



---

# UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE DOCTORADO EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS

Área Temática: Biotecnología Alimentaria  
Facultad de Químico Farmacobiología

TESIS:

**“CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LAS LIPASAS  
EXTRACELULARES DE *Kluyveromyces marxianus*  
EXPRESADAS EN UN SISTEMA HETERÓLOGO”**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
**DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Presenta:

**MC Ricardo Martínez Corona**

Director de tesis:

**DC Carlos Cortés Penagos**

Co-director de tesis:

**DC Juan Carlos González Hernández**

MORELIA, MICHOACÁN

DICIEMBRE 2019



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

Programa Institucional de  
Doctorado en Ciencias Biológicas

DRA. ESPERANZA MELÉNDEZ HERRERA  
COORDINADORA GENERAL DEL PROGRAMA INSTITUCIONAL DE  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
P R E S E N T E

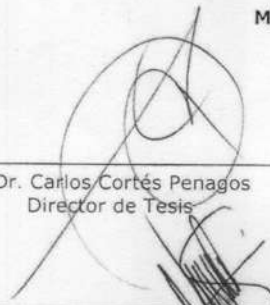
Por este conducto nos permitimos comunicarle que después de haber revisado el manuscrito final de la Tesis Titulada: "Caracterización bioquímica de las lipasas extracelulares de *Kluyveromyces marxianus* expresadas en un sistema heterólogo" presentado por el M.C RICARDO MARTÍNEZ CORONA con matrícula No. 1053843B, consideramos que reúne los requisitos suficientes para ser publicado y defendido en Examen de Grado de Doctor en Ciencias.


Sin otro particular por el momento, reiteramos a usted un cordial saludo.

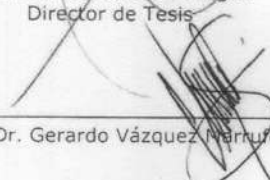
ATENTAMENTE

Morelia, Mich., a 05 de noviembre de 2019

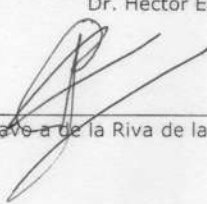
MIEMBROS DE LA COMISIÓN REVISORA

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Carlos Cortés Penagos  
Director de Tesis

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Juan Carlos González Hernández  
Co director

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Gerardo Vázquez Marrufo

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Héctor Eduardo Martínez Flores

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Gustavo de la Riva de la Riva

c.c.p. Archivo de la O BA

Coordinación de Posgrado de la Facultad de Biología. Edif. "R" Planta Baja. Ciudad Universitaria, Morelia, Michoacán.  
CP 58060. Tel/Fax. (443) 3167412. Email: oazul74@yahoo.com.mx o pcerritosbarriaga@gmail.com

*A mis padres,  
mis más grandes  
maestros de vida.*

## AGRADECIMIENTOS

A Dios. Estaré eternamente agradecido por el más grande regalo que me pudo haber dado, mi hermosa familia, y todo el amor y bendiciones que recibo a través de ella cada día.

A mis padres. A mi mamá, Jochis, por ese amor tan puro y gigante que me brindas incondicionalmente todos los días, por siempre regalarme una sonrisa, escucharme en los momentos más difíciles y brindarme serenidad con una palabra de aliento o un abrazo; no hay forma de compensarte todo lo que has hecho y sigues haciendo por mí, y tampoco hay forma de expresarte cuánto te amo mamá. A mi papá, por estar siempre ahí, por tener siempre las palabras indicadas para apoyarme y salir adelante, por compartir conmigo tantos momentos tan sencillos, pero tan significativos; gracias por dar siempre todo por tu familia, te admiro infinitamente, espero algún día poder llegar a ser sólo un poco de lo que tú eres. Gracias a ambos por enseñarme el valor de la humildad, respeto y responsabilidad. Este y todos mis logros, siempre serán suyos.

A mi hermana, Paola. Por seguir siempre cuidándome y protegiéndome, por preocuparte siempre por mí. Por escucharme, sean problemas pequeños o grandes, y por siempre estar ahí para aconsejarme. Por tantos momentos compartidos, los difíciles, pero sobre todo los más hermosos y divertidos. Siempre estaremos juntos. Gracias por darme un regalo tan especial, junto con Héctor, que ha cambiado mi vida y la de todos, mi Sofi. Gracias por quererme tanto.

A mi mejor amiga y novia, Kari. No hay palabras que puedan describir el sentido que le das a mi vida cada día. Me acompañaste en este camino casi desde el inicio, y te convertiste en mi todo. Gracias siempre por escucharme, por dar todo por entender mi trabajo, porque de esa manera siempre me ayudaste a tomar decisiones y me aconsejaste; no hay reflejo de tan más grande amor que tales acciones. Gracias por ser mi soporte, mi consejo y mi felicidad. Sabes que te admiro y que eres parte de todos mis logros y alegrías. Por tu increíble familia que siempre me hace sentir parte de ellos. Te amo.

A todos mis amigos, que son mi otra familia, y que cerca o lejos siempre están apoyándome y compartiendo mis alegrías. A mis compañeros de laboratorio durante el tiempo que compartimos, especialmente a mis asesorados; gracias por tantos momentos agradables y por su amistad. A mis compañeros de trabajo, especialmente a mis queridos amigos, Pepe e Isela, que siempre están ahí para alentarme en todo y regalarme risas.

A mis asesores y sinodales. Al Dr. Carlos, por darme la oportunidad de trabajar con él, por su apoyo, su atención y amabilidad, por siempre motivarme aun en los momentos académicos difíciles. De manera especial al Dr. Juan Carlos, por su confianza y amistad, por seguir inculcándome el gusto por la investigación, por sus enseñanzas en los momentos malos y buenos. Al Dr. Gerardo y al Dr. Alberto, que me compartieron sus grandes conocimientos, que hoy se ven reflejados en gran parte del trabajo obtenido. Al Dr. Héctor y el Dr. Gustavo por sus consejos y observaciones. A todos ellos, porque no solamente son grandes investigadores, sino también son grandes personas.

Al Instituto Tecnológico de Morelia, mi alma mater y por siempre mi casa, ya que la mayor parte del desarrollo del proyecto se llevó a cabo en el mismo. Además, Se agradecen los donativos parciales de la Convocatoria de Apoyo a Proyectos de Investigación Científica, Aplicada, Desarrollo Tecnológico e Innovación 2016 y 2017, del Tecnológico Nacional de México. Número de proyectos: 5781.6-P y 6131.17-P, respectivamente.

Finalmente, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo de beca otorgada.

Este trabajo ha sido gracias a ustedes.

## CONTENIDO

<b>I. RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>II. SUMMARY .....</b>	<b>3</b>
<b>III. INTRODUCCIÓN GENERAL .....</b>	<b>5</b>
3.1 Lipasas.....	5
3.1.1 Características generales .....	5
3.1.2 Estructura .....	6
3.1.3 Microorganismos productores de lipasas .....	8
3.2 <i>Kluyveromyces marxianus</i> .....	9
3.2.1 Antecedentes de la actividad lipásica de <i>K. marxianus</i> .....	10
3.2.2 Antecedentes moleculares de <i>K. marxianus</i> .....	10
3.2.3 Lipasas putativas de <i>K. marxianus</i> .....	11
3.2.4 Ventajas de la síntesis de lipasas extracelulares de <i>K. marxianus</i> .....	14
3.3 Producción de lipasas recombinantes.....	15
3.3.1 Sistemas usados para la expresión heteróloga de lipasas .....	16
3.3.1.1 características de <i>S. cerevisiae</i> como sistema de expresión .....	17
3.4 Justificación.....	18
<b>IV. PLANTEAMIENTO DE HIPÓTESIS.....</b>	<b>20</b>
4.1 Pregunta de investigación.....	20
4.2 Hipótesis.....	20
<b>V. OBJETIVOS.....</b>	<b>21</b>
5.1 Objetivo general .....	21
5.2 Objetivos específicos.....	21
<b>VI. RESULTADOS .....</b>	<b>22</b>
6.1 Capítulo I: Análisis bioinformático de las lipasas extracelulares de <i>K. marxianus</i> L-2029....	23
6.1.1 Resumen .....	23
6.1.2 Introducción .....	24
6.1.3 Materiales y métodos .....	26
6.1.3.1 Levadura.....	27
6.1.3.2 Determinación de características generales.....	27
6.1.3.3 Filogenia de las lipasas putativas de <i>K. marxianus</i> .....	28

6.1.3.4 Regulación de la expresión de las lipasas extracelulares putativas de <i>K. marxianus</i> .	28
6.1.3.5 Modelado de las lipasas extracelulares putativas de <i>K. marxianus</i> .....	32
6.1.4 Resultados y discusión .....	32
6.1.4.1 Determinación de características generales.....	32
6.1.4.2 Filogenia de las lipasas putativas de <i>K. marxianus</i> .....	35
6.1.4.3 Regulación de las lipasas extracelulares putativas de <i>K. marxianus</i> .....	40
6.1.4.4 Modelado de las lipasas extracelulares putativas de <i>K. marxianus</i> L-2029 .....	44
6.1.4.5 Determinación de características estructurales a partir del modelo de las lipasas extracelulares putativas de <i>K. marxianus</i> L-2029 .....	51
6.1.5 Conclusiones .....	56
6.1.6 Literatura consultada.....	57
6.2 Capítulo II: Identificación y caracterización bioquímica de las lipasas extracelulares de <i>K. marxianus</i> L-2029 expresadas heterológamente en <i>S. cerevisiae</i> BY4742.....	62
6.2.1 Resumen.....	62
6.2.2 Introducción .....	63
6.2.3 Materiales y métodos .....	65
6.2.3.1 Levaduras utilizadas en el estudio.....	65
6.2.3.2 Identificación de lipasas putativas en la cepa <i>K. marxianus</i> L-2029.....	65
6.2.3.3 Extracción de ADN de <i>K. marxianus</i> L-2029 .....	66
6.2.3.4 Cuantificación de ADN.....	66
6.2.3.5 Electroforesis de ADN .....	68
6.2.3.6 Diseño de <i>primers</i> de las lipasas putativas de <i>K. marxianus</i> L-2029.....	68
6.2.3.7 Amplificación de los genes de las lipasas putativas de <i>K. marxianus</i> L-2029.....	69
6.2.3.8 Identificación de los genes amplificados.....	70
6.2.3.9 Clonación en vector de expresión .....	71
6.2.3.10 Transformación heteróloga de <i>S. cerevisiae</i> BY4742 .....	76
6.2.3.11 Selección y producción de la proteína recombinante .....	77
6.2.4 Resultados y discusión .....	81
6.2.4.1 Identificación de lipasas putativas en la cepa <i>K. marxianus</i> L-2029.....	81
6.2.4.2 Extracción de ADN de la cepa <i>K. marxianus</i> L-2029 .....	81
6.2.4.3 Amplificación de los genes de lipasas putativas extracelulares LIP3 y YJR107W .	83
6.2.4.4 Clonación en vector de expresión .....	87

6.2.4.5 Expresión heteróloga en <i>S. cerevisiae</i> BY4742 .....	93
6.2.4.6 Inducción y síntesis de las lipasas recombinantes .....	95
6.2.4.7 Determinación de las propiedades del extracto obtenido con proteína <i>pYJR107W</i> expresada en <i>S. cerevisiae</i> BY4742 .....	104
6.2.5 Conclusiones .....	106
6.2.6 Literatura consultada .....	106
<b>VII. CONCLUSIONES GENERALES .....</b>	<b>109</b>
<b>VIII. PERSPECTIVAS Y/O RECOMENDACIONES.....</b>	<b>110</b>
<b>IX. BIBLIOGRAFÍA COMPLEMENTARIA .....</b>	<b>111</b>
<b>X. ANEXOS .....</b>	<b>115</b>
10.1 Screening de levaduras con actividad lipásica .....	115
10.2 Secuencias de las lipasas putativas extracelulares de <i>K. marxianus</i> .....	118
10.3 Artículos de investigación publicados.....	122



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características generales de las lipasas putativas de <i>K. marxianus</i> .....	12
Tabla 2. Lipasas con porcentaje más alto de identidad relacionadas a las lipasas putativas de <i>K. marxianus</i> .....	14
Tabla 3. Lipasas seleccionadas para el análisis filogenético.....	29
Tabla 4. Características generales de las lipasas putativas de <i>K. marxianus</i> .....	34
Tabla 5. Características estructurales de las lipasas putativas de <i>K. marxianus</i> .....	35
Tabla 6. Características y secuencias de los <i>primers</i> diseñados para cada gen de las lipasas putativas de <i>K. marxianus</i> L-2029 .....	69
Tabla 7. Perfil de corte de enzimas de restricción para cada gen de las lipasas putativas .....	71
Tabla 8. Concentración y factor de integridad de cada muestra de ADN extraída de la cepa <i>K. marxianus</i> L-2029 .....	82
Tabla 9. Levaduras pertenecientes al cepario del Laboratorio de Bioquímica del Instituto Tecnológico de Morelia .....	116

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Acción hidrolítica de una lipasa sobre un triglicérido. R representa un ácido graso saturado o insaturado.....	5
Figura 2. Reacción de hidrólisis catalizada por una lipasa. R representa un ácido graso saturado o insaturado.....	6
Figura 3. Reacciones catalizadas por las lipasas, dependientes del sustrato.....	6
Figura 4. Plegamiento característico de las lipasas.....	7
Figura 5. Actividad lipásica de <i>K. marxianus</i> L-2029 a diferentes concentraciones de aceite de aguacate. ....	11
Figura 6. Porcentaje de uso de microorganismos para la expresión heteróloga de lipasas.....	16
Figura 7. Diseño metodológico.....	22
Figura 8. Estrategia metodológica para el análisis bioinformático de las lipasas extracelulares putativas de <i>K. marxianus</i> .....	26
Figura 9. Zona promotora y codificante de los genes de lipasas putativas extracelulares, LIP3 y YJR107W.....	31
Figura 10. Filogenia de las lipasas putativas de <i>K. marxianus</i> .....	39
Figura 11. Amplificación de los fragmentos en las regiones regulatorias y genes de LIP3 y YJR107W de <i>K. marxianus</i> L-2029.....	41
Figura 12. Región río arriba del gen codificante para las lipasas putativas LIP3 (A) y YJR107W (B) de <i>K. marxianus</i> L-2029.....	43
Figura 13. Modelo predicho por la herramienta SwissModel para la lipasa putativa extracelular <i>pLIP3</i> .....	45
Figura 14. Modelo predicho por la herramienta RaptorX para la lipasa putativa extracelular <i>pLIP3</i> ...	46
Figura 15. Modelo predicho por la herramienta Phyre2 para la lipasa <i>pLIP3</i> .....	47
Figura 16. Modelo predicho por la herramienta SwissModel para la lipasa <i>pYJR107W</i> .....	48
Figura 17. Modelo predicho por la herramienta RaptorX para la lipasa <i>pYJR107W</i> .....	48
Figura 18. Modelo predicho por la herramienta Phyre2 para la lipasa <i>pYJR107W</i> .....	49
Figura 19. Superposición de los modelos generados con el software Phyre2 para las lipasas putativas extracelulares de <i>K. marxianus</i> L-2029.....	51
Figura 20. Características estructurales del modelo tridimensional de la lipasa putativa extracelular <i>pLIP3</i> de <i>K. marxianus</i> L-2029.....	52

Figura 21. Características estructurales del modelo tridimensional de la lipasa putativa extracelular <i>pYJR107W</i> de <i>K. marxianus</i> L-2029..	53
Figura 22. Alineamiento de la estructura secundaria de los modelos de las lipasas putativas de <i>K. marxianus</i> L-2029 con los templados usados para su obtención	55
Figura 23. Estrategia metodológica para la identificación, clonación, transformación y producción de las lipasas extracelulares de <i>K. marxianus</i> L-2029	67
Figura 24. Características del vector <i>pYES2.1/V5-His-TOPO®</i>	73
Figura 25. ADN genómico extraído de la cepa <i>K. marxianus</i> L-2029.	82
Figura 26. Amplificación del gen de la lipasa LIP3 de <i>K. marxianus</i> L-2029 en gradiente de temperatura.	84
Figura 27. Digestión con enzimas de restricción del producto de PCR proveniente del gen LIP3	85
Figura 28. Amplificación del gen YJR107W de <i>K. marxianus</i> L-2029 en gradiente de temperatura	86
Figura 29. Digestión con enzimas de restricción del producto de PCR proveniente del gen YJR107W.	87
Figura 30. Amplificación con la enzima DreamTaq polimerasa de las lipasas putativas LIP3 y YJR107W para inserción en el vector <i>pYES2.1/V5-His-TOPO®</i>	88
Figura 31. Cultivo en medio sólido con marcador de selección (ampicilina) de colonias transformadas con el vector <i>pYES2.1/V5-His-TOPO®-a</i> construido con el gen LIP3, seleccionadas al azar.	90
Figura 32. Cultivo en medio sólido con marcador de selección (ampicilina) de colonias transformadas con el vector <i>pYES2.1/V5-His-TOPO®</i> construido con el gen YJR107W, seleccionadas al azar.	90
Figura 33. Cultivo en medio sólido con marcador de selección (ampicilina) de colonias transformadas con el vector <i>pYES2.1/V5-His-TOPO®</i> sin inserto.	91
Figura 34. Extracción de ADN de colonias de <i>E. coli</i> TOP10F' transformadas	92
Figura 35. Amplificación de los genes de lipasas extracelulares con el <i>primer</i> plasmídico V5	93
Figura 36. Colonias de <i>S. cerevisiae</i> BY4742 transformadas con los constructos de las lipasas putativas LIP3 y YJR107W.	94
Figura 37. Amplificación del gen de la lipasa putativa YJR107W con el <i>primer</i> plasmídico V5 de colonias transformadas de <i>S. cerevisiae</i> BY4742.	95
Figura 38. Concentración celular a través del tiempo durante la inducción con galactosa de las cepas transformadas de <i>S. cerevisiae</i> BY4742.	97
Figura 39. Actividad lipásica del extracto intracelular de colonias transformadas de <i>S. cerevisiae</i> BY4742.	98

Figura 40. Actividad lipásica del extracto extracelular de colonias transformadas de <i>S. cerevisiae</i> BY4742 .....	99
Figura 41. SDS-PAGE del extracto intracelular de la cepa <i>S. cerevisiae</i> BY4742 transformada con la lipasa <i>pYJR107W</i> de <i>K. marxianus</i> L-2029.....	103
Figura 42. SDS-PAGE del extracto extracelular concentrado de la cepa <i>S. cerevisiae</i> BY4742 transformada con la lipasa <i>pYJR107W</i> de <i>K. marxianus</i> L-2029 .....	103
Figura 43. Actividad lipásica a distinto pH del extracto extracelular obtenido de <i>S. cerevisiae</i> BY4742 transformada con la lipasa <i>pYJR107W</i> de <i>K. marxianus</i> L-2029. ....	105
Figura 44. Actividad lipásica dependiente de la temperatura del extracto extracelular obtenido de <i>S. cerevisiae</i> BY4742 transformada con la lipasa <i>pYJR107W</i> de <i>K. marxianus</i> L-2029. ....	105
Figura 45. Determinación cualitativa de actividad lipásica de 3 cepas pertenecientes al cepario del Laboratorio de Bioquímica del Instituto Tecnológico de Morelia .....	117

## I. RESUMEN

Las enzimas son moléculas producidas de forma natural por los diferentes organismos, de alto interés biotecnológico específicamente para diferentes áreas del desarrollo industrial, debido a su acción catalítica sobre una gran diversidad de reacciones químicas en los diferentes campos que componen esta actividad humana. Al ser biocatalizadores, tienen un fuerte impacto económico al reducir el uso de compuestos químicos de elevado valor y la generación de sustancias peligrosas para el medio ambiente. Por supuesto, su alta especificidad es una de las características más importantes de estas proteínas, ya que permiten eliminar pasos extra en la producción de cierto compuesto, y son susceptibles de mejorar sus rendimientos bajo las condiciones adecuadas.

Ejemplo claro de ello son las lipasas, enzimas que catalizan una amplia variedad de reacciones de hidrólisis, esterificación y transesterificación, y que han encontrado a últimos tiempos cabida en numerosos procesos tecnológicos dentro de la industria alimenticia, papelera, farmacéutica, y energética, por mencionar algunas. Su alta estabilidad química y resistencia a elevadas temperaturas, las hace candidatas para su aplicación en procesos de carácter biotecnológico emergentes.

Las lipasas son producidas por la mayoría de los organismos vivos, desde los unicelulares hasta los multicelulares. Se ha estudiado a detalle la producción de lipasas en una amplia gama de microorganismos, por las ventajas que representa el uso de estos organismos, específicamente entre las bacterias y los hongos. Sin embargo, la producción de estas enzimas para uso industrial se ha centrado solo en algunas especies, entre las que destacan las lipasas bacterianas, que sin embargo no son seguras por la patogenicidad que estos organismos presentan, por lo que se buscan alternativas que puedan resultar más económicas, eficientes y confiables.

En ese sentido, *Kluyveromyces marxianus* es una levadura no convencional con atractivas propiedades y características, que presenta actividad lipásica y en la cual se ha detectado la presencia de 8 lipasas putativas, aún sin ser caracterizadas cada una de ellas, por lo que resulta interesante estudiar las propiedades generales de cada una de ellas. Debido a que la actividad lipásica de *K. marxianus* ha sido detectada en extractos enzimáticos extracelulares, el enfoque del presente trabajo es el de estudiar a mayor detalle las lipasas putativas de carácter extracelular

de esta levadura, sumado a las ventajas que tiene la producción de enzimas extracelulares con respecto a aquellas sintetizadas de forma intracelular.

Una alternativa para la separación eficiente de enzimas es la expresión heteróloga de las mismas en microorganismos competentes, que puede ser útil para estudiar las características específicas de cada lipasa extracelular de *K. marxianus*. Así, el objetivo principal de este estudio es identificar las lipasas extracelulares y expresar heterológamente dichas enzimas provenientes de *K. marxianus* L-2029 en *Saccharomyces cerevisiae* BY4742, a fin de conocer sus características bioquímicas y estructurales.

PALABRAS CLAVE: Levadura no-convencional, Modelo Tridimensional, Filogenia, Sitio Activo, Oxianión, Actividad Lipásica

## II. SUMMARY

Enzymes are molecules naturally produced by different organisms, which possess high specific biotechnological interest for different areas of industrial development, due to their catalytic action on a great diversity of chemical reactions in the different fields that make up this human activity. Being biocatalysts, enzymes have a strong economic impact by reducing the use of high value chemicals and the consequent generation of dangerous substances for the environment. Its high specificity is one of the most important characteristics of these proteins, since they can eliminate several steps in the production of a certain compound, and they are capable of improving their yields under the right conditions.

