. "Heterologous Protein Expression in *Pichia Pastoris*: Latest Research Progress and Applications". *ChemBioChem* 19 (1): 7–21. <https://doi.org/10.1002/cbic.201700460>.
- Kajiwara, Shota, Ryosuke Yamada, Takuya Matsumoto, Hiroyasu Ogino. 2020. "N-Linked Glycosylation of Thermostable Lipase from *Bacillus Thermocatenulatus* to Improve Organic Solvent Stability". *Enzyme and Microbial Technology* 132 (enero): 109416. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2019.109416>.
- Kanjanavas, Pornpimon, Sintawee Khuchareontaworn, Paisarn Khawsak, Arda Pakpitcharoen, Khajeenart Pothivejkul, Somchai Santiwatanakul, Kenji Matsui, Tadahiko Kajiwara, Kosum Chansiri. 2010. "Purification and Characterization of Organic Solvent and Detergent Tolerant Lipase from Thermotolerant *Bacillus* Sp. RN2". *International Journal of Molecular Sciences* 11 (10): 3783–92. <https://doi.org/10.3390/ijms11103783>.
- Karbalaeei, Mohsen, Seyed A. Rezaee, Hadi Farsiani. 2020. "*Pichia Pastoris*: A Highly Successful Expression System for Optimal Synthesis of Heterologous Proteins". *Journal of Cellular Physiology* 235 (9): 5867–81. <https://doi.org/10.1002/jcp.29583>.
- Keyhani, Nemat O. 2018. "Lipid Biology in Fungal Stress and Virulence: Entomopathogenic Fungi". *Fungal Biology* 122 (6): 420–29. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2017.07.003>.
- Khan, Firdos Alam. 2012. *Biotechnology fundamentals*. Boca Raton: CRC Press.
- Khan, Noor, Maskit Maymon, Ann Hirsch. 2017. "Combating Fusarium Infection Using *Bacillus*-Based Antimicrobials". *Microorganisms* 5 (4): 75. <https://doi.org/10.3390/microorganisms5040075>.
- Kingsman, Susan M., Alan J. Kingsman, Melanie J. Dobson, Jane Mellor, Nicola A. Roberts. 1985. "Heterologous Gene Expression in *Saccharomyces Cerevisiae*". *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 3 (1): 377–416. <https://doi.org/10.1080/02648725.1985.10647819>.
- Konagurthu, Arun S., James C. Whisstock, Peter J. Stuckey, Arthur M. Lesk. 2006. "MUSTANG: A Multiple Structural Alignment Algorithm". *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 64 (3): 559–74. <https://doi.org/10.1002/prot.20921>.

- Kovacic, Filip, Nikolina Babic, Ulrich Krauss, Karl-Erich Jaeger. 2019. "Classification of Lipolytic Enzymes from Bacteria". En *Aerobic Utilization of Hydrocarbons, Oils, and Lipids*, editado por Fernando Rojo, 255–89. Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-50418-6_39.
- Krieger, Elmar, Keehyoung Joo, Jinwoo Lee, Jooyoung Lee, Srivatsan Raman, James Thompson, Mike Tyka, David Baker, Kevin Karplus. 2009. "Improving Physical Realism, Stereochemistry, and Side-Chain Accuracy in Homology Modeling: Four Approaches That Performed Well in CASP8: High-Resolution Homology Modeling". *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 77 (S9): 114–22. <https://doi.org/10.1002/prot.22570>.
- Kruger, Nicholas J. 2002. "The Bradford Method for Protein Quantitation". En *Protein Protocols Handbook, The*, de John M. Walker, 0:15–22. New Jersey: Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-169-8:15>.
- Kumar, Sandeep, Chung-Jung Tsai, Ruth Nussinov. 2000. "Factors Enhancing Protein Thermostability". *Protein Engineering, Design and Selection* 13 (3): 179–91. <https://doi.org/10.1093/protein/13.3.179>.
- Kumari, Arti, Rani Gupta. 2015. "Functional Characterisation of Novel Enantioselective Lipase TALipA from Trichosporon Asahii MSR54: Sequence Comparison Revealed New Signature Sequence AXSXG Among Yeast Lipases". *Applied Biochemistry and Biotechnology* 175 (1): 360–71. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1268-5>.