A clear example of this are lipases, enzymes that catalyze a wide variety of hydrolysis, esterification and transesterification reactions, and which now they are used in various industrial processes within the food, paper, pharmaceutical, energy industry, and others. Its high chemical stability and resistance to high temperatures make them candidates for application in emerging biotechnological processes.

Lipases are produced by most living organisms, from single-celled to multicellular organisms. The production of lipases by a wide range of microorganisms has been studied, due to the advantages of the use of these organisms, specifically between bacteria and fungi. However, the biosynthesis of these enzymes for industrial use has focused only on some species, including bacterial lipases, which are not safe due to their pathogenicity. That is the reason for the searching of more economical, efficient and reliable alternatives.

*Kluyveromyces marxianus* is a non-conventional yeast with attractive properties and characteristics, which has a reported extracellular lipase activity; the presence of 8 putative lipases has been detected in its genome, although none of them has been characterized. Since the *K. marxianus* lipase activity has been detected in its extracellular enzymatic extracts, the focus of the present work is to study in greater detail the putative extracellular lipases of this yeast.

An alternative for the efficient separation and purification of enzymes is their heterologous expression in competent microorganisms, which may be useful for studying the specific characteristics of each putative extracellular lipase from *K. marxianus*. Thus, the main objectives of this study is to identify the putative extracellular lipases from *K. marxianus* L-

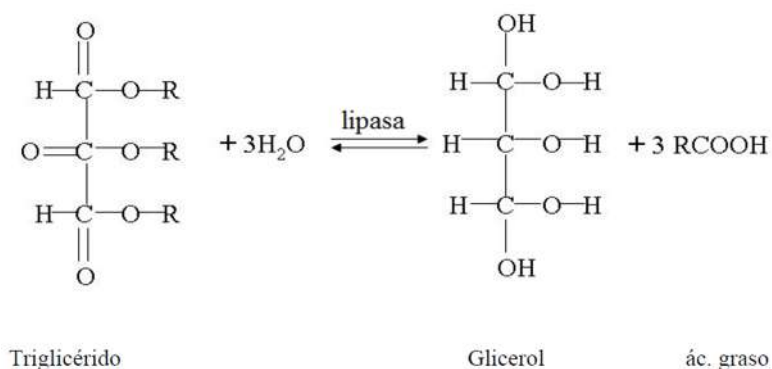
2029 and to expressed them in the heterologous system *S. cerevisiae* BY4742, in order to determine their biochemical and structural characteristics.



### III. INTRODUCCIÓN GENERAL

#### 3.1 LIPASAS

Las lipasas son serin-hidrolasas definidas como triacilglicerol acilhidrolasas (E. C. 3.1.1.3). Pertenecen a un grupo de enzimas hidrolíticas de triglicéridos para obtener como productos finales ácidos grasos libres y glicerol o sus productos intermedios como monoglicéridos o diglicéridos [Figura 1 (Alarcón, 2008; Casas-Godoy *et al.*, 2009)]. La característica diferencial de las lipasas con respecto a otras enzimas que también pueden hidrolizar ésteres como las esterasas es la necesidad de una interfase orgánico-acuosa para dicha función catalítica (Hasan *et al.*, 2009). Los sustratos propios de las lipasas son ésteres insolubles, necesitando la lipasa de dicha interfase para su activación, a partir de una adsorción inicial sobre la misma (Jaeger *et al.*, 1999). Así, las lipasas han sido definidas como enzimas capaces de hidrolizar esteres carboxílicos de acilglicerol de cadena larga (>10 átomos de carbono) (Casas-Godoy *et al.*, 2009).



**Figura 1. Acción hidrolítica de una lipasa sobre un triglicérido.** R representa un ácido graso saturado o insaturado.

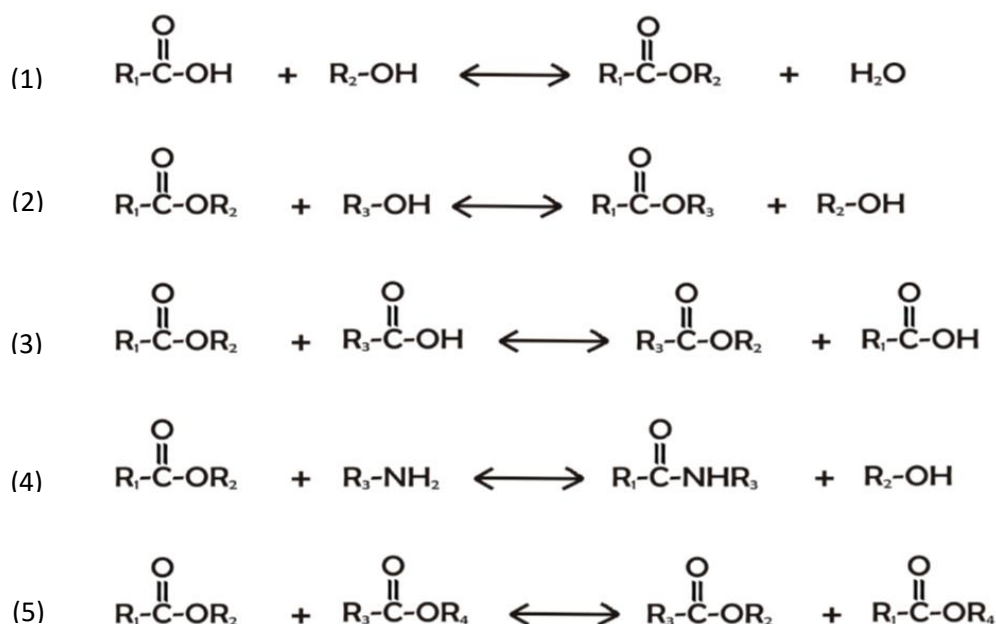
##### 3.1.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES

Las lipasas constituyen uno de los grupos más importantes de biocatálisis por sus amplias e importantes aplicaciones en la industria alimentaria, como la producción de grasas con propiedades físicas y químicas deseables, a diferencia de los procesos de hidrogenación y transesterificación química. Estas enzimas catalizan una amplia variedad de reacciones, como la hidrólisis parcial o total de triacilglicéridos (Figura 2) y reacciones de síntesis (Figura 3), que se clasifican en dos principales tipos de reacciones: esterificación y transesterificación (Casas-

Godoy *et al.*, 2009; Colla *et al.*, 2010). Esto les permite poseer una amplia variedad de aplicaciones, tales como la obtención, con un alto rendimiento, de ácidos grasos de elevada pureza a partir de aceites y grasas (Alarcón, 2008). Las lipasas también son capaces de expresar otras actividades extra: fosfolipasa, lisofosfolipasa, colesterol esterasa, cutinasa o amidasa (Svendsen, 2000). Las aplicaciones de las lipasas y las tendencias actuales en el estudio de las mismas se discuten en el anexo 10.2.



**Figura 2. Reacción de hidrólisis catalizada por una lipasa.** R representa un ácido graso saturado o insaturado (Tomado y modificado de Casas-Godoy *et al.*, 2009).



**Figura 3. Reacciones catalizadas por las lipasas, dependientes del sustrato.** (1) Esterificación, (2) alcoholólisis, (3) acidólisis, (4) aminólisis y, (5) interesterificación. R representa un ácido graso saturado o insaturado (Tomado y modificado de Casas-Godoy *et al.*, 2009).

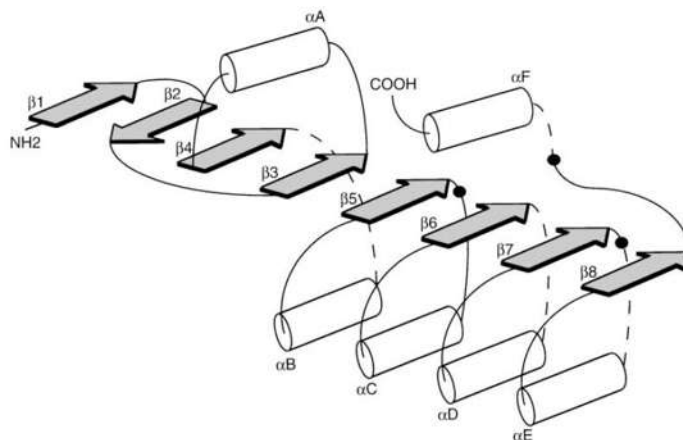
### 3.1.2 ESTRUCTURA

La primera estructura de una lipasa fue la obtenida para *Rhizomucor miehei* (Brady *et al.*, 1990). Las lipasas se caracterizan por un plegamiento  $\alpha/\beta$  y una triada catalítica conservada. La mayoría de las lipasas tienen un motivo consenso  $\text{GX}_1\text{SX}_2\text{G}$ . Otra característica importante en

la estructura de la lipasa es la presencia de una brecha oxianiónica, encargada de estabilizar el intermediario de la reacción mediante puentes de hidrógeno (Pleiss *et al.*, 2000). Actualmente, la base de datos LED (Lipase Engineering Database: [www.led.uni-stuttgart.de](http://www.led.uni-stuttgart.de); Fischer & Pleiss, 2003), clasifica a las lipasas en base a la conformación de su brecha oxianiónica en 3 grandes grupos: GGGX, donde se encuentran las lipasas del tipo de *Yarrowia lipolytica* y *C. rugosa*; GX, donde se ubican la mayoría de las lipasas de hongos filamentosos y del tipo de la lipasa B de *Candida antarctica*; y las de la clase Y, que son del tipo de la lipasa A de *C. antarctica*. La X representa el residuo X<sub>2</sub> de la secuencia consenso GX<sub>1</sub>SX<sub>2</sub>G. De acuerdo a su estructura y dependiendo de los residuos que conforman la brecha del oxianión las lipasas y estereasas se pueden agrupar en 15 superfamilias y 32 familias homólogas (Pleiss *et al.*, 2000).

La estructura tridimensional de las lipasas muestra un plegamiento  $\alpha/\beta$  característico de las enzimas hidrolíticas, como las proteasas. El plegamiento se compone generalmente de 8 láminas  $\beta$  centrales paralelas, con una antiparalela. Las láminas centrales están conectadas por hélices  $\alpha$  (Figura 4). La estructura de las lipasas difiere significativamente en longitud y arquitectura, de acuerdo a la amplia diversidad de sustratos usados por estas enzimas (Jaeger *et al.*, 1997).

La triada catalítica está conformada por un residuo de serina que actúa como nucleófilo, un residuo de aspartato o glutamato que conforma la parte ácida, y un residuo de histidina. En la estructura, la serina se encuentra en la lámina  $\beta$ 5, el aspartato o glutamato en  $\beta$ 7 y la histidina en el bucle después de  $\beta$ 8 (Brady *et al.*, 1990).



**Figura 4. Plegamiento característico de las lipasas.** Los residuos que componen el sitio activo se muestran como círculos negros (Tomado de Brady *et al.*, 1990).

El primer residuo de la brecha oxianiónica está localizada en N-terminal. Dos de los diferentes tipos de brecha oxianiónica dependen de la secuencia que rodea al primer residuo: GX y GGGX. La X representa el residuo X<sub>2</sub> de la secuencia consenso GX<sub>1</sub>SX<sub>2</sub>G. Además, se ha determinado que el tipo de oxianión determina la especificidad de sustratos: GX es usado comúnmente para sustratos de cadena media a larga, mientras GGGX es usada para sustratos de cadena corta. Las lipasas de hongos y levaduras poseen el motivo GX, siendo X un residuo de serina o treonina, y en ocasiones se reconoce un tercer aminoácido, correspondiente a asparagina o ácido aspártico (Pleiss *et al.*, 2000).

El estudio de la estructura de lipasas aisladas de *Candida rugosa*, llevó a la identificación de una cubierta sobre el sitio activo. Está compuesta de una o más hélices  $\alpha$ , unidas a la estructura base de la enzima por una estructura flexible. La cubierta es un elemento movable, que recubre o expone el sitio activo a una interfase agua-lípido, generando un cambio conformacional en la estructura de la enzima (Grochulski *et al.*, 1994; Brzozowski *et al.*, 2000).

El sitio activo está localizado en un hueco formado entre el plegamiento  $\beta$  central de la estructura. La superficie de este se compone de aminoácidos hidrofóbicos, que permiten su interacción con el sustrato. Se han determinado tres tipos de geometría del sitio de unión al sustrato: el primero tiene una hendidura hidrofóbica cercana a la superficie de la proteína; el segundo grupo tiene un tipo embudo como sitio de unión, mientras el tercero contiene un túnel (Pleiss *et al.*, 1998).

### 3.1.3 MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE LIPASAS

Las lipasas se encuentran en muchas especies de animales, plantas y microorganismos. Sin embargo, las lipasas microbianas son mucho más versátiles y presentan características interesantes como estabilidad en solventes orgánicos, actividad bajo diversas condiciones, alta especificidad de sustrato y amplia selectividad (Kempka *et al.*, 2008).

Los microorganismos con una alta capacidad para producir lipasas pueden ser encontrados en diferentes hábitats, principalmente en desechos o residuos de aceites vegetales empleados en la elaboración de frituras, industrias de productos lácteos, suelos contaminados con aceites y alimentos deteriorados. Se han aislado bacterias, hongos filamentosos y levaduras, entre los que sobresalen *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Staphylococcus*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Candida*, *Aspergillus*, *Penicillium* y *Geotrichum* spp. por su capacidad para producir lipasas

extracelulares, e incluso, son los más utilizados comercialmente en la producción industrial de lipasas (Ertuğrul *et al.*, 2007; Yadav *et al.*, 1998). En el anexo 10.3 se profundiza en las características estructurales y de actividad de las lipasas de origen fúngico. Las lipasas producidas por bacterias, por otro lado, se obtienen principalmente de *Chromobacterium viscosum*, *Pseudomonas cepacia*, *P. aeruginosa* (Zouaoui & Bouziane, 2012), *P. fluorescens*, *P. fragi*, *Bacillus thermocatenuatus*, *Staphylococcus hyicus*, *S. aerus*, *S. epidermis* y *Achromobacter* (Alarcón, 2008).

La producción de lipasas usando microorganismos depende en gran medida de factores ambientales, tales como la temperatura o pH, así como la composición del medio de fermentación: fuente de carbono, nitrógeno, concentración de sales inorgánicas, porcentaje de oxígeno disuelto, pudiendo estos factores alterar la actividad de la enzima. Las condiciones habitualmente utilizadas son: temperatura alrededor de los 30 °C, pH neutro y condiciones aerobias. La fuente de carbono usualmente es una fuente mixta compuesta por un glúcido y un lípido. Como fuente de nitrógeno se suele utilizar urea o sales inorgánicas de amonio (Alarcón, 2008; Akoh *et al.*, 2004). Es necesaria también la presencia de cationes metálicos, por lo general divalentes para estimular la inducción de lipasas, ya que juegan papeles importantes en la estructura y función de la enzima, particularmente  $Ca^{+2}$ ; aunque concentraciones altas de los mismos pueden tener un efecto inhibitorio (Verma *et al.*, 2012).

### **3.2 *Kluyveromyces marxianus***

*K. marxianus* es una levadura homotética, hemiascomiceta, filogenéticamente relacionada a *S. cerevisiae*, y muy cercana a la especie *K. lactis* (Lane *et al.*, 2011). La característica más representativa de estas dos levaduras pertenecientes al género *Kluyveromyces* es su capacidad para asimilar lactosa y utilizarla como fuente de carbono. Es por ello que puede ser aislada de diversos ecosistemas, entre ellos alimentos de consumo diario, como leches fermentadas, yogurt o queso (Lane & Morrissey, 2010).

Posee características deseables para diversas aplicaciones biotecnológicas: asimilan azúcares clave, tiene una tasa de crecimiento rápida, con tiempo de duplicación aproximado de 70 minutos, es termotolerante, con la habilidad de crecer hasta 52° C, y tiene una alta capacidad secretoria (Jeong *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2013; Lertwattanasakul *et al.*, 2015). Tradicionalmente se ha reconocido como una levadura haploide, aunque algunos datos sugieren la posibilidad de

ser diploide. Puede generar energía por fosforilación oxidativa o por fermentación a etanol (Lane & Morrissey, 2010). Comercialmente, las aplicaciones más importantes son en la producción de enzimas nativas, como inulasa,  $\beta$ -galactosidasa y pectinasas; otras aplicaciones que se encuentran en estado de investigación para esta levadura, son en la producción de compuestos de aroma, etanol, reducción del contenido de lactosa en productos alimenticios, producción de ingredientes del suero de queso, biorremediación, etc. (Fonseca *et al.*, 2008; Lertwattanasakul *et al.*, 2015).

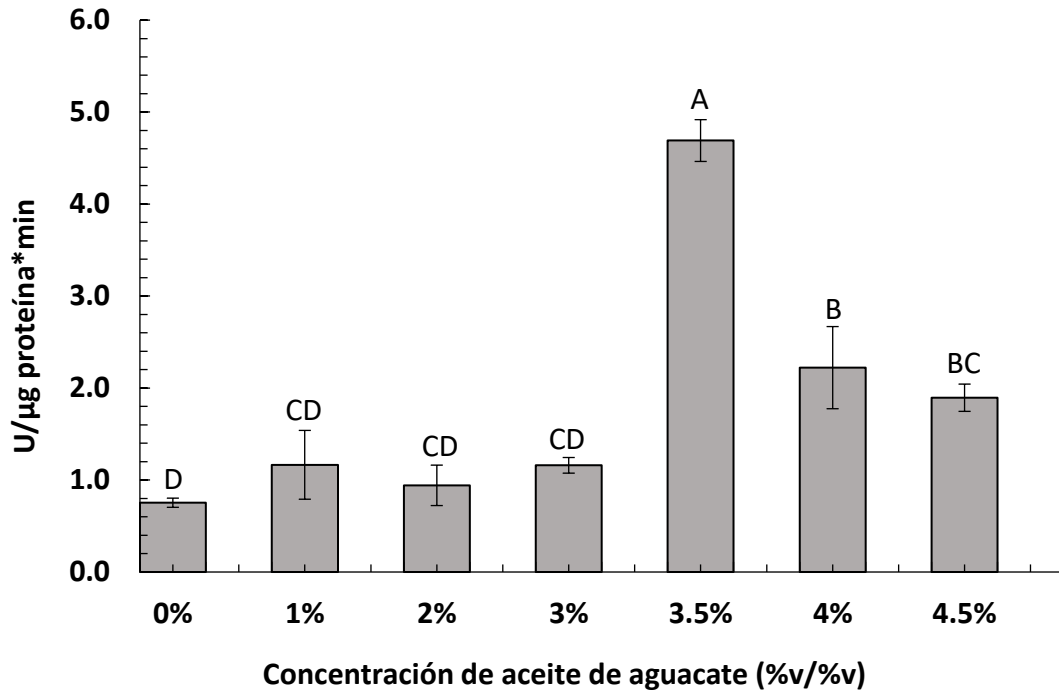
### 3.2.1 ANTECEDENTES DE LA ACTIVIDAD LIPÁSICA DE *K. marxianus*

Existen pocos reportes del estudio de las lipasas producidas por *K. marxianus* (Deive *et al.*, 2003; Stergiou *et al.*, 2012). En ambos casos se reporta la inducción de lipasas extracelulares utilizando diferentes sustratos, y determinando al aceite de oliva como el mejor inductor, por su alto contenido de ácido oleico. La actividad enzimática obtenida en ambos estudios se discute en la sección de resultados.

Recientemente, la actividad lipásica de la cepa *K. marxianus* L-2029 fue detectada por nuestro grupo de trabajo, cuya inducción de la síntesis de lipasas fue usando aceite de aguacate, el cual tiene un alto contenido de ácido oleico y otros ácidos grasos de cadena larga, en forma de triglicéridos (USDA, 2011). En dicho estudio se evaluó la actividad lipásica del extracto enzimático extracelular a diferentes concentraciones de aceite de aguacate como sustrato para la levadura (Figura 5); resultado del mismo, se determinó que la concentración de 3.5 % v/v de aceite, es la que mejor promueve la síntesis de lipasas y su actividad. Además, se determinó que la temperatura óptima del extracto enzimático es de 36° C, a un pH de 6 (para más información, consultar anexo 10.4).

### 3.2.2 ANTECEDENTES MOLECULARES DE *K. marxianus*

Debido a las características de la levadura no convencional *K. marxianus*, a las ventajas metabólicas que tiene sobre la cepa relacionada *K. lactis*, y su cercanía con *S. cerevisiae*, esfuerzos se han hecho por obtener la secuencia completa de su genoma de diferentes líneas celulares: *K. marxianus var. marxianus* KCTC 17555 (Jeong *et al.*, 2012), *K. marxianus* DMB1 (Suzuki *et al.*, 2014), *K. marxianus* NBRC1777 (Inokuma *et al.*, 2015) y *K. marxianus* DMKU 3-1042 (Lertwattanasakul *et al.*, 2015).



**Figura 5. Actividad lipásica de *K. marxianus* L-2029 a diferentes concentraciones de aceite de aguacate.** Letras diferentes indican diferencia significativa a un nivel de significancia  $\alpha=0.05$ ;  $n=3$ .

Lertwattanasakul *et al.*, (2015) determinaron que el genoma de *K. marxianus* DMKU 3-1042 está dividido en 8 cromosomas con un tamaño entre 0.9 y 1.7 Mb y un genoma mitocondrial de 46 kb. Existen aproximadamente 4,952 genes, con un exón en la mayoría de los casos. El tamaño promedio de cada gen es de 1.5 kb, que codifican para proteínas con una longitud de 501 aminoácidos en promedio. Los mismos autores realizaron un análisis comparativo contra levaduras como *K. lactis* y *S. cerevisiae*, encontrando 4,676 genes compartidos con *K. lactis* y 3,853 con *S. cerevisiae*.

### 3.2.3 LIPASAS PUTATIVAS DE *K. marxianus*

Tomando como referencia el genoma secuenciado de la cepa *K. marxianus* DMKU 3-1042 (Lertwattanasakul *et al.*, 2015), se hizo una búsqueda de probables secuencias codificantes para lipasas en la base de datos del Centro Nacional para la Información en Biotecnología (NCBI, por sus siglas en inglés); se detectaron 8 lipasas putativas en el genoma en cuestión. Posteriormente, se hizo una búsqueda de las lipasas específicas, cuyos números de acceso se

muestran en la Tabla 1. Las lipasas putativas, adquieren sus nombres codificados a partir de la comparación con secuencias de gran similitud, provenientes de otros microorganismos cuyo genoma es conocido. Además, esta búsqueda permitió determinar la longitud del gen de cada una de las lipasas enumeradas en la Tabla 1, así como la probable longitud de la proteína. Por otra parte, puede observar que solo en 4 de los 8 cromosomas que posee *K. marxianus*, se encuentra la presencia de genes codificantes para estas enzimas putativas; en el cromosoma 1 se ubican los genes codificantes para las lipasas LIP2, LIP3 y LIP5; por su parte, en el cromosoma 3 se ubican los genes ATG15 y YOR059C; en el cromosoma 4 solamente se encuentra la presencia del gen YDR444W; finalmente, en el cromosoma 6 se encuentra la información genética de los genes codificantes para las lipasas putativas YJ107W y ROG1.

Existe evidencia de la presencia de la lipasa putativa YJR107W en *Saccharomyces cerevisiae* (Tabla 2), en cuyo organismo es denominada Lih1, pero se encuentra codificada bajo el mismo nombre (Galibert *et al.*, 1996).

**Tabla 1. Características generales de las lipasas putativas de *K. marxianus***

Clave	Tamaño	Ubicación (cromosoma)	Número de acceso
YJR107W	389 aa	6	BAO41717.1
ATG15	544 aa	3	BAO39800.1
ROG1	682 aa	6	BAO41305.1
YDR444W	636 aa	4	BAO40608.1
YOR059C	472 aa	3	BAO39555.1
LIP2	394 aa	1	BAO37746.1
LIP3	593 aa	1	BAO38130.1
LIP5	773 aa	1	BAO38024.1

Se ha reconocido la presencia de la lipasa putativa ATG15 también en *S. cerevisiae*, y en otras levaduras relacionadas como *Schizosaccharomyces pombe* (Sun *et al.*, 2013), formando parte del grupo denominado Atg, proteínas que están ligadas directamente al proceso de formación del autofagosoma, y el posterior proceso de autofagia (Mizushima *et al.*, 2011). En el caso específico de ATG15, se ha identificado su función de lisis de las vesículas transportadas a la vacuola durante el proceso de autofagia; además, es necesaria para la degradación de otros



cuerpos intracelulares y la degradación de lípidos neutros en los almacenamientos de lípidos (Epple *et al.*, 2001, 2003; Maeda *et al.*, 2015).

Otras de las lipasas putativas reconocidas en *S. cerevisiae* es ROG1, la cual se ha sugerido que es una monoacilglicerol lipasa que participa en la homeostasis de lípidos (Varthini *et al.*, 2015). La base de datos UNIPROT ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)) ha determinado una alta similitud en la secuencia de la lipasa codificada como ROG1 respecto a la lipasa YDR444W, sin haber reportes específicos de esta última. Athenstaedt & Daum (2003) detectaron algunos polipéptidos que contienen el motivo del sitio activo de las lipasas en el genoma de *S. cerevisiae*, entre los que se mencionan a YDR444W; además, los mismos autores encontraron la presencia de polipéptidos con el motivo característico de las lipasas formando parte de las proteínas relacionadas a las partículas lipídicas en esta levadura, donde tendría presencia la lipasa YOR059C. La última, más tarde fue comprobada en *S. cerevisiae* como una fosfolipasa relacionada a las partículas lipídicas, que juegan un papel importante en la morfología de las mismas, siendo renombrada como LPL1 (Selvaraju *et al.*, 2014).

En el caso de las lipasas codificadas como LIP (LIP2, LIP3 y LIP5), se hizo un análisis Blast en la base de datos del NCBI, a fin de determinar similitud con lipasas provenientes de otros organismos (Tabla 2). Al igual que las lipasas putativas mencionadas anteriormente, las tres lipasas tuvieron una alta identidad con lipasas intracelulares de *S. cerevisiae*, específicamente con aquellas del grupo TGL, que participan en el metabolismo de lípidos en dicha levadura, especialmente para la liberación de esfingolípidos y fosfolípidos que posteriormente serán usados para la producción de energía (Rajakumari *et al.*, 2010). En el caso de LIP2, la mayor similitud sería con la enzima TGL2, que aparentemente está ligada a la hidrólisis de ácidos grasos de cadena larga en la mitocondria (Ham *et al.*, 2010): el mayor porcentaje de identidad de la lipasa LIP3 de *K. marxianus*, fue con la enzima TGL3 de *S. cerevisiae*, cuya actividad se encuentra restringida a las partículas lipídicas usadas como reserva de energía (Schmidt *et al.*, 2013); finalmente, LIP5 presenta una alta similitud a las proteínas TGL4 y TGL5.

**Tabla 2. Lipasas con porcentaje más alto de identidad relacionadas a las lipasas putativas de *K. marxianus***

Clave	Lipasa de referencia	Especie	Identidad (%)	Número de acceso	Descripción	Referencia
YJR107W	YJR107W	<i>S. cerevisiae</i> JAY291	84	GAX70492	Función no determinada (Lih1)	(Meunchan <i>et al.</i> , 2015)
ATG15	Atg15p	<i>S. cerevisiae</i> YJM453	51	AJQ35479	Ligada al proceso de autofagia y degradación de lípidos	(Maeda <i>et al.</i> , 2015)
ROG1	Rog1p	<i>S. cerevisiae</i> YJM1615	50	AJS08980	Participa en la homeostasis de lípidos	(Varthini <i>et al.</i> , 2015)
YDR444W	YDR44W	<i>S. cerevisiae</i> Lalvin QA23	50	EGA83296	Alta similitud a ROG1	(Athenstaedt & Daum, 2005)
YOR059C	YOR059C	<i>S. cerevisiae</i> VIN7	42	EHN00270	Fosfolipasa que mantiene la morfología de partículas L	(Selvaraju <i>et al.</i> , 2014)
LIP2	Tgl2p	<i>S. cerevisiae</i> YJM1386	54	AJU99864	Liberación de esfingolípidos y fosfolípidos de partículas lipídicas	(Rajakumari <i>et al.</i> , 2010)
LIP3	Tgl3p	<i>S. cerevisiae</i>	56	XP018220361		(Ham <i>et al.</i> , 2010)
LIP5	Tgl4p	<i>S. cerevisiae</i> YJM453	62	AJS53282		(Schmidt <i>et al.</i> , 2013)

### 3.2.4 VENTAJAS DE LA SÍNTESIS DE LIPASAS EXTRACELULARES DE *K. marxianus*

El estudio de la actividad lipásica extracelular y de lipasas del mismo carácter es más común que el de lipasas intracelulares. Esto en principio, es lógico si se toma en consideración la etapa extra de purificación de las lipasas extracelulares, para lisar las células y recuperar la proteína intracelular total, para el aislamiento posterior de la lipasa de interés. Esto por supuesto, conlleva una disminución en el porcentaje de recuperación de la enzima intracelular y, por consiguiente, el estudio de la misma. La misma razón complica más aún pensar en producir una lipasa de carácter intracelular a larga escala.

Otra razón menos aparente es la estabilidad que tienen las enzimas extracelulares con respecto a las intracelulares. Mientras las lipasas intracelulares tienen una función específica en un ambiente que se mantiene siempre a las mismas condiciones, las lipasas extracelulares están sujetos a diferentes cambios repentinos en el medio en el que son capaces de catalizar reacciones: diferencias de pH, cambios de temperatura, sustrato que se va a hidrolizar, presión hidrostática, etc. Por ello, la conformación de las lipasas extracelulares debe incluir sistemas de

protección a estos cambios tan bruscos, como son algunas modificaciones postraduccionales (formación de puentes S-S, glucosilaciones, etc.). Así, las enzimas extracelulares tienen una mayor estabilidad que lo que pueden tener las enzimas intracelulares.

En efecto, las lipasas intracelulares en levaduras, principalmente se encuentran asociadas al metabolismo de ácidos grasos de reserva, que se encuentran en los cuerpos lipídicos de almacenamiento que normalmente forman este tipo de organismos. Ejemplo de ello son las lipasas Tgl, mencionadas anteriormente, y que se han estudiado en levaduras como *S. cerevisiae* y *Y. lipolytica* (Dulermo *et al.*, 2013).

Así, sería importante conocer primero las características de las lipasas extracelulares provenientes de *K. marxianus*, ya que aparentemente sus lipasas intracelulares se encuentran relacionadas a procesos específicos y podrían ser menos estables para su estudio.

### **3.3 PRODUCCIÓN DE LIPASAS RECOMBINANTES**

Debido a la disponibilidad de las lipasas microbianas, estas son preferidas a aquellas derivadas de animales y plantas; sin embargo, las estrategias de purificación tradicionales a partir del medio de cultivo donde el microorganismo sintetiza tales enzimas tienen una gran cantidad de desventajas, que incluyen la no reproducibilidad y bajos rendimientos. Además, las enzimas microbianas nativas no siempre son aptas para procesos biocatalíticos. El desarrollo de técnicas moleculares para la producción de proteínas recombinantes heterólogas en un sistema externo, ha ayudado a superar estas limitantes, permitiendo una expresión alta y de enzimas rediseñadas con propiedades catalíticas mejoradas (Borrelli & Trono, 2015).

La expresión heteróloga ha permitido incrementar la reproducibilidad y los rendimientos en la producción de enzimas, que son los principales obstáculos a escala industrial. Además, la expresión heteróloga ha permitido la producción de enzimas nativas que son sintetizadas por microorganismos que no pueden crecer fácilmente por los métodos tradicionales de cultivo. Otra ventaja importante de la expresión heteróloga es la posibilidad de producir enzimas modificadas a partir de la manipulación del gen que codifica para una enzima específica, produciendo lipasas con mayor estabilidad y selectividad, con una alta eficiencia en su actividad (Borrelli & Trono, 2015).

La producción de lipasas a escala industrial en su forma nativa, tiene distintas desventajas: el organismo productor tiene que crecer en la presencia de una fuente de carbón; tomando en

cuenta que la mayoría de los organismos productores de lipasas son aeróbicos, un medio de cultivo complejo se tiene que usar. Además, microorganismos como las levaduras y los hongos en particular, por lo general producen diferentes lipasas o isoformas que tienen diferente comportamiento catalítico. Para purificar una sola isoforma de una mezcla de ellas, se ocupan procesos caros y con alto consumo de tiempo. Las muestras comerciales por lo general son una mezcla de isoformas, lo que resulta en efectos secundarios y usos irreproducibles.

### 3.3.1 SISTEMAS USADOS PARA LA EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE LIPASAS

Con el fin de conocer los sistemas más utilizados en la expresión heteróloga de lipasas, Borrelli & Trono (2015) realizaron una búsqueda en Scopus y la Web ISI del Conocimiento. Los resultados revelaron que *E. coli* es el sistema más utilizado para la expresión heteróloga de lipasas, mientras, entre levaduras y hongos, *Pichia pastoris* tiene ventaja (Figura 6).

La ventaja del uso de *E. coli*, es su facilidad de manejo, tiempos de crecimiento corto y un alcance de densidad celular en medios sencillos. Debido al conocimiento que se tiene de este sistema, un gran número de vectores de clonación y cepas mutantes se han creado. La desventaja de este sistema para la expresión de una lipasa de origen eucariote, es la inhabilidad para realizar modificaciones postraduccionales, como el apropiado plegamiento, fosforilación o glicosilación, o la correcta formación de puentes disulfuro (Borrelli & Trono, 2015).

A pesar de ello, algunas lipasas del género *Candida* se han expresado en *E. coli*; como era de esperarse, el sistema se ha utilizado con mayor frecuencia para la expresión heteróloga de otras bacterias como *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Serratia* y *Burholderia*.

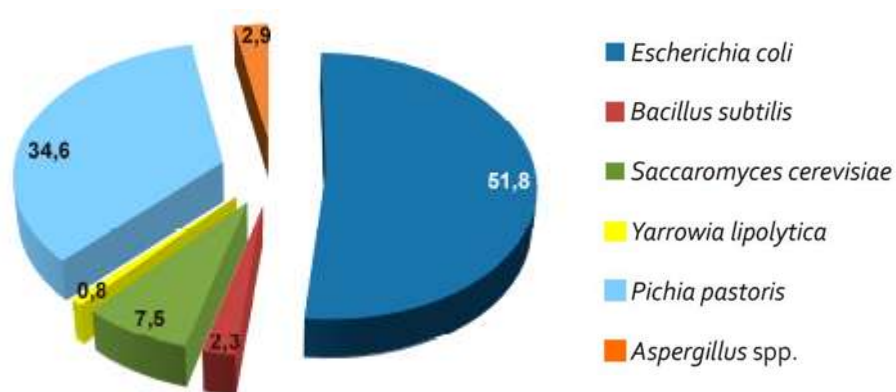


Figura 6. Porcentaje de uso de microorganismos para la expresión heteróloga de lipasas

Dentro de los sistemas eucariotes, usados para la expresión heteróloga, se encuentra *S. cerevisiae*. En primera instancia resultaba una buena alternativa debido al alto conocimiento que se tiene de su genoma y fisiología, así como su clasificación como segura (GRAS). Las lipasas que se han expresado en este sistema principalmente pertenecen al género *Candida* y a algunas cepas del género *Rhizopus*.

*P. pastoris* ha sido el sistema más usado para la expresión heteróloga de diversas proteínas recombinantes comercialmente relevantes. Este sistema alcanza altos niveles de expresión y no produce el fenómeno de hiperglicosilación encontrado en *S. cerevisiae*. La principal característica de esta levadura es que puede utilizar el metanol como única fuente de carbono y energía, induciendo así una alta expresión de una proteína recombinante. Como la mayoría de las levaduras metilotróficas secreta bajas cantidades de sus propias proteínas, eliminando la competencia con proteínas extracelulares recombinantes como las lipasas. Ha sido utilizado para la expresión de lipasas de levaduras provenientes de *Candida*, *Rhizopus*, *Yarrowia*, *Aspergillus*, *Rhizomucor* y *Thermomyces* (Borrelli & Trono, 2015).

### 3.3.1.1 CARACTERÍSTICAS DE *S. cerevisiae* COMO SISTEMA DE EXPRESIÓN

La primera levadura utilizada para la expresión heteróloga de proteínas recombinantes fue *S. cerevisiae*, probablemente por la gran cantidad de información acerca de su fisiología y genética (Gellissen & Hollenberg, 1997). El genoma de *S. cerevisiae* ha sido completamente secuenciado. Se compone de 12068 kilobases con la presencia de 5885 genes potenciales codificantes para proteínas, aproximadamente 140 genes específicos para RNA ribosomal, entre otros. Este contenido genómico se encuentra organizado en 16 cromosomas (Goffeau *et al.*, 1996). Las lipasas en esta levadura, representan el 7.6 % de todas las lipasas recombinantes (Figura 6). Las lipasas expresadas heterológicamente en esta levadura, incluyen principalmente aquellas provenientes del género *Candida* y hongos filamentosos del género *Rhizopus* (Borrelli & Trono, 2015).

La expresión de proteínas en *S. cerevisiae*, sin embargo, sufre ciertas limitaciones, entre las que destacan la inestabilidad de plásmidos, bajos rendimientos de producción de proteínas en presencia de promotores fuertes, baja capacidad secretoria y la hiperglicosilación de los productos (Casas-Godoy *et al.*, 2009). Esta es la razón por la cual se han buscado sistemas alternativos no convencionales como sistemas de expresión.

La levadura por sí misma, produce lipasas para la degradación de lípidos y su aprovechamiento. Estas se localizan intracelularmente en los compartimentos lipídicos que generan este tipo de levaduras (Grillitsch & Daum, 2011). La primera lipasa estudiada de dicho sistema, fue Tgl3p, que fue detectada en dichos compartimentos, presentando actividad lipásica y una baja especificidad (Athenstaedt *et al.*, 1999). Dos lipasas adicionales se han aislado a partir de esta levadura, Tgl4p y Tglp5 (Athenstaedt & Daum, 2005; Kurat *et al.*, 2006); estas comparten una homología con Tgl30 del 30 % y 26 %, respectivamente. A pesar de no ser tan estudiadas las lipasas extracelulares de *S. cerevisiae*, se ha reportado la síntesis de las mismas con anterioridad, específicamente en la cepa DSM1848, que ha producido un máximo de actividad de 3 U/mL, y se ha determinado que dicha actividad está asociada al crecimiento de la levadura (Shirazi *et al.*, 1998).

Ante la falta de plásmidos estables y de altos rendimientos en el sistema, diversas construcciones se han realizado para incrementar los rendimientos, bajo la acción de diversos promotores. El más utilizado ha sido el promotor del gen GAL1, fuertemente regulado por la galactosa, y forma parte de un conjunto de genes inducibles por dicho sustrato. Una ventaja del uso de tal promotor, es su fuerte represión en la presencia de glucosa, lo que lo hace importante en procesos de crecimiento celular e inducción del producto de interés (West *et al.*, 1984).

### 3.4 JUSTIFICACIÓN

Las lipasas son enzimas de elevada importancia industrial debido a la gran variedad de reacciones que son capaces de biocatalizar, su especificidad y estabilidad química y térmica. A pesar de que se ha reportado su producción por una gran variedad de microorganismos, las lipasas que son comercializadas se limitan a las obtenidas por unas cuantas especies. Sin embargo, en muchas ocasiones los extractos enzimáticos obtenidos a partir de un microorganismo realmente son una mezcla de isoformas o lipasas con diferente actividad.

Tal es el caso del extracto lipásico obtenido a partir de la levadura no convencional *K. marxianus*, cuando la síntesis de las mismas se induce con algún agente lipídico, ya que se ha reconocido la presencia de hasta 8 lipasas putativas en tal microorganismo. Ante la falta de información de las propiedades bioquímicas de las lipasas putativas de esta levadura, actualmente en el grupo de trabajo se ha caracterizado el extracto enzimático obtenido por inducción con aceite de aguacate, un recurso de amplia presencia en el estado de Michoacán, al

ser el primer productor a nivel no sólo nacional sino también internacional; además, se busca la purificación y caracterización de aquellas enzimas con actividad lipásica presentes en el mismo. Aunado a ello, se utilizará una cepa nativa del estado de Michoacán, aislada de fermentaciones espontáneas para la producción de mezcal, identificada como *K. marxianus* L-2029.

Una clara alternativa para la purificación y caracterización de las lipasas producidas por microorganismos, es la síntesis recombinante en organismos aptos para dicho fin. En el caso de las lipasas producidas por levaduras, existe una variedad de alternativas para la obtención de dichas enzimas extracelulares; en nuestro caso, se seleccionó el sistema *S. cerevisiae*, por la cercanía filogenética y alta similitud metabólica que mantiene con la levadura no convencional *K. marxianus*, pero que además no presenta actividad lipásica extracelular.

Así, el objetivo principal de este estudio es identificar las lipasas extracelulares y expresar heterológamente dichas enzimas provenientes de *K. marxianus* en un sistema heterólogo a seleccionar, a fin de conocer sus características bioquímicas y estructurales.

## **IV. PLANTEAMIENTO DE HIPÓTESIS**

### **4.1 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Qué diferencias presentan las lipasas extracelulares recombinantes de *K. marxianus* L-2029 expresadas heterológamente, con respecto a las lipasas sintetizadas naturalmente e identificadas en el extracto lipásico extracelular?

### **4.2 HIPÓTESIS**

Las lipasas extracelulares recombinantes de *K. marxianus* L-2029, obtenidas mediante expresión heteróloga, conservan todas las propiedades bioquímicas que les confieren relevancia industrial.



## V. OBJETIVOS

### 5.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar las propiedades bioquímicas de las lipasas extracelulares recombinantes de *K. marxianus* L-2029, expresadas heterológamente en *S. cerevisiae* BY4742.

### 5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Analizar las características generales de las lipasas putativas de *K. marxianus* a partir de las secuencias de las mismas.
- 2) Determinar la relación filogenética y estructural de las lipasas putativas de *K. marxianus* respecto a otras lipasas provenientes de diferentes organismos.
- 3) Predecir la estructura probable de las lipasas extracelulares de *K. marxianus*.
- 4) Identificar las lipasas putativas extracelulares de *K. marxianus* presentes en la cepa L-2029.
- 5) Determinar la actividad lipásica de las lipasas extracelulares de *K. marxianus* L-2029, expresadas heterológamente en *S. cerevisiae*.

## VI. RESULTADOS

El proyecto se dividió en 2 etapas (Figura 7), cuyos resultados se muestran en los siguientes apartados.