- Larkin, M.A., G. Blackshields, N.P. Brown, R. Chenna, P.A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, et al. 2007. "Clustal W and Clustal X Version 2.0". *Bioinformatics* 23 (21): 2947–48. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm404>.
- Letunic, I., P. Bork. 2007. "Interactive Tree Of Life (ITOL): An Online Tool for Phylogenetic Tree Display and Annotation". *Bioinformatics* 23 (1): 127–28. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl529>.
- Li, Pingzuo, Anukanth Anumanthan, Xiu-Gong Gao, Kuppusamy Ilangovan, Vincent V. Suzara, Nejat Düzgüneş, V. Renugopalakrishnan. 2007. "Expression of Recombinant Proteins in Pichia Pastoris". *Applied Biochemistry and Biotechnology* 142 (2): 105–24. <https://doi.org/10.1007/s12010-007-0003-x>.

- Liang, Han-Kuen, Chia-Mao Huang, Ming-Tat Ko, Jenn-Kang Hwang. 2005. "Amino Acid Coupling Patterns in Thermophilic Proteins". *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 59 (1): 58–63. <https://doi.org/10.1002/prot.20386>.
- Liebana-Jordan, Marc, Bruno Brotons, Juan Manuel Falcon-Perez, Esperanza Gonzalez. 2021. "Extracellular Vesicles in the Fungi Kingdom". *International Journal of Molecular Sciences* 22 (13): 7221. <https://doi.org/10.3390/ijms22137221>.
- Liu, Xiaoyu, Mingyang Zhou, Shu Xing, Tao Wu, Hailun He, John Kevin Bielicki, Jianbin Chen. 2021. "Identification and Biochemical Characterization of a Novel Hormone-Sensitive Lipase Family Esterase Est19 from the Antarctic Bacterium *Pseudomonas* Sp. E2-15". *Biomolecules* 11 (11): 1552. <https://doi.org/10.3390/biom11111552>.
- Liu, Zihe, Keith E.J. Tyo, José L. Martínez, Dina Petranovic, Jens Nielsen. 2012. "Different Expression Systems for Production of Recombinant Proteins in *Saccharomyces Cerevisiae*". *Biotechnology and Bioengineering* 109 (5): 1259–68. <https://doi.org/10.1002/bit.24409>.
- Lu, B., G. Wang, P. Huang. 1998. "A comparison of amino acid composition of proteins from thermophiles and mesophiles". *Wei Sheng Wu Xue Bao = Acta Microbiologica Sinica* 38 (1): 20–25.
- Luscombe, N.M., D. Greenbaum, M. Gerstein. 2001. "What Is Bioinformatics? An Introduction and Overview". *Yearbook of Medical Informatics* 10 (01): 83–100. <https://doi.org/10.1055/s-0038-1638103>.
- Maiangwa, Jonathan, Siti Hajar Hamdan, Mohd Shukuri Mohamad Ali, Abu Bakar Salleh, Raja Noor Zaliha Raja Abd Rahman, Fairalniza Mohd Shariff, Thean Chor Leow. 2021. "Enhancing the Stability of *Geobacillus Zalihae* T1 Lipase in Organic Solvents and Insights into the Structural Stability of Its Variants". *Journal of Molecular Graphics and Modelling* 105 (junio): 107897. <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2021.107897>.
- Mala, John Geraldine Sandana, Satoru Takeuchi. 2008. "Understanding Structural Features of Microbial Lipases—An Overview". *Analytical Chemistry Insights* 3 (enero): ACI.S551. <https://doi.org/10.4137/ACI.S551>.

- Martínez-Corona, R., C. Cortés-Penagos, L. A. Madrigal-Pérez, J. C. González-Hernández. 2019. "Hongos y Levaduras: Fábricas de lipasas" 44 (7): 378–85.
- Masaki, Kazuo, Numbi Ramudu Kamini, Hiroko Ikeda, Haruyuki Iefuji. 2005. "Cutinase-Like Enzyme from the Yeast *Cryptococcus* Sp. Strain S-2 Hydrolyzes Polylactic Acid and Other Biodegradable Plastics". *Applied and Environmental Microbiology* 71 (11): 7548–50. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.7548-7550.2005>.
- Matsumura, Hiroyoshi, Takahiko Yamamoto, Thean Chor Leow, Tadashi Mori, Abu Bakar Salleh, Mahiran Basri, Tsuyoshi Inoue, Yasushi Kai, Raja Noor Zaliha Raja Abd Rahman. 2007. "Novel Cation- π Interaction Revealed by Crystal Structure of Thermoalkalophilic Lipase". *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 70 (2): 592–98. <https://doi.org/10.1002/prot.21799>.