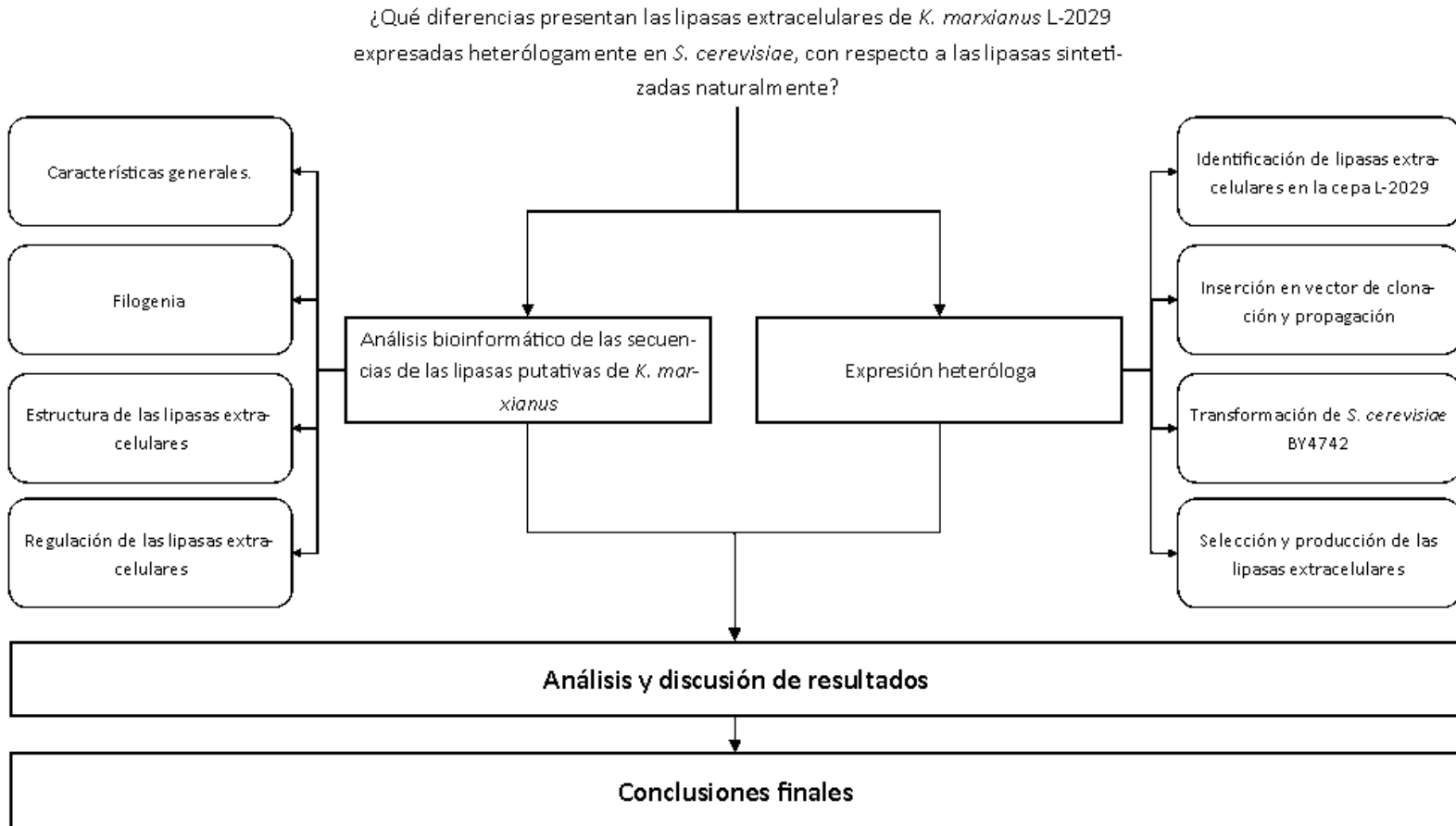


Figura 7. Diseño metodológico

## 6.1 CAPÍTULO I: ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LAS LIPASAS EXTRACELULARES DE *K. marxianus* L-2029

### 6.1.1 RESUMEN

Las lipasas son enzimas hidrolíticas que rompen los enlaces éster de los triglicéridos, generando ácidos grasos libres y glicerol, u otras moléculas intermediarias. Se ha reportado la actividad extracelular lipásica de la levadura no convencional *K. marxianus* cultivada usando aceite de oliva como sustrato, y se ha identificado la presencia de por lo menos ocho lipasas putativas en su genoma. Sin embargo, a la fecha no se cuenta con evidencia experimental sobre el papel fisiológico de las posibles enzimas, su expresión en distintas condiciones de cultivo, y sus diferencias estructurales y catalíticas. En este trabajo se realizó un análisis bioinformático de los genes descritos como lipasas en *K. marxianus*, identificando y caracterizando particularmente las enzimas extracelulares, debido a su relevancia biotecnológica. La secuencia de aminoácidos de las ocho lipasas putativas, obtenida mediante la traducción *in silico*, osciló entre los 389 y los 773 aminoácidos. En dos de las proteínas analizadas se identificó un péptido señal de 25 aminoácidos para *pYJR107W* y de 33 aminoácidos para *pLIP3*, y dichas enzimas presentaron un peso molecular de 44.53 y 68.23 KDa, respectivamente. El alineamiento de la secuencia de aminoácidos de *pLIP3* y *pYJR107W* con las lipasas cristalizadas de la lipasa patatina y la lipasa *LIP2* de *Y. lipolytica*, respectivamente, mostró la presencia de los motivos característicos de las hidrolasas. A partir de los modelos 3D de las lipasas extracelulares, se determinó el pentapéptido conservado de cada una, siendo GTSMG para *pLIP3*, y GHSLG para *pYJR107W*; además, los genes de estas dos enzimas parecen estar regulados por elementos de respuesta al oleato (ORE). El análisis filogenético de todas las lipasas presentes en *K. marxianus* reveló afinidades evolutivas con lipasas de las familias abH15.03, abH23.01 y abH23.02, principalmente.

### ABSTRACT

Lipases are hydrolytic enzymes that break the ester bonds of triglycerides, generating free fatty acids and glycerol, or other intermediary molecules. Extracellular lipase activity has been reported for the non-conventional yeast *K. marxianus*, grown in olive oil as a substrate, and the presence of at least eight putative lipases has been detected in its genome. However, to date, there is no experimental evidence on the physiological role of the possible enzymes, nor their structural and

catalytic properties. In this study, a bioinformatic analysis of the genes described as lipases in *K. marxianus* L-2029 was performed, particularly identifying and characterizing the extracellular enzymes, due to their biotechnological relevance. The amino acid sequence of the eight lipases, obtained by in silico translation, ranged between 389 and 773 amino acids. Two of the analyzed proteins showed a signal peptide, 25 and 33 amino acids long for *pYJR107W* and *pLIP3*, and a molecular weight of 44.53 and 58.23 KDa, respectively. The amino acid alignment of *pLIP3* and *pYJR107W* with the crystallized lipases from a patatin and the LIP2 lipase from *Y. lipolytica*, respectively, revealed the presence of the hydrolase's characteristic motifs. From the 3D models of extracellular *K. marxianus* L-2029 lipases, the conserved pentapeptide of each was determined, being GTSMG for *pLIP3*, and GHSLG for *pYJR107W*; besides, the genes of these two enzymes are apparently regulated by oleate response elements (ORE). The phylogenetic analysis of all *K. marxianus* lipases revealed evolutionary affinities with lipases from mainly abH15.03, abH23.01, and abH23.02 families.

### 6.1.2 INTRODUCCIÓN

Las lipasas se definen con triacilglicerol éster hidrolasas (E. C. 3.1.1.3), capaces de hidrolizar ésteres carboxílicos de acilglicerol de cadena larga, lo que las distingue de las estereasas (Casas-Godoy *et al.*, 2009). Las lipasas son enzimas hidrolíticas que catalizan una gran variedad de reacciones, tienen altos rendimientos, relativa facilidad de manipulación genética, son estructuralmente estables en solventes orgánicos, son independientes de cofactores, catalizan reacciones utilizando una amplia variedad de sustratos y tienen una alta enantioselectividad (Tan *et al.*, 2015). Son un grupo de enzimas con alta importancia industrial, ya que a nivel comercial se consideran el tercer grupo en volumen de venta, después de las proteasas y las amilasas (Borrelli & Trono, 2015).

A pesar de que se ha reportado la producción y aplicación de lipasas por una gran variedad de microorganismos, cobra relevancia la síntesis de las mismas por parte de levaduras consideradas como seguras, respecto a la mayoría de procedencia bacteriana.

*K. marxianus* es una levadura homotética, hemiascomiceta, filogenéticamente relacionada a *S. cerevisiae* (Lane *et al.*, 2011), de la cual se ha reportado actividad lipásica. *K. marxianus* es capaz de asimilar lactosa y utilizarla como fuente de carbono, por lo que ha sido aislada de alimentos de consumo diario, como leches fermentadas, yogurt o queso; además, posee características deseables

para diversas aplicaciones biotecnológicas: puede generar energía por fosforilación oxidativa o por fermentación a etanol (Lane & Morrissey, 2010), tiene una tasa de crecimiento rápida, con tiempo de duplicación aproximado de 70 minutos, es termotolerante, con la habilidad de crecer hasta 52° C, y tiene una alta capacidad secretoria de enzimas (Jeong *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2013; Lertwattanasakul *et al.*, 2015).

La actividad lipásica de *K. marxianus* fue reportada por primera vez por Deive *et al.* (2003), los cuales indujeron la síntesis de lipasas con varios sustratos, de los cuales el ácido oleico y tributirina fueron detectados como los mejores inductores. Por su parte, Stergiou *et al.* (2012), estudiaron la influencia del pH y la temperatura sobre la síntesis de lipasas extracelulares

A pesar de conocer la actividad enzimática de lipasas por parte de la levadura no convencional *K. marxianus*, a partir de la caracterización del extracto extracelular en los estudios antes mencionados, existe un déficit de información acerca de las enzimas con actividad lipásica que sintetiza esta levadura y las propiedades de las mismas. Más aún, cobra mayor importancia conocer las propiedades de las lipasas extracelulares probables que sintetiza *K. marxianus*, por las ventajas que mantiene su producción respecto a las enzimas intracelulares. En este sentido, Lertwattanasakul *et al.* (2015) secuenciaron el genoma de la cepa *K. marxianus* DMKU 3-1042 y realizaron el análisis transcripcional por sitio de inicio (TSS) Seq del mismo; dicho análisis permitió conocer algunas características de la levadura relacionadas a su termotolerancia, amplia capacidad de bioconversión y producción de proteínas recombinantes.

Tomando como referencia la información obtenida a partir del transcriptoma de la levadura *K. marxianus* DMKU 3-1042, el objetivo de la presente etapa del proyecto fue detectar la presencia de las lipasas putativas de esta levadura y analizar la secuencia de los genes que codifican para las mismas, a fin de conocer más a detalle sus probables características y propiedades, mediante el uso de diferentes herramientas bioinformáticas, y haciendo énfasis en aquellas lipasas putativas de carácter extracelular.

### 6.1.3 MATERIALES Y MÉTODOS

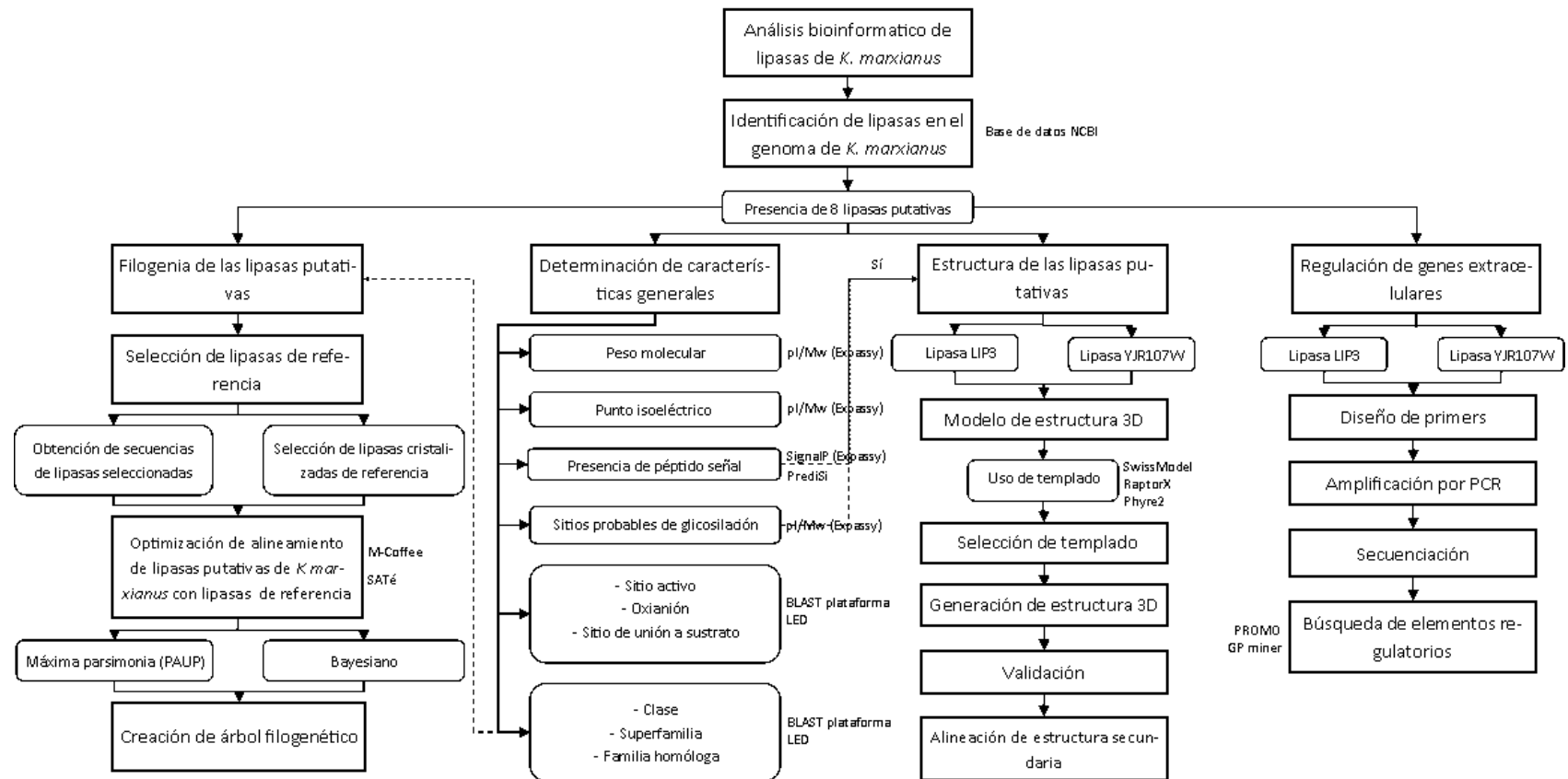


Figura 8. Estrategia metodológica para el análisis bioinformático de las lipasas extracelulares putativas de *K. marxianus*

### 6.1.3.1 LEVADURA

La cepa utilizada, *K. marxianus* L-2029, fue obtenida y seleccionada (Anexo 10.1) del cepario del Laboratorio de Bioquímica del Instituto Tecnológico de Morelia (Morelia, Michoacán, México); esta cepa fue previamente aislada de fermentaciones espontáneas provenientes de la producción del Mezcal (González-Hernández *et al.*, 2012) y fue depositada en la Colección Nacional de Cepas Microbianas y Cultivos Celulares (CDBB) del CINVESTAV, con número de registro L-2029. Para el mantenimiento y crecimiento de la levadura se utilizó medio de cultivo agar YPD: 2 % glucosa, 1 % peptona, 1 % extracto de levadura, 2 % agar.

### 6.1.3.2 DETERMINACIÓN DE CARACTERÍSTICAS GENERALES

La obtención de las secuencias de aminoácidos de las 8 lipasas putativas, se hizo a partir de la búsqueda en la plataforma del Centro Nacional para la Información en Biotecnología (NCBI por sus siglas en inglés, disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para la cepa de *K. marxianus* DMKU3-1043, con números de acceso: BAO41717.1 (YJR07W), BAO39800.1 (ATG15), BAO41305.1 (ROG1), BAO40608.1 (YDR444W), BAO39555.1 (YOR059C), BAO37746.1 (LIP2), BAO38130.1 (LIP3) y BAO38024.1 (LIP5), cuyas secuencias se muestran en el apartado del apéndice 13.1.

Diferentes parámetros fueron determinados para cada una de las lipasas putativas. El peso molecular y el punto isoeléctrico fueron calculados con la herramienta pI/Mw de la plataforma Expassy (Bjellqvist *et al.*, 1993, 1994; Gasteiger *et al.*, 2005). Se detectó además la presencia de péptido señal a fin de determinar cuáles de las lipasas putativas son extracelulares, para lo que se usaron dos herramientas bioinformáticas: Signal P (Petersen *et al.*, 2011) y PrediSi (disponible en [www.predisi.de/home.html](http://www.predisi.de/home.html)). A fin de determinar los posibles sitios de glicosilación de las lipasas putativas, se utilizó la herramienta NetNGlyc 1.0 (Gupta *et al.*, 2004).

Finalmente, algunas características estructurales de las lipasas putativas de *K. marxianus* se establecieron mediante un análisis comparativo tipo Blast en la plataforma LED (Lipase Engineering Database: [www.led.uni-stuttgart.de](http://www.led.uni-stuttgart.de); Fischer & Pleiss, 2003). Las características determinadas fueron el sitio activo, oxianión, sitio de unión a sustrato, clase, superfamilia y familia homóloga.

Las características y propiedades obtenidas para las lipasas putativas extracelulares a detectar, se comprobaron usando la secuencia de nucleótidos de la cepa *K. marxianus* L-2029.

#### 6.1.3.3 FILOGENIA DE LAS LIPASAS PUTATIVAS DE *K. marxianus*

La selección de las lipasas usadas como referencia para la construcción del árbol filogenético se hizo en base a tres parámetros: (1) lipasas con una alta identidad determinada por análisis BlastP de cada una de las lipasas putativas de *K. marxianus*; (2) la secuencia de aminoácidos de lipasas representativas de las tres clases y diferentes familias, caracterizadas y provenientes de varias especies, las cuales fueron obtenidas de la base de datos LED (los números de acceso de las lipasas seleccionadas se muestran en la Tabla 3); (3) lipasas cristalizadas fueron seleccionadas de diferentes familias, superfamilias y especies, cuyos números de acceso son mostrados en la Tabla 3.

Usando las secuencias seleccionadas y las lipasas presentes en el genoma de la cepa *K. marxianus* DMKU3-1042, se realizaron múltiples alineamientos en M-Coffe (Wallace *et al.*, 2006) y SATÉ (Liu *et al.*, 2012), usando MAFFT (Katoh & Standley, 2013) como herramienta de alineamiento externa y RaxML (Stamatakis, 2006) como el estimador del árbol. Los alineamientos optimizados a mano fueron usados para los análisis de Máxima Parsimonia (MP) y Bayesiano para inferir relaciones filogenéticas. El análisis de Parsimonia se llevó a cabo en PAUP 4.0a150 (Swofford, 2002) por búsqueda heurística con la opción de intercambio de rama TBR excluyendo caracteres no informativos. El soporte de nodos fue determinado a partir de valores de bootstrap de 1000 réplicas. La Inferencia por Bayesiano (BI) se realizó en MrBayes 3.2 (Ronquist *et al.*, 2012). Cuatro cadenas MCMC se corrieron simultáneamente, comenzado por árboles aleatorios de 10,000,000 generaciones. Los árboles generados se muestrearon cada 1,000 generaciones, para la obtención de un total de 10,000 árboles. Los primeros 2,500 árboles fueron descartados. Probabilidades posteriores fueron determinadas para la generación del árbol consenso con los 7,500 árboles remanentes. Ya que no se encontraron incongruencias entre los árboles obtenidos de ambos análisis, las matrices fueron combinadas para la obtención del árbol filogenético final.

#### 6.1.3.4 REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS LIPASAS EXTRACELULARES PUTATIVAS DE *K. marxianus*



Con el fin de reconocer probables secuencias de reconocimiento de elementos reguladores de la transcripción de las lipasas extracelulares putativas de *K. marxianus*, se secuenció la región promotora de los genes en cuestión, con una longitud de aproximadamente 1000 pares de base río arriba del codón de inicio. Además, se secuenció cada uno de los genes codificantes para lipasas extracelulares a fin de identificar diferencias respecto a las secuencias usadas como referencia (Figura 9). Para la secuenciación, se dividieron en varios fragmentos cada secuencia total para cada uno de los genes. En el caso de la lipasa *pYJR107W*, se generaron tres fragmentos y se diseñaron primers específicos para la amplificación de los mismos por PCR: la secuencia de los primers por pares obtenidos fueron GTTAAAGCTAAAATCTAATCATATGGAATG y CAAGGGTTGAGTTAGTGTGGTT para el primer fragmento, CCACTCTCCACTAGCTTATCATAG y GGTATTGGACTAAGTTCTTTAATAGCAA para el segundo fragmento y, ACTTGATCCAACTACTAGATGAAAT y GAATAATGAACAGTATATTCTATCTGCTC, para el tercer fragmento.

**Tabla 3. Lipasas seleccionadas para el análisis filogenético**

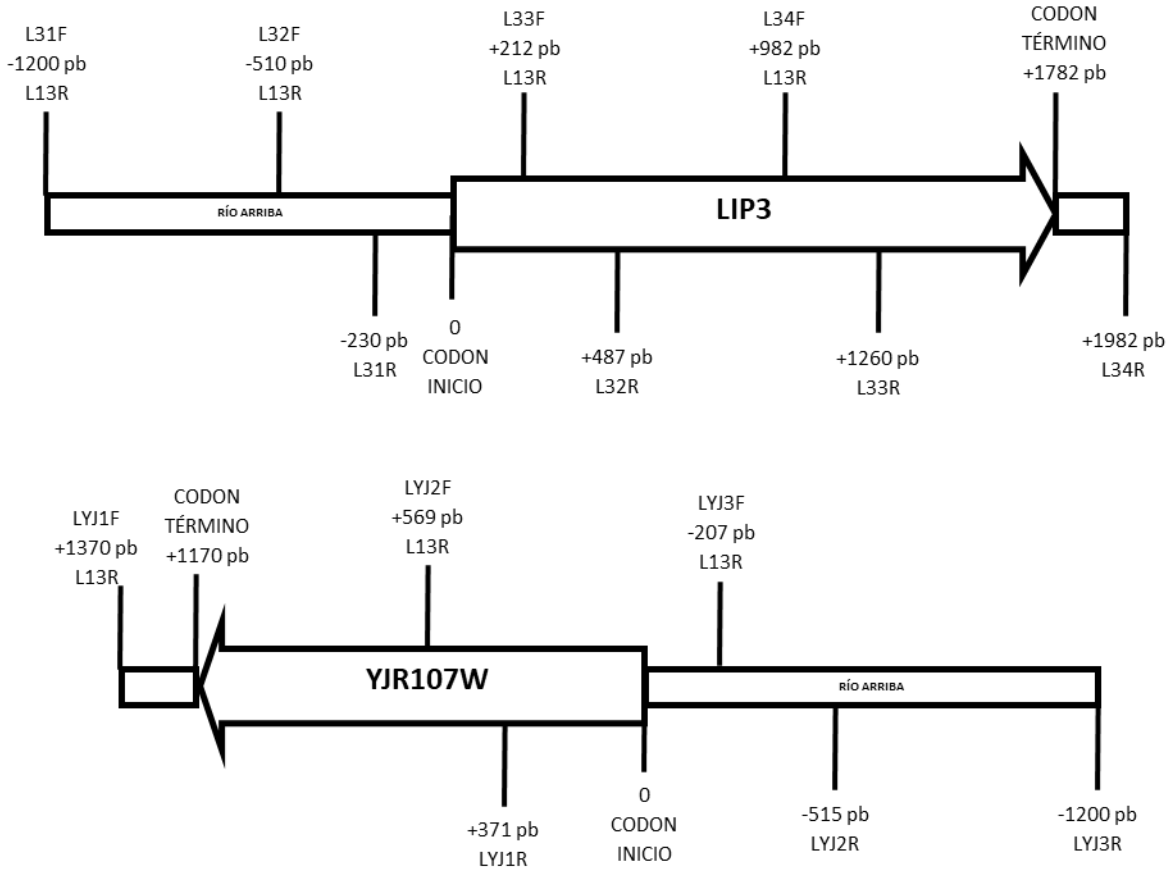
Clave	Clase	Superfamilia	Familia homóloga	Especie	Número de acceso (GenBank)
CRLIP1	GGGX	abH03	abH03.01	<i>Candida rugosa</i>	CAA45957
CRLIP2*	GGGX	abH03	abH03.01	<i>C. rugosa</i>	1GZ7
CRLIP3	GGGX	abH03	abH03.01	<i>C. rugosa</i>	CAA46805
AFL1	GGGX	abH03	abH03.01	<i>Aspergillus fumigatus</i>	EAL84915
AFL2	GGGX	abH03	abH03.01	<i>A. fumigatus</i>	XP_746588
DHL1	GGGX	abH03	abH03.01	<i>D. hansenii</i>	CAG87808
YLLA	GGGX	abH02	abH02.01	<i>Yarrowia lipolytica</i>	Q99156
BSL1	GGGX	abH01	abH01.05	<i>Bacillus subtilis</i>	ABB54394
BCL1	GGGX	abH01	abH01.05	<i>Bacillus cenocepacia</i>	CAR55977
CEL1	GGGX	abH01	abH01.01	<i>Caenorhabditis elegans</i>	T32054
HSL1	GGGX	abH01	abH01.03	<i>Homo sapiens</i>	AAA52014
BTL1*	GGGX	abH01	abH01.03	<i>Bos Taurus</i>	1AKNA
DML1	GGGX	abH01	abH01.09	<i>Drosophila melanogaster</i>	AAB46701
BCEL1	GGGX	abH04	abH04.01	<i>Bacillus cereus</i>	NP_979556
MLIP2	GGGX	abH04	abH04.01	<i>Moraxella</i>	P24484
SSLIP1	GGGX	abH04	abH04.01	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	AAK42629
BTL2	GGGX	abH05	abH05.01	<i>B. Taurus</i>	AAB41625
HSL2	GGGX	abH05	abH05.01	<i>H. sapiens</i>	Q05469
SSL1*	GGGX	abH07	abH07.01	<i>S. solfataricus</i>	2RAU
SCMLIP*	GGGX	abH08	abH08.09	<i>S. cerevisiae</i>	4ZWN_D
HSL3	GGGX	abH08	abH08.11	<i>H. sapiens</i>	3JW8