- Mattanovich, Diethard, Paola Branduardi, Laura Dato, Brigitte Gasser, Michael Sauer, Danilo Porro. 2012. "Recombinant Protein Production in Yeasts". En *Recombinant Gene Expression*, editado por Argelia Lorence, 824:329–58. Methods in Molecular Biology. Totowa, NJ: Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-433-9_17.
- Md. Illias, Rosli, Aizi Nor Mazila Ramli, Kheng Oon Low, Nor Muhammad Mahadi, Abdul Munir Abdul Murad, Amir Rabu. 2014. "Heterologous Expression of Proteins from Cold-Adapted Yeasts in Suitable Hosts: Methods and Applications". En *Cold-Adapted Yeasts*, editado por Pietro Buzzini y Rosa Margesin, 481–96. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-39681-6_22.
- Meghwanshi, Gautam Kumar, Abhishek Vashishtha. 2018. "Biotechnology of Fungal Lipases". En *Fungi and Their Role in Sustainable Development: Current Perspectives*, editado por Praveen Gehlot y Joginder Singh, 383–411. Singapore: Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-0393-7_22.
- Mehta, Akshita, Urgyn Bodh, Reena Gupta. 2017. "Fungal lipases : a review.", núm. 8: 58–77.
- Mészáros, Bálint, Gábor Erdős, Zsuzsanna Dosztányi. 2018. "IUPred2A: Context-Dependent Prediction of Protein Disorder as a Function of Redox State and Protein Binding". *Nucleic Acids Research* 46 (W1): W329–37. <https://doi.org/10.1093/nar/gky384>.

- Mrabet, N. T., A. Van den Broeck, I. Van den Brande, P. Stanssens, Y. Laroche, A. M. Lambeir, M. Chiadmi. 1992. "Arginine residues as stabilizing elements in proteins" 31 (8): 2239–53.
- Mukherjee, Debjani, Simranjeet Singh, Mohit Kumar, Vijay Kumar, Shivika Datta, Daljeet Singh Dhanjal. 2018. "Fungal Biotechnology: Role and Aspects". En *Fungi and Their Role in Sustainable Development: Current Perspectives*, editado por Praveen Gehlot y Joginder Singh, 91–103. Singapore: Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-0393-7_6.
- Muralidhar, R.V., R.R. Chirumamilla, R. Marchant, V.N. Ramachandran, O.P. Ward, P. Nigam. 2002. "Understanding lipase stereoselectivity". *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 18 (2): 81–97. <https://doi.org/10.1023/A:1014417223956>.
- Nakariyakul, Songyot, Zhi-Ping Liu, Luonan Chen. 2012. "Detecting Thermophilic Proteins through Selecting Amino Acid and Dipeptide Composition Features". *Amino Acids* 42 (5): 1947–53. <https://doi.org/10.1007/s00726-011-0923-1>.
- Nardini, Marco, Dietmar A. Lang, Klaus Liebeton, Karl-Erich Jaeger, Bauke W. Dijkstra. 2000. "Crystal Structure of Pseudomonas Aeruginosa Lipase in the Open Conformation". *Journal of Biological Chemistry* 275 (40): 31219–25. <https://doi.org/10.1074/jbc.M003903200>.
- Nasser Eddine, A., F. Hannemann, W. Schäfer. 2001. "Cloning and Expression Analysis of Nhl1, a Gene Encoding an Extracellular Lipase from the Fungal Pea Pathogen Nectria Haematococca MP VI (Fusarium Solani f. Sp. Pisi) That Is Expressed in Planta". *Molecular Genetics and Genomics* 265 (2): 215–24. <https://doi.org/10.1007/s004380000410>.
- Navarrete, Fernando, Nenad Grujic, Alexandra Stirnberg, Indira Saado, David Aleksza, Michelle Gallei, Hazem Adi, et al. 2021. "The Pleiades Are a Cluster of Fungal Effectors That Inhibit Host Defenses". Editado por Paul Birch. *PLOS Pathogens* 17 (6): e1009641. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009641>.