\* Lipasas cristalizadas

**Tabla 3. Lipasas seleccionadas para el análisis filogenético (continuación)**

Clave	Clase	Superfamilia	Familia homóloga	Especie	Número de acceso (GenBank)
ANLIPB	GX	abH23	abH23.01	<i>Aspergillus niger</i>	ABG73614
AFL3	GX	abH23	abH23.01	<i>A. fumigatus</i>	XP_748138
AOL1	GX	abH23	abH23.01	<i>Aspergillus oryzae</i>	BAA12912
PCL1	GX	abH23	abH23.01	<i>Penicillium camembertii</i>	1TIA
RML1*	GX	abH23	abH23.01	<i>Rhizomucor miehei</i>	3TGLA
CDL1	GX	abH23	abH23.02	<i>Candida deformans</i>	CAD21428
DHL2	GX	abH23	abH23.02	<i>D. hansenii</i>	XP_459277
KLL1	GX	abH23	abH23.02	<i>Kluyveromyces lactis</i>	XP_453549
SCL1	GX	abH23	abH23.02	<i>S. cerevisiae</i>	EDN63423
YLLIP8	GX	abH23	abH23.02	<i>Y. lipolytica</i>	XP_500677
YLLIP5	GX	abH23	abH23.02	<i>Y. lipolytica</i>	XP_503467
YLLIP2*	GX	abH23	abH23.02	<i>Y. lipolytica</i>	3O0DD
BSLIPA*	GX	abH18	abH18.01	<i>B. subtilis</i>	5CT6A
BSLIPB	GX	abH18	abH18.01	<i>B. subtilis</i>	C69652
ATL1	GX	abH15	abH15.01	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AAD31339
SALIPA	GX	abH15	abH15.01	<i>Staphylococcus aureus</i>	AAA26676
HSL4	GX	abH15	abH15.01	<i>H. sapiens</i>	NP_000506
BCLIPA*	GX	abH15	abH15.02	<i>B. cepacia</i>	2NW6A
PALIPC	GX	abH15	abH15.02	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AAC34733
SCLIP2	GX	abH15	abH15.03	<i>S. cerevisiae</i>	EDV08240
CALIPB*	GX	abH37	abH37.01	<i>Candida antártica</i>	4ZV7A
PFLIPA	GX	abH24	abH24.01	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	P26504
SMLIPA*	GX	abH24	abH24.01	<i>Serratia marcescens</i>	2QUBG
AAL1	GX	abH14	abH14.01	<i>Aedes aegypti</i>	XP_001662499
DMML2	GX	abH14	abH14.01	<i>D. melanogaster</i>	O46108
HSL5	GX	abH14	abH14.01	<i>H. sapiens</i>	P38571
ATL2	GX	abH14	abH14.02	<i>A. thaliana</i>	AAD25569
HSL5*	GX	abH14	abH14.02	<i>H. sapiens</i>	1HLGA
KLL2	GX	abH14	abH14.02	<i>K. lactis</i>	XP_455780
HSL7	GX	abH20	abH20.02	<i>H. sapiens</i>	NP_006024
HSL8	GX	abH20	abH20.02	<i>H. sapiens</i>	AAH11353
AAL2	GX	abH20	abH20.03	<i>A. aegypti</i>	XP_001654786
HSL9*	GX	abH20	abH20.03	<i>H. sapiens</i>	2PPLA
CALIPA*	Y	abH38	abH38.01	<i>C. antártica</i>	3GUUA
CALLIP1	Y	abH38	abH38.02	<i>Candida albicans</i>	XP_723507
CALLP2	Y	abH38	abH38.02	<i>C. albicans</i>	Q9P8W5
AFL4	Y	abH38	abH38.03	<i>A. fumigatus</i>	EDP47960
AOLIP2	Y	abH38	abH38.03	<i>A. oryzae</i>	XP_001820488
PAPAT*	-	-	-	<i>P. aeruginosa</i>	5FYA

\* Lipasas cristalizadas



**Figura 9. Zona promotora y codificante de los genes de lipasas putativas extracelulares, LIP3 y YJR107W.** Se especifican los sitios de inicio y término de cada fragmento a amplificar por PCR.

Para el gen LIP3 se generaron cuatro fragmentos; los primers diseñados para su amplificación fueron: CTCATAGGTATGGCTGTACGTC y AAAACATCACAGTCATGTGACATAC para el primer fragmento, TATTTCTGAACATGTTTCCCACAC y TCTCCACCACCTTATCGAGA para el segundo fragmento, AAAAGGCGAGTCTAGTGGAC y TACGATAAAGTTGTTTACGTTGAAGAG para el tercer fragmento y, AACAGAACATCTGTCCCACG y TAAGGCCTCTCGACACTGGTAA para el cuarto fragmento.

La amplificación de cada uno de los fragmentos antes mencionados se llevó a cabo en un gradiente de temperatura de 50 a 60° C, con temperatura de desnaturalización de 95° C, y de extensión de 72° C durante 2 min. El producto con mayor concentración en cada caso fue purificado y enviado a secuenciar por Elim Biopharm®. Las reacciones de amplificación y electroforesis de los productos de PCR se explican en los siguientes apartados.

Las secuencias de nucleótidos de la región promotora y de los genes de ambas lipasas extracelulares de *K. marxianus* L-2029 fueron construidas y depositadas en la base de datos del NCBI, con números de acceso MH512931 para LIP3 y MH512932 para YJR107W.

Con el fin de identificar elementos de transcripción se utilizó la herramienta bioinformática PROMO (Messeguer *et al.*, 2002; Farré *et al.*, 2003). Para identificar probables sitios de localización de elementos del promotor se utilizó la plataforma Gene Promoter Miner (disponible en <http://gpminer.mbc.nctu.edu.tw>).

#### 6.1.3.5 MODELADO DE LAS LIPASAS EXTRACELULARES PUTATIVAS DE *K. marxianus*

Con el fin de obtener la probable estructura de las lipasas extracelulares putativas de *K. marxianus*, se utilizaron tres herramientas bioinformáticas: SwissModel (Arnold *et al.*, 2006; Kopp, 2006; Bordoli *et al.*, 2009; Guex *et al.*, 2009; Kiefer *et al.*, 2009; Biasini *et al.*, 2014; Bienert *et al.*, 2017), RaptorX (Peng & Xu, 2011, 2012; Källberg *et al.*, 2012; Ma *et al.*, 2013) y Phyre2 (Kelley *et al.*, 2015).

Después de generado cada uno de los modelos, estos se evaluaron con los parámetros de calidad propios de cada herramienta y se validaron por superimposición con el mejor templado derivado de cada análisis, mediante el servidor SuperPose 1.0 (Maiti *et al.*, 2004).

Las herramientas ENDscript 2.0 y ESPript 3.0 (Robert & Gouet, 2014) fueron utilizadas para el alineamiento de la estructura secundaria de los mejores modelos de ambas lipasas con las lipasas usadas como templado para su generación.

### 6.1.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 6.1.4.1 DETERMINACIÓN DE CARACTERÍSTICAS GENERALES

A partir de la búsqueda en la base de datos del Centro Nacional para la Información en Biotecnología (NCBI), se detectaron 8 lipasas putativas en el genoma de la levadura no convencional *K. marxianus* DMKU 3-1042 (Lertwattanasakul *et al.*, 2015). Posteriormente, se hizo una búsqueda de las lipasas específicas en cuestión, cuyos números de acceso se muestran en la Tabla 1. Además, esta búsqueda permitió determinar la longitud del gen de cada una de las lipasas enumeradas en la Tabla 4, así como la probable longitud de la proteína. Por otra parte, puede observar que solo en 4 de los 8 cromosomas que posee *K. marxianus*, se encuentra la

presencia de genes codificantes para estas enzimas putativas; en el cromosoma 1 se ubican los genes codificantes para las lipasas LIP2, LIP3 y LIP5; por su parte, en el cromosoma 3 se ubican los genes ATG15 y YOR059C; en el cromosoma 4 solamente se encuentra la presencia del gen YDR444W; finalmente, en el cromosoma 6 se encuentra la información genética de los genes codificantes para las lipasas putativas YJ107W y ROG1.

Las secuencias de aminoácidos de las 8 lipasas putativas de *K. marxianus* fueron utilizadas para predecir algunas características de las enzimas en cuestión (Tabla 4). El tamaño de las secuencias es muy variable, siendo la más baja para la lipasa *pYJR107W*, de 389 aminoácidos, y la más grande *pLIP5*, con una longitud de 773 aminoácidos. Por supuesto, esto tiene un impacto sobre el peso molecular aproximado para cada una de las lipasas, el cual también tiende a ser variable, desde los 44 KDa, hasta los 87 KDa, respectivamente. Por otro lado, el punto isoelectrico se encuentra en la mayoría de los casos a un pH alcalino, encontrando 5 secuencias de las lipasas putativas con puntos isoelectricos mayores a 7, y sólo una (ATG15) con un punto isoelectrico menor a 5.

La longitud de la lipasa putativa ATG15 es un poco mayor a la reportada en la base de datos *Saccharomyces genome database* (SGD), que reporta una longitud de 520 aminoácidos, y un peso molecular de 58.417 KDa. Además, difiere el punto isoelectrico reportado en dicha base de datos, de 5.20. Situación similar se encontró con respecto a la lipasa putativa *pYJR107W*, en la cual se reporta una longitud de 328 aminoácidos y peso molecular de 37.198 KDa.

Una de las lipasas putativas que presentan menor diferencia con las estudiadas anteriormente es *pROG1*, la cual tiene una longitud reportada de 685 aminoácidos y un peso molecular de 78.142 KDa, de acuerdo a lo reportado en la base de datos UNIPROT; en la misma se encuentra determinada una longitud de 687 aminoácidos y 78.108 KDa para *pYDR444W*, valores mayores a los encontrados en el análisis bioinformático realizado para las lipasas putativas de *K. marxianus*. Para *pYOR059C* se reporta una longitud de 450 aminoácidos y 51.106 KDa, siendo muy cercanos a los valores obtenidos en este trabajo.

Mediante un análisis Blast en la plataforma LED, se logró obtener la clase de cada una de las lipasas putativas, y en la mayoría de los casos la superfamilia y familia homóloga a la que pertenecen, como se puede verificar en la Tabla 5. Como era de esperarse, todas las lipasas putativas de *K. marxianus* pertenecen a la clase GX, a la cual pertenecen las lipasas de origen fúngico; las lipasas *pYJR107W* y *pATG15* se ubican en la superfamilia abH23, las cuales son

lipasas fúngicas filamentosas del tipo *Saccharomyces* y *Rhizomucor miehei*, respectivamente; la lipasa *pYDR444W*, por su parte, se ubica en la superfamilia abH20, referente a lipasas lipoproteicas, mientras *pLIP2* se ubica en las lipasas de *Burkholderia*, pero del tipo *Saccharomyces*.

Mediante el mismo análisis, se pudo predecir la posible posición de la triada catalítica, del oxianión y del sitio de unión al sustrato para algunas de las lipasas putativas, excepto para las enzimas *pROG1*, *pLIP3* y *pLIP5*. Con el fin de determinar la posible presencia de lipasas de carácter extracelular, se usaron dos herramientas, PrediSi y SignalP, que ayudaron a identificar dos lipasas con una alta probabilidad de ser extracelulares: *pLIP3* y *pYJR107W*. En este mismo sentido, se predijeron los sitios probables de glicosilación, que, si bien se hizo el análisis para las 8 lipasas putativas, cobra mayor relevancia para las lipasas que son secretadas al medio extracelular. La lipasa putativa *pYJR107W* tiene dos probables sitios de glicosilación, en los residuos 122 y 97, mientras *pLIP3* presenta uno en el sitio 222 de su secuencia.

Las lipasas putativas extracelulares *pLIP3* y *pYJR107W*, fueron seleccionadas entonces para posteriores análisis de regulación y predicción de su estructura.

**Tabla 4. Características generales de las lipasas putativas de *K. marxianus***

Clave	Tamaño (aa)	Punto isoeléctrico	Peso molecular (KDa)	Clase	Superfamilia	Familia homóloga
YJR107W	389	5.98	44.526	GX	abH23	abH23.02
ATG15	544	4.80	60.513	GX	abH23	abH23.01
ROG1	682	5.81	77.694	GX	-	-
YDR444W	636	8.36	71.998	GX	abH20	abH20.03
YOR059C	472	8.87	53.952	GX	abH15	abH15.03
LIP2	394	8.10	44.682	GX	abH15	abH15.03
LIP3	594	7.55	68.227	GX	-	-
LIP5	773	9.11	87.193	GX	-	-

**Tabla 5. Características estructurales de las lipasas putativas de *K. marxianus***

Clave	Péptido señal	Sitio activo	Oxianión	Sitio de unión ácido graso	Sitios probables de glicosilación
YJR107W	Si (33)	S224D296H363	L225	P252	122 (NRTR); 97 (NKTF)
ATG15	No	S161D219	L162	P193	184 (NVTG); 15 (NSTG); 73 (NASL)
ROG1	No	-	-	-	394 (NVTA); 206 (NTSL); 522 (NSTN)
YDR444W	No	S141D171H243	L142	ND	445 (NISN); 169 (NDSI); 493 (NLSN)
YOR059C	No	S374D497H519	M375	ND	421 (NLSK); 364 (NDSN)
LIP2	No	S205D323H345	M206	ND	175 (NLSK); 104 (NHSD); 316 (NLSG)
LIP3	Si (25)	-	-	-	222 (NGTS)
LIP5	No	-	-	-	329 (NVTG); 346 (NLTA); 314 (NLTF)

#### 6.1.4.2 FILOGENIA DE LAS LIPASAS PUTATIVAS DE *K. marxianus*

Una de las características estructurales de las lipasas, es la presencia de una brecha oxianiónica, encargada de estabilizar el sitio catalítico durante la hidrólisis de acilglicérol. El “oxianión” está compuesto de dos residuos, uno de los cuales se encuentra relacionado al residuo nucleofílico de la tríada catalítica, mientras el otro residuo tiene una posición variable, lo que permite clasificar a las lipasas en tres clases: GX, GGGX y Y. Dicha distribución fue propuesta y reportada en la base de datos LED (Fischer & Pleiss, 2003), que concentra a la mayoría de las lipasas conocidas. La clase GX es la más extensa, compuesta por 27 superfamilias y 82 familias homólogas, mientras que en la clase GGGX se ubican 6 superfamilias y 22 familias homólogas; por su parte, la clase Y, concentra únicamente 5 superfamilias y 8 familias homólogas (Widmann *et al.*, 2010).

Con el fin de conocer la filogenia de las lipasas de *K. marxianus*, se seleccionaron lipasas provenientes de diferentes organismos, principalmente fúngicos, que representaran diversas familias de las tres clases antes mencionadas. En la selección se incluyeron lipasas cristalizadas y proteínas con alto porcentaje de identidad a las lipasas de *K. marxianus*, resultado del análisis BlastP en la plataforma GenBank. Esto permitió no solo conocer la relación de las lipasas de *K. marxianus* respecto a otras enzimas de la misma naturaleza, sino también la construcción de un

árbol filogenético general para las enzimas lipásicas, el cual es robusto de acuerdo a los estadísticos utilizados en la generación del mismo, que destaca distintos rasgos evolutivos de este grupo de enzimas (Figura 10).

Queda de manifiesto que los primeros organismos en producir este tipo de enzimas, especializadas en la hidrólisis de acilgliceroles, fueron procariotes. Las lipasas más antiguas pertenecen a *B. subtilis*, conocidas como lipasas A y B, respectivamente, las cuales pertenecen a la familia ab18.01 (lipasas de *Bacillus*), clase GX. Incluso, la relación evolutiva de todas las demás lipasas incluidas en la construcción del árbol filogenético para este estudio, se encuentran ligadas a la lipasa B de dicho organismo. Por tanto, las clases de lipasas GGGX y Y surgieron aparentemente a partir de enzimas de la clase GX, lo cual es consistente con la amplia diversidad de esta última clase con respecto a las otras dos. En la clase GX, el aminoácido de posición variable X se encuentra inmediato en la secuencia a una glicina conservada en C-terminal, que contacta el codo nucleofílico en el plegamiento de la enzima (Pleiss *et al.*, 2000).

Algunas lipasas incluidas en el estudio, emergieron tempranamente de acuerdo con el árbol filogenético. En este pequeño grupo se encuentran localizadas las lipasas LIPA de *B. cepacia* y LIPC de *P. aeruginosa*, ambas de origen procariote. Además, la lipasa putativa LIP2 de *K. marxianus* se encuentra en este grupo, asociada a su homóloga de *S. cerevisiae*. Es clara la conexión filogenética que existe entre lipasas de la familia abH15 (lipasas tipo *B. cepacia* y lipasa 2 de *S. cerevisiae*).

Como sea, el árbol filogenético obtenido parece encontrarse dividido en dos grandes clados: en el primero de ellos (parte superior, Figura 10) se encuentran las lipasas de la clase GX, ligadas al surgimiento de la clase Y, y que están relacionadas filogenéticamente a la lipasa B de *C. antarctica* (familia abh37.01). En la clase Y, el residuo X que conforma el oxianión es siempre un residuo de tirosina, en una estructura muy similar a la clase GX (Pleiss *et al.*, 2000). Por otro lado, en el segundo clado, se posicionan las lipasas de la clase GX relacionadas a la clase GGGX (parte inferior). En esta clase, la brecha oxianiónica está desplazada en una posición sobre C-terminal, respecto a la estructura de la clase GX, y es la glicina conservada la que se encuentra antecediendo a un residuo hidrofóbico X (Borrelli & Trono, 2015). La división en dos clados del árbol filogenético construido, coincide por lo observado por Gupta *et al.*, (2015), el cual presentó un árbol filogenético únicamente de levaduras y hongos filamentosos, usando la herramienta MEGA (versión 6).



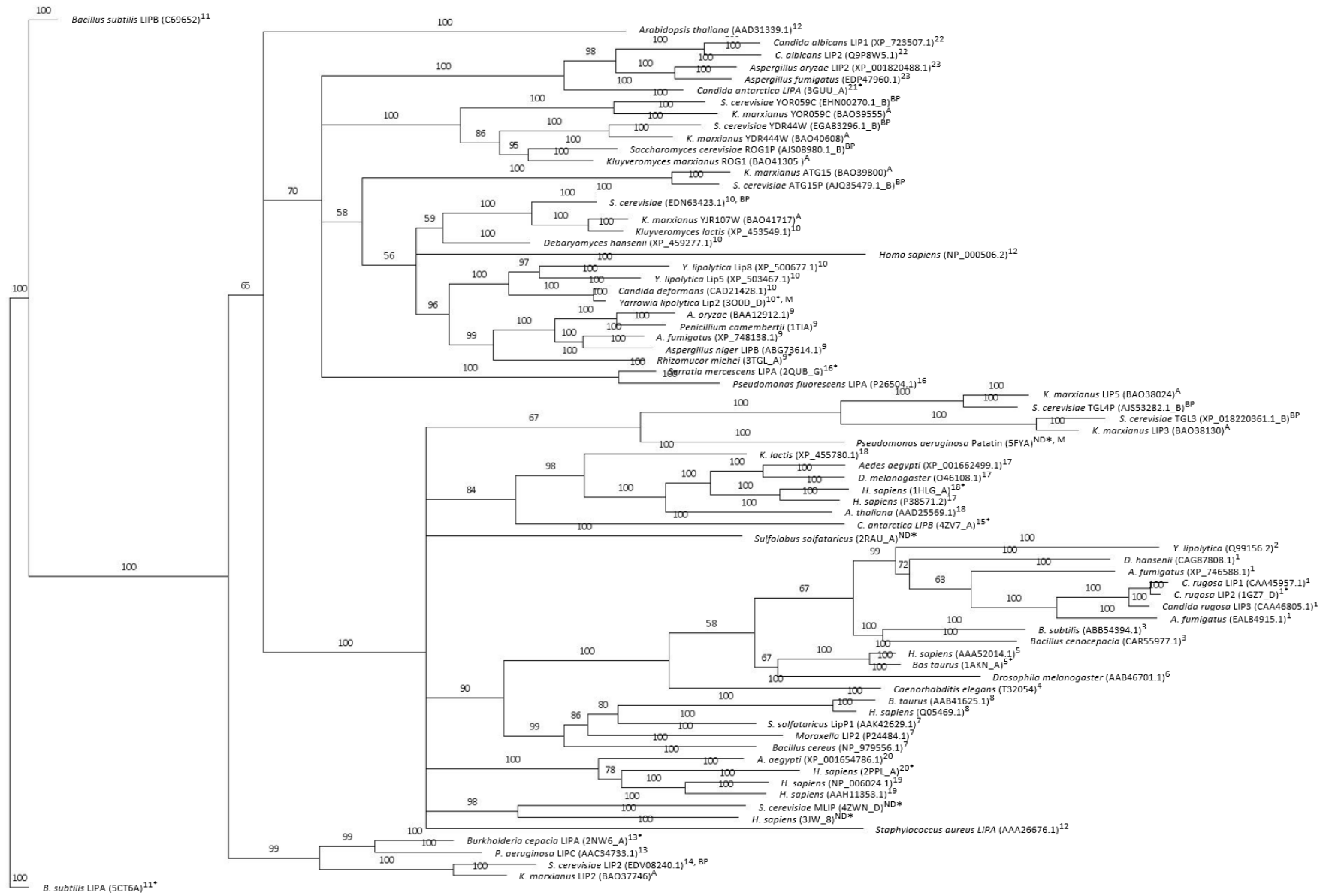
En el primer clado, mostrado en la parte superior del árbol filogenético (Figura 13), respecto a las lipasas de *K. marxianus*, se encontró el agrupamiento de las lipasas *pROG1*, *pYDR444W* y *pYOR059C*, ubicadas con sus respectivas homólogas de *S. cerevisiae* (obtenidas a partir del BlastP). Como se mencionó anteriormente, parece ser un grupo de enzimas que participan en la formación y mantenimiento de partículas lipídicas de reserva en levaduras ascomicetas. La principal inconsistencia en su relación filogenética, de acuerdo al análisis Blast previamente realizado en la plataforma LED, se detectó para la enzima *pYOR059C*, la cual aparentemente se ubicaría en la familia abH15.03, que agrupa hidrolasas del tipo de la lipasa 2 de *S. cerevisiae*. Las tres lipasas de *K. marxianus* tienen 26 % de identidad, a partir de la comparación de sus secuencias, lo que descarta que se trate de isoformas; sin embargo, debido a su estrecha relación, estas enzimas podrían ser parálogas, surgiendo a partir de eventos de duplicación.

Las enzimas *pROG1*, *pYDR444W* y *pYOR059C* parecen estar relacionadas filogenéticamente a la familia abH20.03, lipasas pancreáticas, que concentran hidrolasas principalmente de mamíferos; estas enzimas especializadas, podrían ser antecesoras de dichas lipasas mamíferas, por lo que sería interesante en estudios futuros realizar un análisis filogenético específico de dicha familia.

Las lipasas pertenecientes a la naciente clase Y se encuentran estrechamente relacionadas entre sí a pesar de pertenecer a diferentes familias: lipasas de *C. albicans* (abH38.02), lipasas de *Aspergillus* (abH38.03) y lipasas del tipo A de *C. antarctica* (abH38.01); todas ellas provienen de hongos filamentosos y levaduras.

Otro numeroso grupo de lipasas de la clase GX se encuentra integrado por solo enzimas de levaduras y hongos en este clado, excepto por la lipasa de *H. sapiens* que pertenece a la familia abH15.01 (lipasas de *S. aureus*). La posición de dicha proteína es inconsistente ya que la lipasa de *A. thaliana*, de la misma familia, se encuentra separada de los dos grandes clados identificados en el árbol filogenético. Se recomienda hacer un análisis especializado en la familia abH15.01 a fin de determinar la posición definitiva de este grupo de enzimas.

Caracterización bioquímica de las lipasas extracelulares de *Kluyveromyces marxianus* expresadas en un sistema heterólogo



0.8

**Figura 10. Filogenia de las lipasas putativas de *K. marxianus*.** El número de acceso de cada lipasa considerada en el árbol filogenético es mostrado en paréntesis después del nombre del organismo y de la enzima. El superíndice indica la familia homóloga de procedencia. Para la clase GGGX: [1] abH03.01 (tipo lipasa de *C. rugosa*), [2] abH02.01 (tipo lipasa de *Y. lipolytica*), [3] abH01.05 (*Bacillus* estereasas), [4] abH01.01 (*C. elegans* estereasas I), [5] abH01.03 (lipasas tipo mamíferas activadas por sales biliares), [6] abH01.09 (*Drosophila* estereasas), [7] abH04.01 (tipo lipasa 2 de *Moraxella*), [8] abH05.01 (lipasas sensibles a hormonas). Para la clase GX: [9] abH23.01 (tipo lipasa de *R. miehei*), [10] abH23.02 (tipo lipasa de *Saccharomyces*), [11] abH18.01 (*Bacillus* lipasas), [12] abH15.01 (*S. aureus* lipasas), [13] abH15.02 (tipo lipasa de *B. cepacia*), [14] abH15.03 (tipo lipasa 2 de *S. cerevisiae*), [15] abH37.01 (tipo lipasa B de *C. antarctica*), [16] abH24.01 (*Pseudomonas* lipasas), [17] abH14.01 (lipasas ácidas lisosomales), [18] abH14.02 (lipasas gástricas), [19] abH20.02 (lipoprotein lipasas), [20] abH20.03 (lipasas pancreáticas). Para la clase Y: [21] abH38.01 (tipo lipase A de *C. antarctica*), [22] abH38.02 (tipo lipasa de *C. albicans*), [23] abH38.02 (tipo lipasa de *Aspergillus*). Además: [A] lipasas de *K. marxianus*, [ND] familia homóloga no determinada, [BP] lipasas obtenidas del análisis BlastP (Tabla 2), [\*] lipasas cristalizadas, [M] lipasas usadas como templatado para el modelado de las enzimas extracelulares de *K. marxianus*.

Una de las lipasas de *K. marxianus* detectada como extracelular, *pYJR107W*, y la lipasa *pATG15*, se encuentran evolutivamente asociadas a las familias abH23.01 (lipasas del tipo *R. miehei*) y abH23.02 (lipasas del tipo *Saccharomyces*). *pATG15* podría ser una enzima predecesora de lipasas que pertenecen a dichas familias. Existe una alta cercanía de *pYJR107W* con lipasas de uno de los organismos reconocidos como los mejores productores de estas enzimas, *Y. lipolytica*, y su probable estructura tiene un alto porcentaje de identidad con la lipasa *pLIP2* de dicha levadura, como se abordará más adelante.

En el segundo gran clado que se puede reconocer en el árbol filogenético construido, sobresalen las lipasas de *K. marxianus* *pLIP3*, predicha como enzima extracelular, y *pLIP5*, la cual es intracelular. Existe una estrecha relación filogenética entre ambas lipasas, lo que podría hablar de una duplicación de la enzima *pLIP5*, ambas ubicadas en el cromosoma 1 del genoma de *K. marxianus*, y la posterior especialización extracelular de *pLIP3*. Sin embargo, el alineamiento de estas dos lipasas permitió reconocer un porcentaje de identidad de sólo 26% entre ambas enzimas; como sea, debido a su alta relación evolutiva, no se puede descartar que estas dos proteínas provienen de genes parálogos. A pesar de la alta cercanía con las proteínas TGL de *S. cerevisiae*, no fue posible reconocer la probable familia a la cual pertenecerían dichas enzimas, incluso cuando se realizó el análisis BlastP en la plataforma LED. Esto podría sugerir su pertenencia a una familia no descrita aún dentro de la clase GX.

Dentro del grupo de la clase GX que se encuentra relacionado filogenéticamente a las lipasas pertenecientes a la clase GGGX, se encuentran enzimas provenientes de organismos muy diversos, desde procariotes, como bacterias y arqueas (*S. solfataricus*), hasta lipasas de levaduras, hongos, plantas (*A. thaliana*) y mamíferos. Muy relacionadas se encuentran las éster-hidrolasas de las familias de lipasas de *S. aureus* y *B. cepacia*, así como las lipasas lisosomales, gástricas, lipoproteicas y pancreáticas. Una lipasa bien estudiada, LIPB de *C. antarctica*, de la familia abH37.01, se encuentra asociada a este grupo diverso también.

Las lipasas de la clase GGGX también es un grupo muy variado. En casi todas las familias representadas en esta clase, se encuentran una gran variedad de organismos productores de lipasas. Poniendo particular atención a las lipasas fúngicas, en esta clase se encuentra la familia abh03.01, lipasas pertenecientes a la levadura *C. rugosa*, probablemente el organismo del cual se han estudiado con más detalle las características, propiedades bioquímicas y de regulación de las isoformas de lipasas que esta sintetiza (Domínguez *et al.*, 2006).

Finalmente, es importante destacar la cercanía de lipasas de *H. sapiens* con las de otros organismos, especialmente aquellas que son de origen procariote. Esto podría sugerir la transferencia horizontal de este tipo de enzimas en el proceso de evolución (Salzberg *et al.*, 2001), adquiriendo enzimas especializadas con alta relación filogenética a sus homólogos.

#### 6.1.4.3 REGULACIÓN DE LAS LIPASAS EXTRACELULARES PUTATIVAS DE *K. marxianus*

Era de interés conocer las posibles diferencias en la secuencia de las lipasas putativas extracelulares entre la cepa que usamos en nuestro equipo de trabajo, *K. marxianus* L-2029, y la cepa que utilizamos como referencia para el análisis descrito en los apartados anteriores, *K. marxianus* DMKU 3-1042. Así, ambos genes fueron amplificados por PCR y secuenciados (Anexo 10.2) para su posterior alineamiento con las secuencias de referencia.

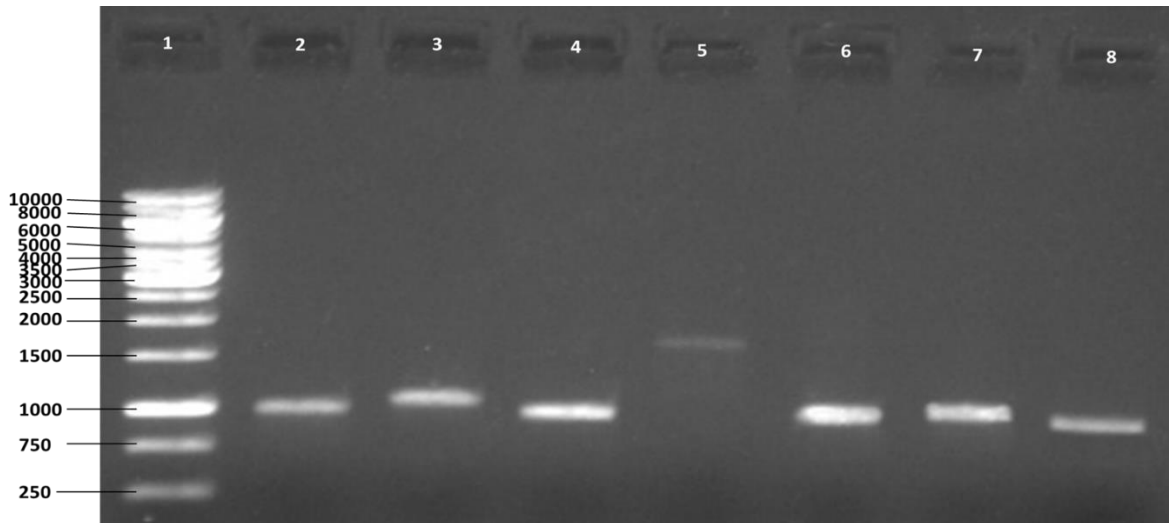
Comparando la secuencia de nucleótidos obtenida para el gen codificante de la lipasa *pLIP3*, se obtuvo un porcentaje de identidad del 99 % respecto a la cepa de referencia y ninguna deleción; la diferencia entre las secuencias se dio en 13 bases, ubicadas en las posiciones 4, 84, 540, 681, 840, 843, 852, 930, 972, 975, 1113, 1143 y 1149. A pesar de estas diferencias puntuales, la secuencia traducida de aminoácidos, comparada con la de referencia, mostró nuevamente una identidad del 99 %, con solamente 1 diferencia en el segundo residuo de

aminoácido. Esta diferencia no afectaría la estructura y conformación de la proteína, debido a que forma parte de la péptido señal de la aparente enzima extracelular.

Al igual que existió una alta identidad de la lipasa putativa *pLIP3* respecto a la secuencia de referencia, para la lipasa putativa *pYJR107W* también existió una identidad del 99 %, con incluso una menor cantidad de diferencias en la secuencia de nucleótidos obtenida. Solamente se presentaron dos cambios de nucleótido en las posiciones 195 y 892. Solo una diferencia en las secuencias de aminoácidos de las secuencias traducidas se presentó en el residuo 185, donde existe un cambio de glutamina por asparagina.

A fin de conocer probables secuencias reguladoras de los genes de las lipasas putativas extracelulares en cuestión presentes en la cepa de *K. marxianus* L-2029, se amplificó y secuenció la región promotora de los mismos, consistente en poco más de 1000 pb río arriba del codón de inicio (Figura 11).

La región promotora del gen codificante para la lipasa putativa *pLIP3* en la cepa L-2029, tuvo una identidad del 97 % respecto a la de referencia, DMKU 3-1042, con una diferencia de 35 pb encontradas en la región secuenciada. La identidad fue mayor en la región promotora del gen *YJR107W*, siendo del 99 %, con tan solo 4 pb diferentes entre la secuencia obtenida experimentalmente y la de la cepa *K. marxianus* DMKU 3-1042 (Figura 12).



**Figura 11. Amplificación de los fragmentos en las regiones regulatorias y genes de *LIP3* y *YJR107W* de *K. marxianus* L-2029.** Carriles: (1) Marcador de tamaño molecular 1 kb, (2) LYJ1 55° C, (3) LYJ2 50° C, (4) LYJ3 51.5° C, (5) L31 60° C, (6) L32 55° C, (7) L33 55° C, (8) L34 55° C.

La mayoría de los genes que son regulados bajo la presencia de ácido oleico en *S. cerevisiae*, dependen de una secuencia palindrómica compuesta por dos tripletes CGG espaciados por 15 a 18 nucleótidos: 5'-CGGN<sup>3</sup>TNAN<sup>9</sup>-12CCG-3', conocida como ORE, y que es regulada por el factor de transcripción Pip2p-Oaf1. Se ha encontrado que la actividad de este dímero se ve activado específicamente en la presencia de ácido oleico y reprimido en la presencia de glucosa (Gurvitz & Rottensteiner, 2006). La presencia de las secuencias ORE y UAS1 en lipasas ampliamente estudiadas como son las de la levadura *C. rugosa* llevó a la suposición de la probable presencia de estos elementos en la región promotora de las lipasas putativas extracelulares de *K. marxianus*. En efecto, 3 lipasas de *C. rugosa*, *LIP3*, *LIP4* y *LIP5*, son fuertemente inducidos en la presencia de ácido oleico y contienen tales elementos en su región promotora (Hsu *et al.*, 2008). Aunado a ello, se ha reconocido al ácido oleico como fuerte inductor de la actividad lipásica en *K. marxianus* (Deive *et al.*, 2003; Stergiou *et al.*, 2012)

La presencia de tales elementos de regulación en la región promotora de los genes aparentemente codificantes para las lipasas *pLIP3* y *pYJR107W*, se muestran en la Figura 12A y 12B, respectivamente. En el caso de aquellas ligadas al gen *LIP3*, se encontró la presencia de 3 probables regiones que son muy similares a la secuencia canónica para el elemento ORE, mas no se encontró ninguna secuencia similar al elemento UAS1 (Figura 12A). Sin embargo, aparentemente la presencia de este segundo elemento no es indispensable para la regulación de estos genes vía oleato (Hsu *et al.*, 2008). Por otro lado, en la región promotora de *YJR107W* se encontró la presencia de 2 secuencias del tipo ORE y una del tipo UAS1; la secuencia ORE ubicada 1060 pb río arriba aproximadamente, en específico, podría estar asociada a la secuencia UAS1 encontrada 708 pb río arriba (Figura 12B). Así, ambos genes de lipasas putativas extracelulares, en caso de serlo, podrían estar regulados por este mecanismo ante la presencia de ácidos grasos de cadena larga.

**A**

1160-	GTCGTGGCCCAATGGCAATCGACAGGTTCTTCGTGCTTAACGTCTCGTCCTTTAAAG	-1102
1101-	AGTGTTTTATAGAGCCTCTACA <b>CCGTGCTTGATCAACTCATCCG</b> CATCCTCAATATCCCGA	-1043
1042-	TACTCGTCCAAAACCCCTCTCGAGATACGTCTTGGCT/cCCCTGCGAACGCGCACCAATCG	-985
984-	CTGCC <b>CCGTATAATTTCCAACGTGTTCCCG</b> GATGGCTGGAACCTAATAGATGCGCCCCA	-926
925-	GTGTTATCGTACCCAACCAGCAAAAGACCCACA/eCCGTACGGTCTGCCCCATACGACT	-868
867-	GTGTGTTTTTCTGAGCCTTGTCGCTGAGCAAGTACCCA <b>GCCCTCTCTAGAGCCAATTT</b>	-809
808-	<b>CG</b> ATTGTACACCAAAGAAGAGTAATTGCATTGCTGTCTCAAATAGTTTCGACAACACTCT	-750
749-	TGCATCTGGC <b>GCCAAT</b> CCCGCTAGCGAAACTCCCATATGCTCATCGCACTTGATAATTT	-691
690-	TCTTCTGGTATGACGATAGCTCGTCAGCATTACGCTTCAATGCAACAACAACCGCGTAT	-632
631-	TTAGACGATCTCAACCCAAGTGTGCGAGACCCTTGCTTGATCGCTT <b>CCAATG</b> CGTATTC	-573
572-	TACCTGGAATAATCTCCCTGTTGGCGAAAATGTCACCGTA/eTCTCCGTCGTAATTTATTT	-515
514-	CTGAACATGTTTTCCACACTCTCAATCTGACTCCTGGCCTAGCTATTGCTTGCTATTGC	-456
455-	CCTTTCAAATACCTACAT/c <b>TATAAGAGTGTTA/aTATGTGTA/eTATAC/eATG/aT/c</b>	-406
405-	<b>ATATAC/aAAATAATATATCTATAGTAT</b> TGTTAAACGCTTTTTCAATTTGGCTT <b>TATTCG</b>	-348
347-	CCACCTTAAAAAAA <b>ATAAAG</b> AGCCCAAGGGAAAAAAGCGTGTGCGAG/TGAT/aGTGGTC	-292
291-	ATGTGACATACAC/TGTGAGTTACACGTGTATGTCACATGACTGTGG/aTGTTTTCTCTC	-236
235-	CCAAAATTAATTTATTTTTTCGCAG/TGG/cGTTCCCAAAATTAATCTATTTTT <b>CCGCCCC</b>	-180
179-	ATTTTTCAACATATTTTTCTTCCCTCTTTCCTC/eTCTTCACCTGGC/TTT/cCAAACCT <b>T</b>	-126
125-	<b>TAAAAG</b> AGCACTTCCCTCAGTCATCATCAGCTC <b>ATTATAT</b> GGAAAGTCTAGCACATTAGC	-67
66-	TTGGGTA AACAGGCAAGGCAGGTGAAACACACAGCTAGGATAGCTAGGACATACAATT	-8
7-	GCCAAC <b>CATG</b>	-0

**B**

1178-	ATCTATCTGCTCTTCCCTAACTTCAAGAATTGGAATTTGAAAACCTTTCAGTCAAAGC	-1020
1119-	ACTCTCGATTATTTTTATCTCCTATGGTCTTTTTGCTTCGATTATGCGTTCCACAATATT	-1061
1060-	<b>CGGAAGATGCAAAATTGAATTTTCCC</b> ATCATTATTTTCGCAGGCTATTATGGCTCCAGTG	-1002
1001-	ATGGGAATGCTAGTGATAGAATCGTTGTTAGATACCAAGATTTCCGCATGGTTTTGGTT	-943
942-	CATACCAGCCAGTTTATCTCTGATATTCCTCACTGGAGTATTATTTCTGAGATATAAGA	-884
883-	GACGAACACTATTTTCAATTTATCTTTATATGCGTATTCGGATGATACTGCAAACATTAAT	-825
824-	GATCTAGTCATAAAAATATCAAATTC <b>ATTGGC</b> ATTATCAATAGTATTCTC/TGCAATTT	-767
766-	CTCTACTAGCTAATATCCTCATCGAGATCATTGAACTCTACCAAAAGCTAACAGGAAT <b>C</b>	-708
707-	<b>TCCAAATCTTTACTCGGAATGACCCTCTTTGCATGGGG</b> TAACTCCATCTCTGATCTCAT	-649
648-	GTCCAATTTAGCAATGTCACAATTATACCAAAAACCTACCCACTCCAGAATCTCAAAAAT	-590
589-	CAGCTATAGCTACAAGATTTTTATCTATATCTTTGAGTGCTTGC <b>ATTGGT</b> GGGGTTTTG	-531
530-	TTGAACACTACAATAGGTATTGGACTAAGTTCTTTAATAGCAATGATTTTCAGATTTGG	-472
471-	AACATCATCTGTTACTGTAGCTTCC/TAAAGTAAACCTCAATTTATTCTAAGCATATCT	-414
413-	GTTATCTTTGCTACAATACTAGGTTTCGATATTTGTTCTAACAAGATACTTGGATGTGAT	-355
354-	TCAACAAAACACTAAGATTGTAGGGTTATC <b>ATTATGCA</b> <b>CCGTTTGGATGCTTGCC</b> ACAC	-296
295-	TGTTCAAT <b>TATACTT</b> ATTGAATTCGTTTGAAGTTAAACATTAGTAAAAATACT/cGTATTC	-238
237-	GAGCATTTTCATCTAGTAGTTTGGATCAAGTTTTTTTTGACATATGTATGC/TACG <b>TATATA</b>	-180
179-	<b>TATATA</b> CTGTATGCGCAGTGTCCGAAACCTTCTTTTTTTTTTTCATCATTTGCTCTTC	-121
120-	CACATTTTCGCTGTTTCAGGTTCAAATTTGACACAATTATGTCAGACATAATTAGCCGC	-62
61-	<b>TATTTAAG</b> AAAAAGTTGATTTTCAGAATAGCTTTCTTAGACAT <b>TATTTACTT</b> CAC <b>TTTTAT</b>	-3
2-	CAATG	-0

**Figura 12. Región río arriba del gen codificante para las lipasas putativas LIP3 (A) y YJR107W (B) de *K. marxianus* L-2029.** Azul: Probable secuencia codificante para elementos de respuesta a oleato (ORE). Morado: Probable secuencia de activación tipo 1 río arriba (UAS1). Verde: Probable secuencia caja TATA. Rojo: Probable secuencia caja CAAT. Amarillo: Probable secuencia caja GC. Negro: Codón de inicio del gen.