- Negi, Sangeeta. 2019. "Lipases: A Promising Tool for Food Industry". En *Green Bio-processes*, editado por Binod Parameswaran, Sunita Varjani, y Sindhu Raveendran, 181–98. Energy, Environment, and Sustainability. Singapore: Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-3263-0_10.

- Nur, Munir, Kelsey Wood, Richard Micheltmore. 2021. "EffectorO: Motif-Independent Prediction of Effectors in Oomycete Genomes Using Machine Learning and Lineage Specificity". Preprint. Plant Biology. <https://doi.org/10.1101/2021.03.19.436227>.
- Nurul Furqan, Baiq Repika, Akhmaloka. 2020. "Heterologous Expression and Characterization of Thermostable Lipase (Lk1) in *Pichia Pastoris* GS115". *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 23 (enero): 101448. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101448>.
- Oh, Yeonyee, Suzanne L. Robertson, Jennifer Parker, David C. Muddiman, Ralph A. Dean. 2017. "Comparative Proteomic Analysis between Nitrogen Supplemented and Starved Conditions in *Magnaporthe Oryzae*". *Proteome Science* 15 (1): 20. <https://doi.org/10.1186/s12953-017-0128-y>.
- Okpara, Michael O. 2022. "Microbial Enzymes and Their Applications in Food Industry: A Mini-Review". *Advances in Enzyme Research* 10 (01): 23–47. <https://doi.org/10.4236/aer.2022.101002>.
- Palomares, Laura A., Sandino Estrada-Mondaca, Octavio T. Ramírez. 2004. "Production of Recombinant Proteins: Challenges and Solutions". En *Recombinant Gene Expression*, de Paulina Balbas y Argelia Lorence, 267:015–052. New Jersey: Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-774-2:015>.
- Park, Minji, Eunsoo Do, Won Hee Jung. 2013. "Lipolytic Enzymes Involved in the Virulence of Human Pathogenic Fungi". *Mycobiology* 41 (2): 67–72. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2013.41.2.67>.
- Partow, Siavash, Verena Siewers, Sara Bjørn, Jens Nielsen, Jérôme Maury. 2010. "Characterization of Different Promoters for Designing a New Expression Vector in *Saccharomyces Cerevisiae*". *Yeast* 27 (11): 955–64. <https://doi.org/10.1002/yea.1806>.
- Pérez, Malena Martínez, Enrico Cerioni Spiropulos Gonçalves, Ana Claudia Vici, Jose Carlos Santos Salgado, Maria de Lourdes Teixeira de Moraes Polizeli. 2019. "Fungal Lipases: Versatile Tools for White Biotechnology". En *Recent Advancement in White Biotechnology Through Fungi*, editado por Ajar Nath Yadav, Shashank Mishra, Sangram Singh, y Arti Gupta, 361–404. Fungal Biology. Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-10480-1_11.

- Peterson, Gary L. 1977. "A Simplification of the Protein Assay Method of Lowry et al. Which Is More Generally Applicable". *Analytical Biochemistry* 83 (2): 346–56. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(77\)90043-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(77)90043-4).
- Pezeshgi Modarres, Hassan, Mohammad R. Mofrad, Amir Sanati-Nezhad. 2018. "ProtDataTherm: A Database for Thermostability Analysis and Engineering of Proteins". Editado por Eugene A. Permyakov. *PLOS ONE* 13 (1): e0191222. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191222>.
- Priyanka, Priyanka, Yeqi Tan, Gemma K. Kinsella, Gary T. Hennehan, Barry J. Ryan. 2019. "Solvent Stable Microbial Lipases: Current Understanding and Biotechnological Applications". *Biotechnology Letters* 41 (2): 203–20. <https://doi.org/10.1007/s10529-018-02633-7>.
- Puglisi, Ivana, Roberto Faedda, Vincenzo Sanzaro, Angela R. Lo Piero, Goffredo Petrone, Santa O. Cacciola. 2012. "Identification of Differentially Expressed Genes in Response to Mercury I and II Stress in *Trichoderma Harzianum*". *Gene* 506 (2): 325–30. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.06.091>.
- Pupin, Antonio Marcos, Claudio Luiz Messias, Aquiles Eugênio Piedrabuena, Donald Wilson Roberts. 2000. "Total Lipids and Fatty Acids of Strains of *Metarhizium Anisopliae*". *Brazilian Journal of Microbiology* 31 (2): 121–28. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822000000200012>.
- Putri, A M, T Sumaryada, S T Wahyudi. 2017. "Conformation Analysis of T1 Lipase on Alcohols Solvent using Molecular Dynamics Simulation". *Journal of Physics: Conference Series* 877 (julio): 012007. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/877/1/012007>.
- Qin, Xiaoli, Jinfeng Zhong, Yonghua Wang. 2021. "A Mutant T1 Lipase Homology Modeling, and Its Molecular Docking and Molecular Dynamics Simulation with Fatty Acids". *Journal of Biotechnology* 337 (agosto): 24–34. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2021.06.024>.
- Rahman, Mohd Zulhilmi Abdul, Abu Bakar Salleh, Raja Noor Zaliha Raja Abdul Rahman, Mohd Basyaruddin Abdul Rahman, Mahiran Basri, Thean Chor Leow. 2012. "Unlocking the Mystery behind the Activation Phenomenon of T1 Lipase: A Molecular Dynamics Simulations Approach". *Protein Science* 21 (8): 1210–21. <https://doi.org/10.1002/pro.2108>.

- Rahman, Raja, Thean Leow, Abu Salleh, Mahiran Basri. 2007. "Geobacillus zalihae sp. nov., a thermophilic lipolytic bacterium isolated from palm oil mill effluent in Malaysia". *BMC Microbiology* 7 (1): 77. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-7-77>.
- Ramesh, Adhithi, P. Harani Devi, Sulagna Chattopadhyay, M. Kavitha. 2020. "Commercial Applications of Microbial Enzymes". En *Microbial Enzymes: Roles and Applications in Industries*, editado por Naveen Kumar Arora, Jitendra Mishra, y Vaibhav Mishra, 11:137–84. Microorganisms for Sustainability. Singapore: Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-15-1710-5_6.
- Ramírez R., Sara, Julián David Arias M., Juan Carlos Bedoya, Ever Antoni Rueda L., Claudia Yaneth Sánchez, Sinar David Granada G. 2015. "Metabolites produced by antagonistic microbes inhibit the principal avocado pathogens in vitro". *Agronomía Colombiana* 33 (1): 58–63. <https://doi.org/10.15446/agron.colomb.v33n1.48241>.
- Robert, Xavier, Patrice Gouet. 2014. "Deciphering Key Features in Protein Structures with the New ENDscript Server". *Nucleic Acids Research* 42 (W1): W320–24. <https://doi.org/10.1093/nar/gku316>.
- Robles-Machuca, Marcela, M. Martin del Campo, M. Ángeles Camacho-Ruiz, Enrique Ordaz, Edgar O. Zamora-González, Marcelo Müller-Santos, Jorge A. Rodríguez. 2019. "Comparative Features between Recombinant Lipases CALA-like from U. Maydis and CALA from C. Antarctica in Thermal Stability and Selectivity". *Biotechnology Letters* 41 (2): 241–52. <https://doi.org/10.1007/s10529-018-2630-4>.
- Rozewicki, John, Songling Li, Karlou Mar Amada, Daron M Standley, Kazutaka Katoh. 2019. "MAFFT-DASH: Integrated Protein Sequence and Structural Alignment". *Nucleic Acids Research*, mayo, gkz342. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz342>.
- Ruiz, C., F.I. Javier Pastor, P. Diaz. 2003. "Isolation and Characterization of Bacillus Sp. BP-6 LipA, a Ubiquitous Lipase among Mesophilic Bacillus Species". *Letters in Applied Microbiology* 37 (4): 354–59. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2003.01413.x>.
- Russell, Rupert JM, David W Hough, Michael J Danson, Garry L Taylor. 1994. "The Crystal Structure of Citrate Synthase from the Thermophilic Archaeon, Thermoplasma Acidophilum". *Structure* 2 (12): 1157–67. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(94\)00118-9](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(94)00118-9).

- Saliyu, Aliyu, Md. Zahangir Alam. 2015. "Solvent Tolerant Lipases: A Review". *Process Biochemistry* 50 (1): 86–96. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.10.019>.
- Sangeetha, R., I. Arulpandi, A. Geetha. 2014. "Molecular Characterization of a Proteolysis-Resistant Lipase from *Bacillus Pumilus* SG2". *Brazilian Journal of Microbiology* 45 (2): 389–93. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822014000200004>.