Además de los probables elementos presentes en la región promotora de ambos genes, también se determinó la presencia de las secuencias canónicas de transcripción TATA y CAAT, las cuales se han encontrado precediendo genes de lipasas muy estudiadas, como las pertenecientes a las de *C. rugosa* (Benjamin & Pandey, 1998). La caja TATA es uno de los elementos más usados para el ensamblamiento de la maquinaria de transcripción en promotores de levaduras; alrededor del 19 % de los genes de *S. cerevisiae* poseen dichas secuencias, que se encuentran aproximadamente a una distancia de 25 a 200 pb del codón de inicio (Basehoar *et al.*, 2004). Estas secuencias actúan en conjunto con las proteínas de unión TATA, y pueden ser impulsados por las cajas CAAT y GC, para el comienzo de la transcripción.

En el caso de la región promotora del gen LIP3 en *K. marxianus* L-2029, se encontró la presencia de varias secuencias probables de la caja TATA, especialmente dos cercanas al codón de inicio (Figura 12A); además de estas, se determinaron dos secuencias probables de la caja CAAT ubicadas río arriba de tales elementos, y una secuencia probable para la caja GC. Por su parte, en la región río arriba del codón de inicio del gen YJR107W, se ubicaron hasta cuatro secuencias probables de la caja TATA dentro de las primeras 200 pb cercanas al inicio de la transcripción, y dos secuencias probables de la caja CAAT.

En ambos casos se predijeron secuencias relacionadas a proteínas de unión a la caja TATA (TBP). Para el gen LIP3 dos secuencias fueron detectadas, 354 pb (TTTATTTCG) y 335 pb (AAAATAAAA), respectivamente; a su vez, para el gen YJR107W se ubicaron hasta 7 secuencias relacionadas a TBP: 1106 pb (TTTATCTC), 921 pb (TTTATCTC), 858 pb (TTTATCTT), 852 pb (TTTATATG), 809 pb (GTCATAAAA), 561 pb (TTTATCTA) y 422 pb (TTTATTCT) río arriba. Parece ser evidente que el inicio de la transcripción en estos dos genes está bajo la acción de dichas secuencias.

#### 6.1.4.4 MODELADO DE LAS LIPASAS EXTRACELULARES PUTATIVAS DE *K. marxianus* L-2029

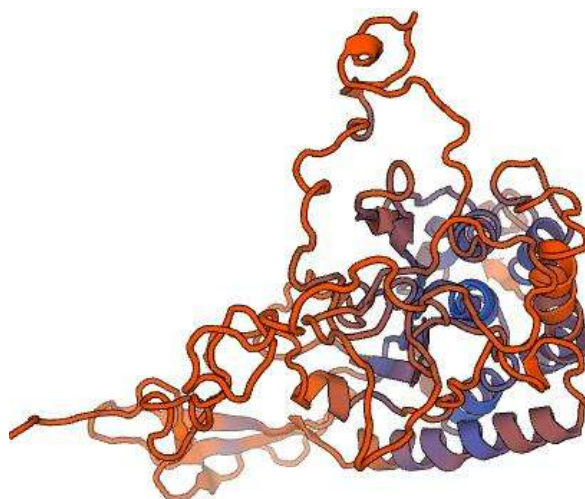
Para el modelamiento de las lipasas putativas de *K. marxianus* L-2029, *pLIP3* y *pYJR107W*, se usaron tres herramientas bioinformáticas: SwissModel, RaptorX y Phyre2.

La primera estructura para la lipasa *pLIP3* fue la generada con la herramienta SwissModel (Figura 13). La primera contradicción en cuanto a la generación del modelo, fue que los mejores templados detectados por dicha herramienta, no corresponden a enzimas de carácter hidrolítico,



siendo los transportadores de secreción ExoU, de *P. aeruginosa*, los mejores modelos de comparación. El templado más cercano a una actividad similar fue el correspondiente a una proteína del tipo patatina, hidrolasa lipídica que se encuentra principalmente en plantas; por ello, fue la elegida como la mejor opción para la generación de la estructura tridimensional. La herramienta SwissModel utiliza dos parámetros de calidad para evaluar la estructura generada: GMQE (Global Model Quality) que es una estimación de la calidad de la estructura que combina propiedades del alineamiento respecto al templado (rango de 0 a 1), y QMEAN que indica la mejor relación entre la estructura generada y las estructuras obtenidas experimentalmente con un tamaño similar (valores menores a -4 indican baja calidad). En este caso, se obtuvo un valor de GMQE de 0.28, siendo mucho menor a 1, lo que indica baja calidad, y un valor QMEAN de -7.73. Así, la estructura predicha no fue robusta y no representa la posible estructura de la lipasa *pLIP3*.

En el caso del modelo generado con la herramienta RaptorX (Figura 14), los templados usados para la generación del mismo fueron una patatina proveniente de *Solanum cardiophyllum*, y una proteína de transporte tipo patatina de *P. aeruginosa*. Se obtuvo una proteína con dos dominios, primera contradicción ya que las lipasas generalmente actúan como monómeros; los parámetros de calidad generados fueron: P-value  $2.27 \times 10^{-4}$ , uGDT(GDT) 137(34), uSeqID(SeqID) 30(7) y Score 172.



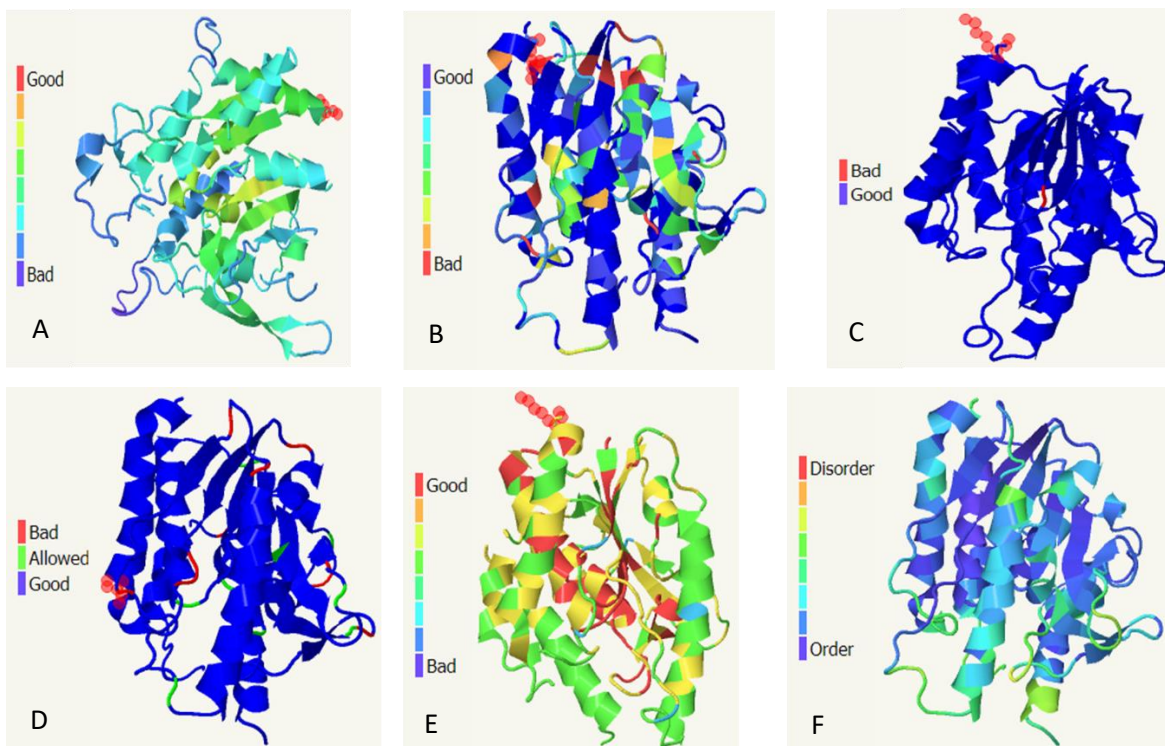
**Figura 13.** Modelo predicho por la herramienta SwissModel para la lipasa putativa extracelular *pLIP3*



**Figura 14. Modelo predicho por la herramienta RaptorX para la lipasa putativa extracelular *pLIP3***

El parámetro P-value es la probabilidad de que el modelo sea el de menor calidad dentro de un grupo de los mejores modelos generados para esta proteína, y se recomiendan valores menores a  $10^{-4}$ . GDT, por otro lado, es un score que denota el número de residuos con un error estimado en el modelo, mientras uGDT es su valor normalizado, dividiendo el valor GDT entre la longitud de la secuencia y multiplicado por 100; se recomienda un valor mayor a 50 para proteínas con más de 100 aminoácidos de uGDT. Por su parte, uSeqID representa el número de residuos idénticos en el alineamiento y SeqID son aquellos normalizados y multiplicados por 100; se recomienda un valor SeqID mayor a 30 % para proteínas con más de 200 aminoácidos. Finalmente, el parámetro Score es la cantidad de aminoácidos que se pudieron alinear y depende de la longitud de la secuencia, siendo mejor cuando este es alto. En el caso de la estructura generada, el parámetro P-value se encontró en el límite permitido; sin embargo, los demás parámetros se encontraron por debajo de los valores recomendados para poder afirmar que se trata de una buena predicción.

En el modelo generado a partir de la herramienta Phyre2, se usó como templatado nuevamente una proteína del tipo patatina, donde los mejores templatados pertenecían, así como con las herramientas mencionadas anteriormente, a la proteína transportadora ExoU.

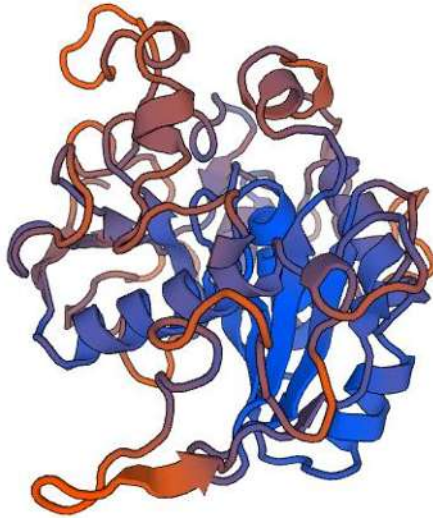


**Figura 15. Modelo predicho por la herramienta Phyre2 para la lipasa *pLIP3*.** Parámetros de calidad del modelo: A) Calidad general del modelo ProQ2, B) Choques, C) Rotámeros, D) Ramachandran, E) Confianza de alineamiento Hhsearch, F) Desorden Disopred.

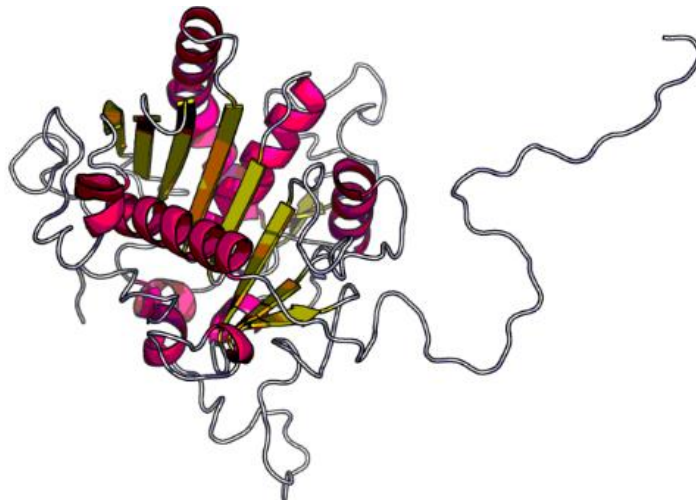
En la Figura 15, se muestra la estructura predicha por la herramienta Phyre2 para la lipasa *pLIP3*. De los parámetros de calidad usados por dicha herramienta, ProQ2 (Ray *et al.*, 2012) es un algoritmo que predice la calidad general del modelo; en el caso del modelo generado para *pLIP3*, dicho parámetro tiende a ser intermedio. El parámetro de choques entre residuos, determina si los átomos se encuentran muy cercanos en el modelo; a pesar de que se observan algunas regiones que presentan choques entre residuos en el modelo, la mayor parte de la estructura no mostró este problema. Los rotámeros son cadenas laterales que pudieron no ser modeladas idealmente por la posición de la cadena base o el alineamiento en esa región; de forma general, la estructura no presentó la presencia de dichas estructuras móviles. El análisis de Ramachandran evalúa problemas con la cadena base o los ángulos phi/psi; la mayoría de los residuos se encontraron correctamente posicionados o son permitidos en el modelo, y sólo algunas regiones menores presentaron baja calidad. La confianza de alineamiento, medida con la herramienta Hhsearch, fue intermedia a buena para la estructura. Finalmente, el desorden medido con la herramienta Disopred predice una estructura ordenada de forma general.

Revisando los diferentes parámetros de calidad, se podría decir que el modelo generado por Phyre2 para la lipasa putativa extracelular *pLIP3* fue de intermedia a buena.

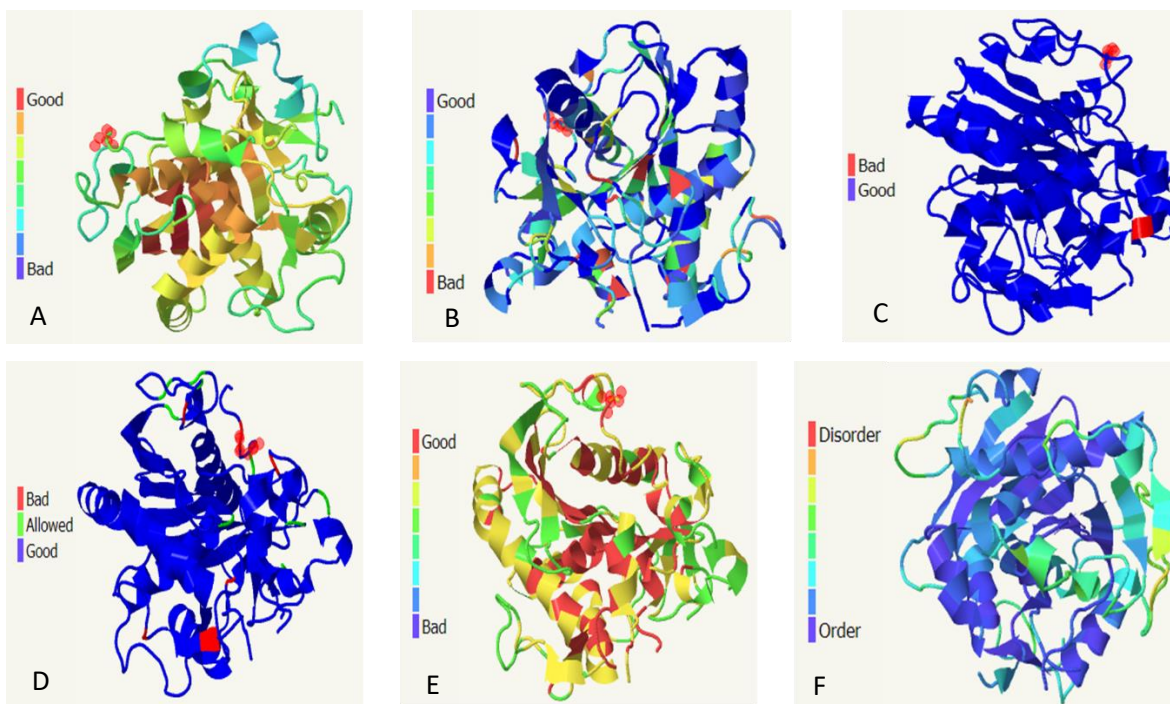
Para el modelo generado por la herramienta SwissModel para la lipasa putativa extracelular *pYJR107W*, el mejor templado encontrado para dicha secuencia fue la lipasa 2 de *Y. lipolytica*, por lo que fue utilizado para la generación de dicha estructura (Figura 16). En cuanto a los parámetros de calidad obtenidos, el valor GMQE fue de 0.57, el cual se encuentra por encima de la media, lo que predice un modelo regular, mientras el valor QMEAN es de -5.84, lo que indica una baja calidad del modelo. A pesar de tener un buen templado para la generación de la estructura, el modelo no representó una buena estructura para la lipasa putativa.



**Figura 16. Modelo predicho por la herramienta SwissModel para la lipasa *pYJR107W***



**Figura 17. Modelo predicho por la herramienta RaptorX para la lipasa *pYJR107W***



**Figura 18. Modelo predicho por la herramienta Phyre2 para la lipasa *pYJR107W*.** Parámetros de calidad del modelo: A) Calidad general del modelo ProQ2, B) Choques, C) Rotámetros, D) Ramachandran, E) Confianza de alineamiento Hsearch, F) Desorden Disopred.

Al parecer, el modelo predicho por la herramienta RaptorX (Figura 17) para la lipasa putativa *pYJR107W*, presentó buenos parámetros de calidad, siendo P-value de  $1.61 \times 10^{-9}$ , uGDT(GDT) 206(59), uSeqID(SeqID) 71(20) y Score 245. Todos los parámetros mencionados se encuentran en un rango aceptable conforme a lo mencionado anteriormente; sin embargo, claramente se observa en la estructura una región de la enzima no plegada correctamente. A pesar de ello, se trata de una buena aproximación de la estructura de la lipasa, usando como plantados la lipasa Lip2 de *Y. lipolytica*, la lipasa de *Gibberella zeae* y la lipasa de *Thermomyces lanuginosa*.

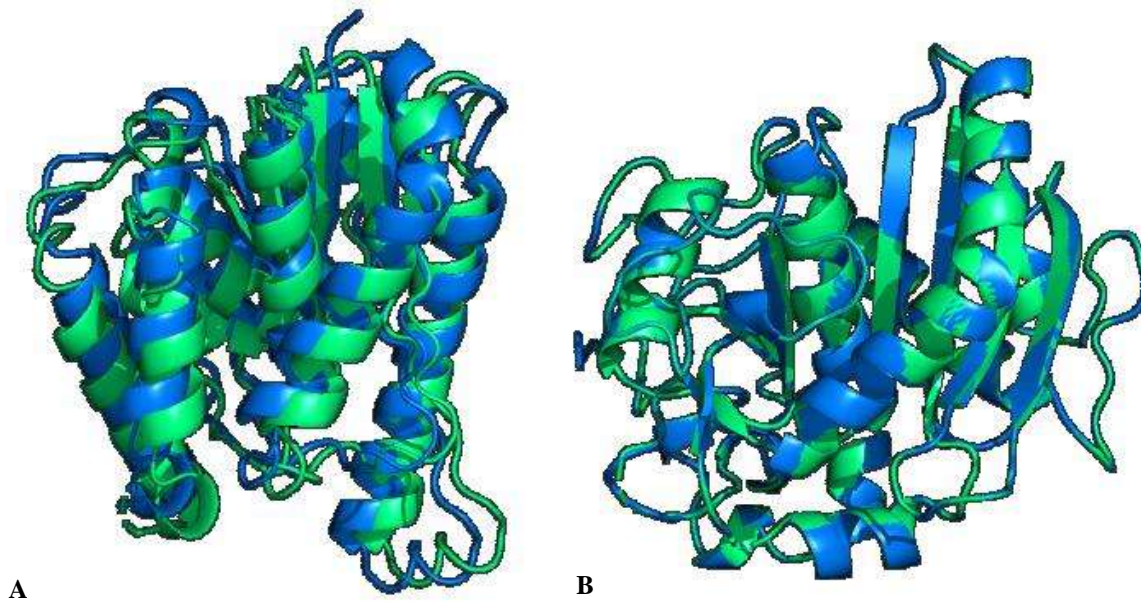
A pesar de que los mismos plantados fueron utilizados como los mejores para el modelamiento de esta lipasa usando la herramienta Phyre2 (Figura 18), el único usado para la generación de la estructura de esta lipasa fue la lipasa Lip2 de *Y. lipolytica* no glicosilada. La calidad general del modelo ProQ2 fue alta, con pocas regiones de calidad intermedia a baja. Sólo algunas regiones de la estructura, presentaron una baja calidad debido a posibles choques entre los residuos de la estructura, y prácticamente solo una región pudo haber no sido modelada idealmente de acuerdo al análisis de rotámetros. El análisis de Ramachandran denotó muy pocas

regiones de baja calidad, con un alto porcentaje en la confianza del alineamiento y una estructura bastante ordenada.

Con el fin de comprobar la estabilidad de los modelos generados para ambas lipasas putativas extracelulares, se llevó a cabo la superposición de dichos modelos generados en el software Phyre2 con el templatado usado para la formación de los mismos, usando los software SuperPose (Maiti *et al.*, 2004) y PyMOL; los modelos superpuestos con su respectivo templatado se muestran en la Figura 19A para la lipasa *pLIP3*, usando como referencia una proteína del tipo ExoU, y en la Figura 19B para la lipasa *pYJR107W*, usando como referencia la lipasa Lip2 de *Y. lipolytica*.

Para evaluar la similitud entre la estructura de dos proteínas se utiliza normalmente la desviación media cuadrática (RMSD, por sus siglas en inglés) entre pares de átomos de carbono  $\alpha$ , calculados después de la superposición óptima de las dos estructuras (Carugo, 2007). El valor general RMSD en el caso de la superposición del modelo de *pLIP3* fue de 6.935, y de 0.001 para la superposición del modelo de la lipasa putativa *pYJR107W*. De forma general, para interpretar el valor RMSD para evaluar la superposición de los modelos, al ser un estadístico que mide la desviación entre puntos específicos, se toma un valor de cero para concluir que las estructuras son idénticas, y un valor alto para distinguir una baja similitud entre las estructuras comparadas (Maiorov & Crippen, 1994).

Para el modelo generado para la lipasa putativa *pLIP3*, el valor RMSD obtenido fue alto, por lo que aparentemente no existe una alta similitud entre el modelo y el templatado usado como referencia. Sin embargo, el estadístico de comparación tiene muchas desventajas por como maneja la amplitud de los errores; dos estructuras que pueden ser idénticas, llegan a tener altos valores RMSD por la diferencia entre un solo bucle o la flexibilidad de una terminal (Kufareva & Abagyan, 2012). En el caso de la lipasa putativa *pYJR107W*, el valor RMSD es próximo a cero, lo cual supone una alta similitud entre el modelo generado y la lipasa cristalizada usada como referencia.