- Schneider, Maria V., Sandra Orchard. 2011. "Omics Technologies, Data and Bioinformatics Principles". En *Bioinformatics for Omics Data*, editado por Bernd Mayer, 719:3–30. Methods in Molecular Biology. Totowa, NJ: Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-027-0_1.
- Schuster, André, Monika Schmoll. 2010. "Biology and Biotechnology of Trichoderma". *Applied Microbiology and Biotechnology* 87 (3): 787–99. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2632-1>.
- Schwarzshans, Jan-Philipp, Daniel Wibberg, Anika Winkler, Tobias Luttermann, Jörn Kalinowski, Karl Friehs. 2016. "Integration Event Induced Changes in Recombinant Protein Productivity in *Pichia Pastoris* Discovered by Whole Genome Sequencing and Derived Vector Optimization". *Microbial Cell Factories* 15 (1): 84. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0486-7>.
- Shimasaki, Craig. 2020. "What Is Biotechnology Entrepreneurship?" En *Biotechnology Entrepreneurship*, 3–16. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815585-1.00001-2>.
- Sperschneider, Jana, Peter N. Dodds, Donald M. Gardiner, Karam B. Singh, Jennifer M. Taylor. 2018. "Improved Prediction of Fungal Effector Proteins from Secretomes with EffectorP 2.0: Prediction of Fungal Effectors with EffectorP 2.0". *Molecular Plant Pathology* 19 (9): 2094–2110. <https://doi.org/10.1111/mpp.12682>.
- Springham, D. G., V. Moses, Ronald E. Cape, eds. 2020. *Biotechnology: The Science and the Business*. 2nd edition. Boca Raton: CRC Press.
- Sreelatha, B., V. Koteswara Rao, R. Ranjith Kumar, S. Girisham, S.M. Reddy. 2017. "Culture Conditions for the Production of Thermostable Lipase by *Thermomyces Lanuginosus*". *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences* 6 (1): 87–95. <https://doi.org/10.1016/j.bjbas.2016.11.010>.

- Stehr, F., M. Kretschmar, C. Kröger, B. Hube, W. Schäfer. 2003. "Microbial Lipases as Virulence Factors". *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 22 (5–6): 347–55. [https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(03\)00049-3](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(03)00049-3).
- Tang, Qingyun, Dongming Lan, Bo Yang, Faez Iqbal Khan, Yonghua Wang. 2017. "Site-directed Mutagenesis Studies of Hydrophobic Residues in the Lid Region of T1 Lipase". *European Journal of Lipid Science and Technology* 119 (3): 1600107. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201600107>.
- Teufel, Felix, José Juan Almagro Armenteros, Alexander Rosenberg Johansen, Magnús Halldór Gíslason, Silas Irby Pihl, Konstantinos D. Tsirigos, Ole Winther, Søren Brunak, Gunnar von Heijne, Henrik Nielsen. 2021. "SignalP 6.0 Achieves Signal Peptide Prediction across All Types Using Protein Language Models". Preprint. Bioinformatics. <https://doi.org/10.1101/2021.06.09.447770>.
- Trivedi, S., H. S. Gehlot, S. R. Rao. 2006. "Protein Thermostability in Archaea and Eubacteria". *Genetics and Molecular Research: GMR* 5 (4): 816–27.
- Tu, Maolin, Shuzhen Cheng, Weihong Lu, Ming Du. 2018. "Advancement and Prospects of Bioinformatics Analysis for Studying Bioactive Peptides from Food-Derived Protein: Sequence, Structure, and Functions". *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 105 (agosto): 7–17. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.04.005>.
- Tzelepis, Georgios, Fredrik Dörfors, Louise Holmquist, Christina Dixelius. 2021. "Plant Mitochondria and Chloroplasts Are Targeted by the Rhizoctonia Solani RsCRP1 Effector". *Biochemical and Biophysical Research Communications* 544 (marzo): 86–90. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.01.019>.
- Valero, Francisco. 2012. "Heterologous Expression Systems for Lipases: A Review". En *Lipases and Phospholipases*, editado por Georgina Sandoval, 861:161–78. Methods in Molecular Biology. Totowa, NJ: Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-600-5_11.
- Valero, Francisco. 2018. "Recent Advances in Pichia pastoris as Host for Heterologous Expression System for Lipases: A Review". En *Lipases and Phospholipases*, editado por Georgina Sandoval, 1835:205–16. Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8672-9_11.

- Verma, Swati, Gautam Kumar Meghwanshi, Rajender Kumar. 2021. "Current Perspectives for Microbial Lipases from Extremophiles and Metagenomics". *Biochimie* 182 (marzo): 23–36. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.12.027>.
- Vogl, Thomas, Leigh Gebbie, Robin W. Palfreyman, Robert Speight. 2018. "Effect of Plasmid Design and Type of Integration Event on Recombinant Protein Expression in *Pichia Pastoris*". Editado por Emma R. Master. *Applied and Environmental Microbiology* 84 (6): e02712-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.02712-17>.
- Voigt, Christian A., Wilhelm Schäfer, Siegfried Salomon. 2005. "A Secreted Lipase of *Fusarium Graminearum* Is a Virulence Factor Required for Infection of Cereals: Lipase as a Virulence Factor". *The Plant Journal* 42 (3): 364–75. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02377.x>.
- Volmar, Claude-Henry, Nikunj Patel, Amita N. Quadros, Daniel Paris, Venkatarajan S. Mathura, Michael Mullan. 2009. "Introduction to Biological Systems". En *Bioinformatics: A Concept-Based Introduction*, editado por Venkatarajan S. Mathura y Pandjassaram Kanguane, 1–11. Boston, MA: Springer US. https://doi.org/10.1007/978-0-387-84870-9_1.
- Vorapreeda, Tayvich, Chinae Thammarongtham, Supapon Cheevadhanarak, Kobkul Laoteng. 2015. "Genome Mining of Fungal Lipid-Degrading Enzymes for Industrial Applications". *Microbiology* 161 (8): 1613–26. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000127>.
- Vorapreeda, Tayvich, Chinae Thammarongtham, Kobkul Laoteng. 2016. "Integrative Computational Approach for Genome-Based Study of Microbial Lipid-Degrading Enzymes". *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 32 (7): 122. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2067-7>.
- Wang, De, Liang Yang, Zhengqi Fu, Jingbo Xia. 2011. "Prediction of Thermophilic Protein with Pseudo Amino Acid Composition: An Approach from Combined Feature Selection and Reduction". *Protein & Peptide Letters* 18 (7): 684–89. <https://doi.org/10.2174/092986611795446085>.
- Wang, Jian-Rong, Yang-Yuan Li, Shu-De Xu, Peng Li, Jing-Shan Liu, Dan-Ni Liu. 2013. "High-Level Expression of Pro-Form Lipase from *Rhizopus Oryzae* in *Pichia Pastoris* and Its Purification and Characterization". *International Journal of Molecular Sciences* 15 (1): 203–17. <https://doi.org/10.3390/ijms15010203>.

- Winkler, U K, M Stuckmann. 1979. "Glycogen, Hyaluronate, and Some Other Polysaccharides Greatly Enhance the Formation of Exolipase by *Serratia Marcescens*". *Journal of Bacteriology* 138 (3): 663–70. <https://doi.org/10.1128/jb.138.3.663-670.1979>.
- Wood, Kelsey J., Munir Nur, Juliana Gil, Kyle Fletcher, Kim Lakeman, Dasan Gann, Ayumi Gothberg, et al. 2020. "Effector Prediction and Characterization in the Oomycete Pathogen *Bremia Lactucae* Reveal Host-Recognized WY Domain Proteins That Lack the Canonical RXLR Motif". Editado por Mark J. Banfield. *PLOS Pathogens* 16 (10): e1009012. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009012>.
- Yadav, Santosh, Amit Dubei, Sangeeta Yadav, Deepali Bisht, Nandan Darmwal, y Dinesh Yadav. 2012. "Amino acid sequences based phylogenetic and motif assessment of lipases from different organisms". *Online Journal of Bioinformatics* 13 (3): 400–417.
- Yang, Jiangke, Bo Zhang, Yunjun Yan. 2009. "Cloning and Expression of *Pseudomonas Fluorescens* 26-2 Lipase Gene in *Pichia Pastoris* and Characterizing for Transesterification". *Applied Biochemistry and Biotechnology* 159 (2): 355–65. <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8419-5>.
- Zhou, X.-X., Y.-B. Wang, Y.-J. Pan, W.-F. Li. 2008. "Differences in Amino Acids Composition and Coupling Patterns between Mesophilic and Thermophilic Proteins". *Amino Acids* 34 (1): 25–33. <https://doi.org/10.1007/s00726-007-0589-x>.