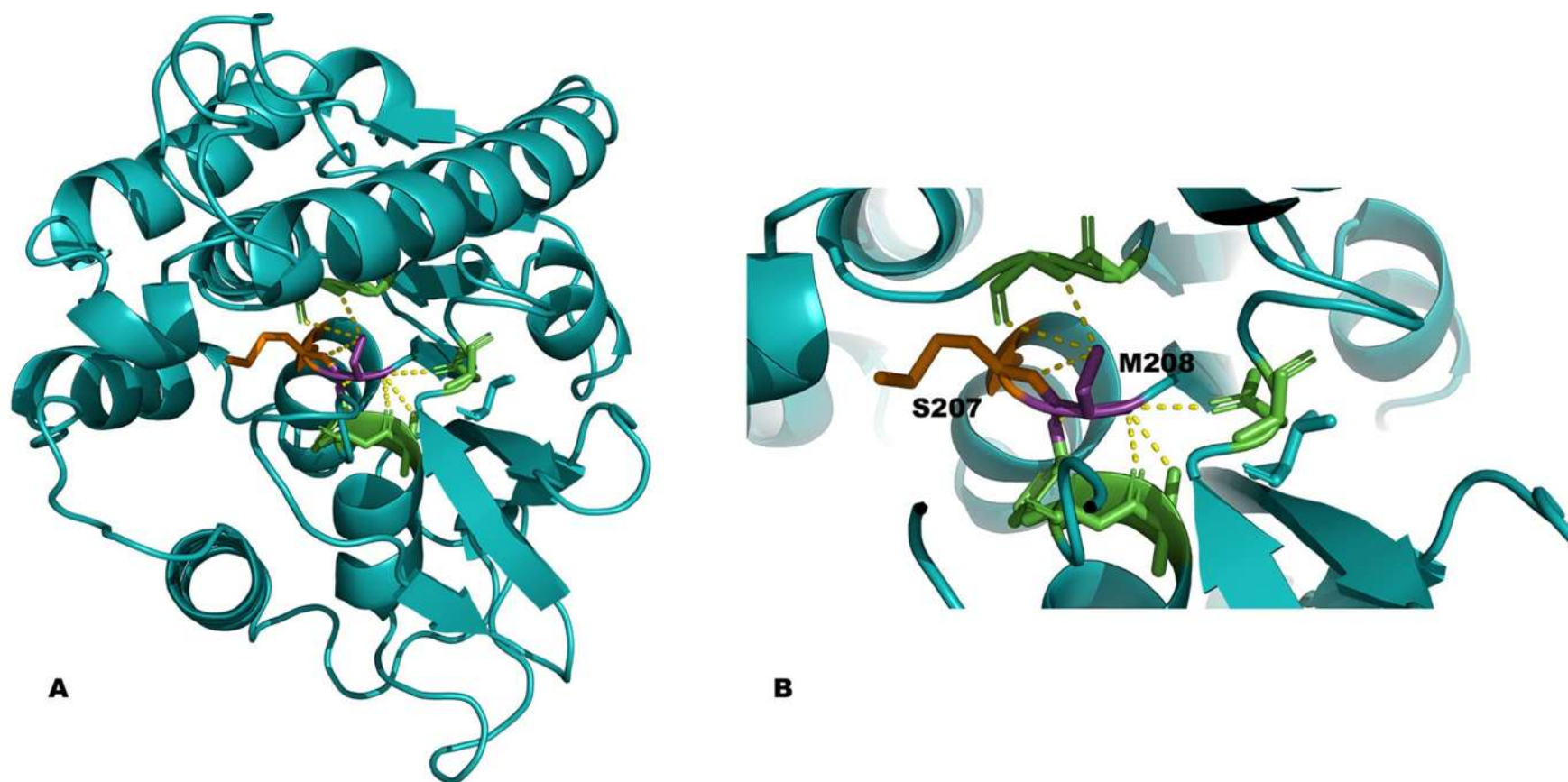


**Figura 19.** Superposición de los modelos generados con el software Phyre2 para las lipasas putativas extracelulares de *K. marxianus* L-2029. (A) Modelo de *pLIP3* (verde) superpuesta con la proteína usada como templado: proteína del tipo patatina (azul). (B) Modelo de *pYJR107W* (verde) superpuesta con la proteína usada como templado: Lip2 de *Y. lipolytica* (azul).

#### 6.1.4.5 DETERMINACIÓN DE CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES A PARTIR DEL MODELO DE LAS LIPASAS EXTRACELULARES PUTATIVAS DE *K. marxianus* L-2029

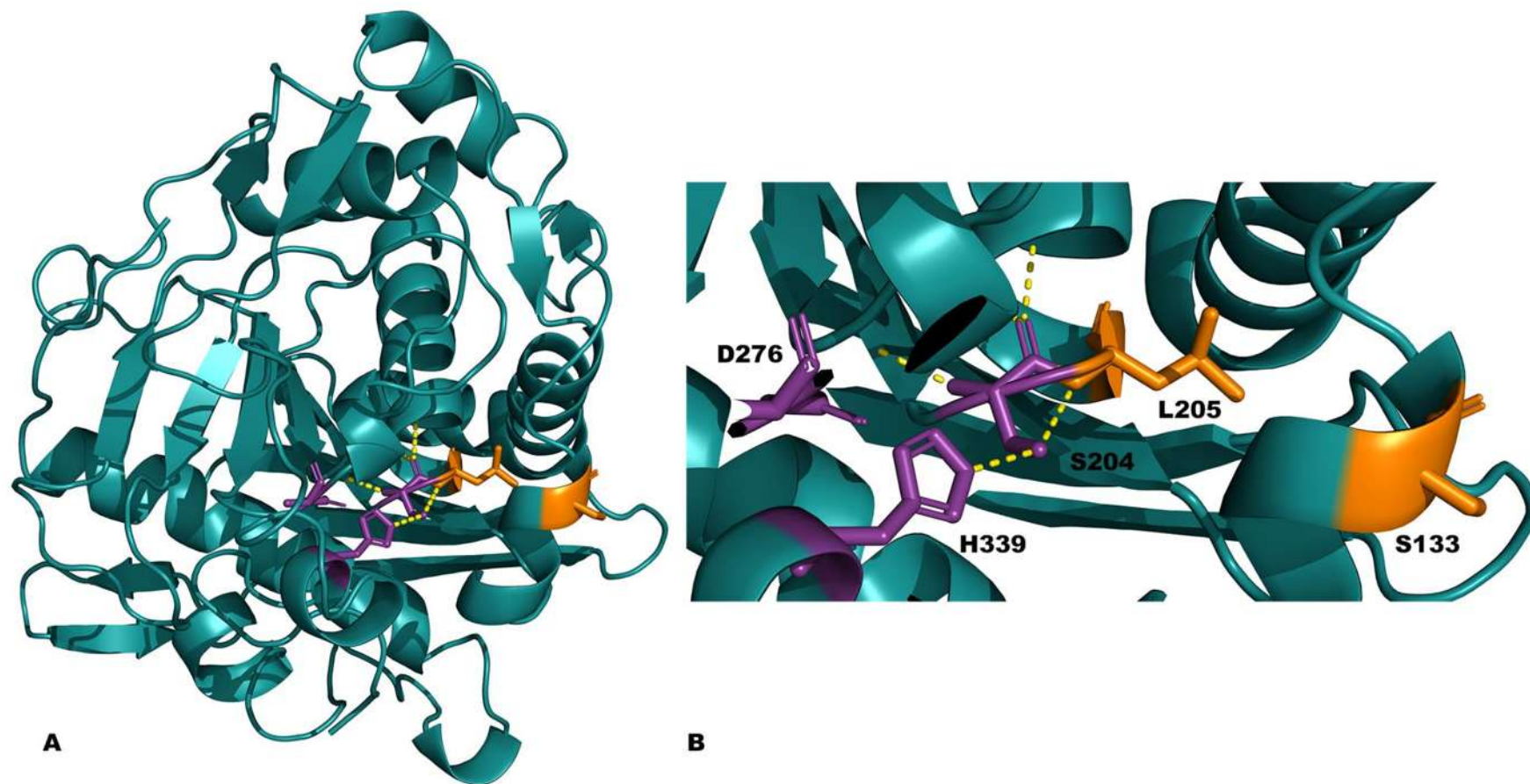
Para obtener más información sobre las propiedades de los modelos de lipasas extracelulares de *K. marxianus* L-2029, las estructuras secundarias se alinearon con aquellas de los templados utilizados para su construcción (Figura 22) y se realizó la identificación de residuos de aminoácidos importantes para la estructura de los modelos (Figuras 20B y 21B).

El análisis de la secuencia de aminoácidos de la lipasa *pLIP3* con la herramienta bioinformática ProDom permitió el reconocimiento de 15 dominios, todos ellos pertenecientes a enzimas hidrolasas del tipo patatin fosfolipasa. En la alineación de la estructura secundaria del modelo generado para LIP3 con la enzima patatina hidrolasa (Figura 22A), se reconocieron 9 dominios usando el software PSIPRED; todos ellos también pertenecen a enzimas hidrolíticas (datos no mostrados).

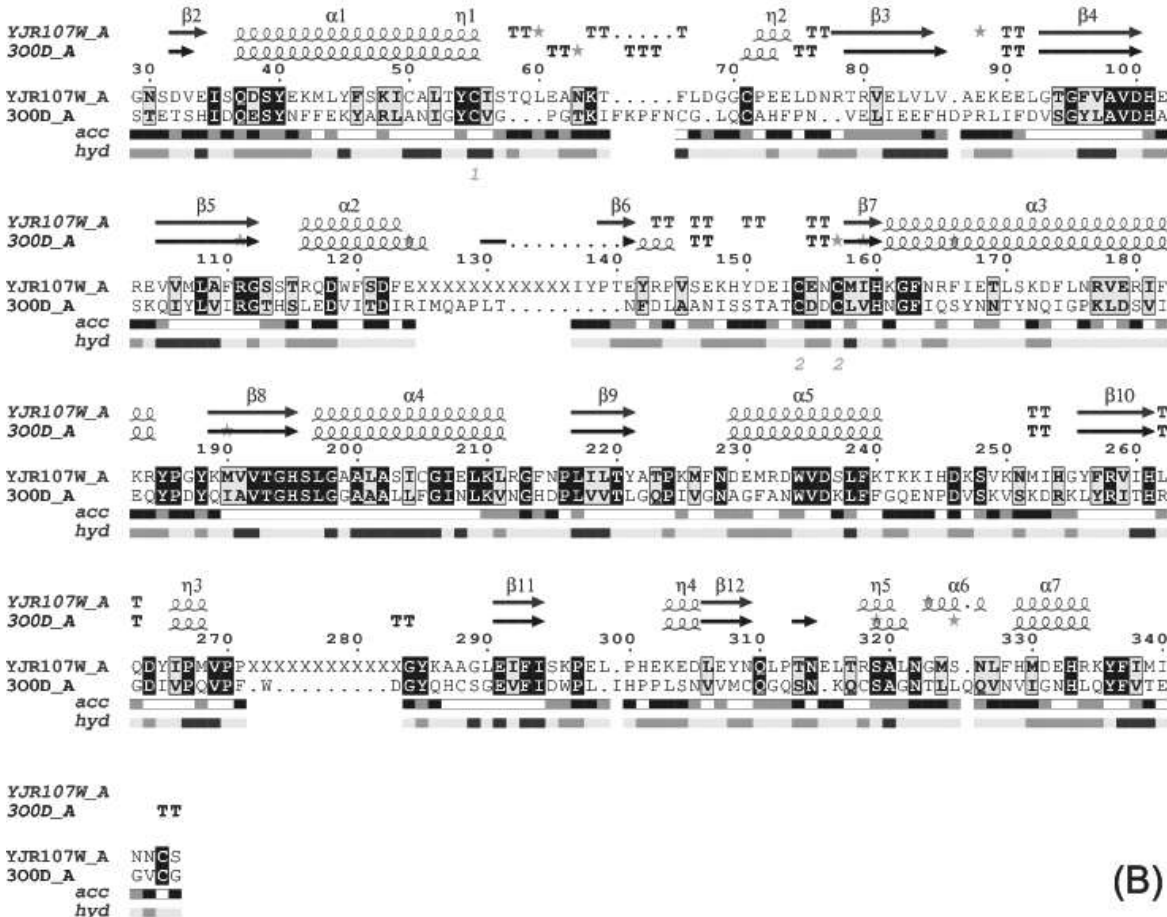
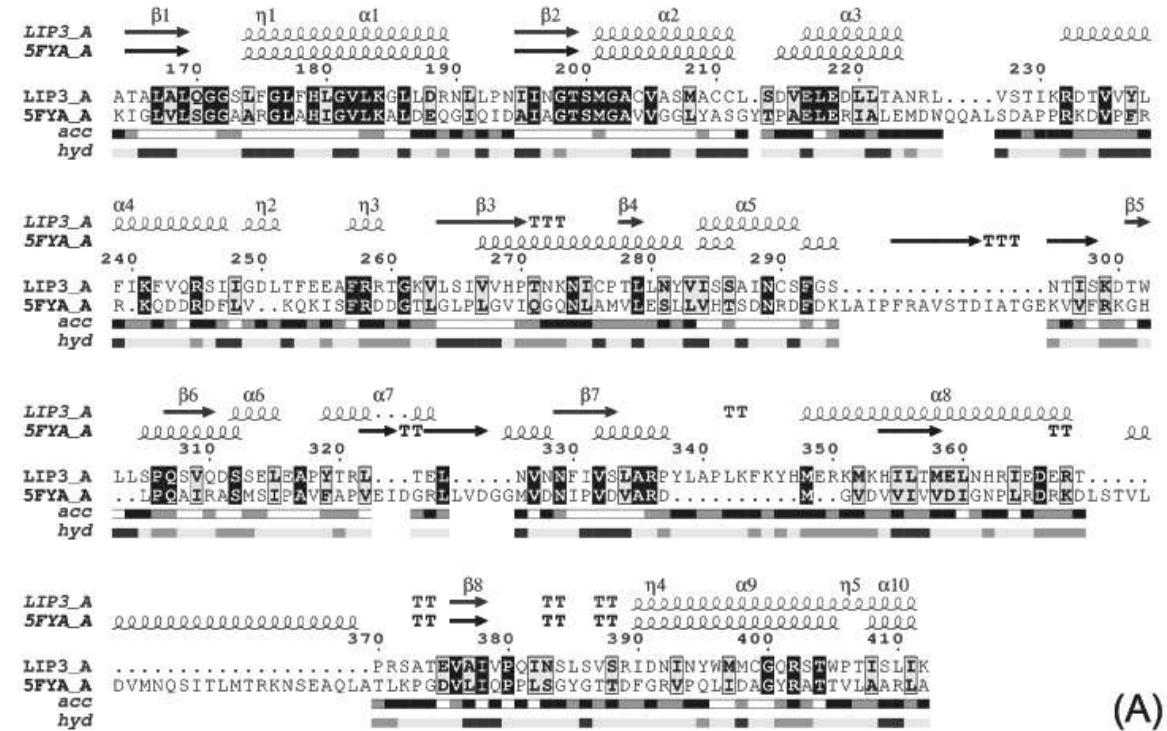


**Figura 20.** Características estructurales del modelo tridimensional de la lipasa putativa extracelular *pLIP3* de *K. marxianus* L-2029. (A) Modelo tridimensional; (B) Sitio activo del modelo: aminoácidos de la triada catalítica (morado), aminoácidos de la brecha oxianiónica (naranja) y aminoácidos que interactúan con la serina catalítica (verde).





**Figura 21.** Características estructurales del modelo tridimensional de la lipasa putativa extracelular *pYJR107W* de *K. marxianus L-2029*. (A) Modelo tridimensional; (B) Sitio activo del modelo: aminoácidos de la triada catalítica (morado), aminoácidos de la brecha oxianiónica (naranja) y aminoácidos que interactúan con la serina catalítica (verde).



**Figura 22. Alineamiento de la estructura secundaria de los modelos de las lipasas putativas de *K. marxianus***

**L-2029 con los templados usados para su obtención.** (A) Alineamiento del modelo de *pLIP3* e hidrolasa patatina y (B) alineamiento del modelo de *pYJR107W* y Lip2 de *Y. lipolytica*. Las hélices  $\alpha$  y  $\pi$  se muestran encima de las secuencias como  $\alpha$  o  $\eta$ , respectivamente. Las láminas  $\beta$  se representan con  $\beta$ . Las vueltas estrictas  $-\alpha$  y  $-\beta$  están marcadas como TTT y TT, respectivamente. Los residuos alineados en color negro tienen una baja similitud; los residuos encerrados en una caja gris tienen una gran similitud, mientras que los residuos encerrados en una caja negra y en color blanco son idénticos entre las secuencias. Los residuos en una conformación alternativa se resaltan con una estrella gris en la parte superior de la secuencia. La accesibilidad de la secuencia se muestra en una barra con una escala de color de blanco (no accesible) a negro (accesible). La hidropatía de la secuencia se muestra en una barra con una escala de colores que varía de blanco (hidrofilico) a negro (hidrofóbico). Los puentes disulfuro se muestran como pares de dígitos debajo de la barra hidropática.

La estructura del modelo de lipasa *pLIP3* mantiene el plegamiento  $\alpha/\beta$  convencional de este tipo de enzimas. El pentapéptido conservado detectado para la secuencia de *pLIP3*, donde se encuentra la serina catalítica (S207), tiene la secuencia GTSMG, la cual no coincide con ninguna familia de lipasas de hongos y levaduras, pero es filogenéticamente cercana a la de la familia abH23 (lipasas fúngicas- filamentosas), clase GX. Esto confirma la baja relación filogenética, comentada en secciones anteriores, de la lipasa *pLIP3* con respecto a las lipasas más conocidas y estudiadas, y reafirma la posibilidad de que pertenezca a una familia no descrita anteriormente. La poca información sobre la estructura de la patatina lipasa de referencia no permitió determinar la ubicación de los otros dos residuos de la tríada catalítica, y solo fue posible deducir uno de los residuos de la brecha oxianiónica y parte del pentapéptido conservado, que es un residuo de metionina (M208).

El software PyMOL permitió reconocer los residuos de aminoácidos alrededor de la serina catalítica del modelo predicho para la lipasa *pLIP3* (Figura 20). Sin embargo, no se observó interacción de este aminoácido con ningún residuo de histidina en la estructura (Figura 20B), que sería parte de la tríada catalítica; es probable que la supuesta proteína codificada por el gen *LIP3* no sea realmente una lipasa y pueda tener alguna otra actividad.

Como era de esperar, la estructura secundaria de *pLIP3* es altamente hidrofóbica, lo que puede estar relacionado con el fenómeno de activación interfacial. La posición de los sitios potenciales de puentes disulfuro no se reconoció en esta estructura.

Los dominios de hidrolasa también se reconocieron en la secuencia de aminoácidos de la lipasa *pYJR107W*; DomPred predijo 13 secuencias de dominio, mientras que la alineación de la

estructura secundaria (Figura 22B) del modelo de *pYJR107W* predicho usando como templado la lipasa Lip2 de *Y. lipolytica* determinó la presencia de 9 dominios de hidrolasa (datos no mostrados). El plegamiento de la lipasa *pYJR107W* es  $\alpha/\beta$ , compuesto por aproximadamente 7 hélices  $\alpha$  y 12 láminas  $\beta$ . El pentapéptido conservado se encuentra en los residuos 202 a 206, de la secuencia GHSLG, por lo que la serina nucleofílica se ubica en la posición 204. El residuo de aspartato, en la posición 276, y el residuo de histidina, en la posición 339, completan la tríada catalítica. La secuencia del pentapéptido es característica de la familia abH23.02 (lipasas del tipo *Saccharomyces*), la cual coincide con la predicha en el análisis filogenético, lo que confirma la alta relación de esta enzima con las lipasas pertenecientes a dicha familia. En el alineamiento, se determinó una diferencia entre uno de los residuos de la brecha oxianiónica, que es un residuo de treonina en la posición 121 en la lipasa de referencia, y una serina en el residuo 133 en el modelo de *pYJR107W*; sin embargo, se mantiene el carácter polar de ambos residuos. El otro residuo de la brecha oxianiónica, mencionado anteriormente en el pentapéptido, es un residuo de leucina en la posición 205. Al igual que en la lipasa putativa *pLIP3*, la superficie del modelo predicho para la lipasa *pYJR107W* parece ser altamente hidrófoba, y se reconocieron dos posiciones potenciales de formación de puentes disulfuro, que se muestran en la Figura 24B. El plegamiento de la tríada catalítica y la posición del oxianión, así como su interacción dentro del sitio catalítico se muestran en la Figura 21B.

### 6.1.5 CONCLUSIONES

Aunque se detectaron dos lipasas con actividad extracelular en *K. marxianus*, solo una de ellas (*pYJR107W*) parece ser responsable de la actividad de la lipasa extracelular en la cepa L-2029. Según los datos obtenidos del modelo de lipasa *pYJR107W*, pertenece a la familia abH23.02, clase GX, con un pentapéptido conservado GHSLG, una tríada catalítica S196, D264 y H333, y la brecha oxianiónica compuesta por L197 y S121. El gen que codifica dicha lipasa parece estar regulado por elementos de respuesta de oleato (ORE).

Además, todas las lipasas putativas de *K. marxianus* pertenecen a la clase GX, con pesos moleculares variables, en un rango de 44 KDa a 87 KDa. El análisis filogenético de todas las lipasas de *K. marxianus* reveló afinidades evolutivas con lipasas de abH15.03 (del tipo *S. cerevisiae* lipase 2), abH23.01 (tipo de *R. miehei* lipasa) y abH23.02 (tipo *Saccharomyces* lipasa) familias.

En el caso de las enzimas *pLIP3* y *pLIP5*, no se determinó ninguna relación con las familias de lipasas actualmente conocidas, por lo que podría ser parte de un grupo de hidrolasas aún no descritas; incluso el pentapéptido conservado detectado a partir del modelo tridimensional de la lipasa *pLIP3*, no coincidió en secuencia (GTSMG) con las lipasas fúngicas canónicas.

#### 6.1.6 LITERATURA CONSULTADA

- Arnold K, Lorenza B., Jürgen K., and Torsten, S. 2006. **“The SWISS-MODEL Workspace: A Web-Based Environment for Protein Structure Homology Modelling.”** *Bioinformatics* 22 (2): 195–201.
- Basehoar, A. D., S. J. Zanton, and B. F. Pugh. 2004. **“Identification and Distinct Regulation of Yeast TATA Box-Containing Genes.”** *Cell* 116 (5): 699–709.
- Benjamin, S., and A. Pandey. 1998. **“Candida rugosa Lipases: Molecular Biology and Versatility in Biotechnology.”** *Yeast* 14: 1069–87.
- Bjellqvist, B., Bodil B., Eydfinnur O., and Julio E. C. 1994. **“Reference Points for Comparisons of Two-Dimensional Maps of Proteins from Different Human Cell Types Defined in a pH Scale Where Isoelectric Points Correlate with Polypeptide Compositions.”** *Electrophoresis* 15 (1): 529–39.
- Bjellqvist, B., Graham J. H., Christian P., Nicole P., Florence R., Jean, C. C., Sanchez, Sverine, F., and Denis H. 1993. **“The Focusing Positions of Polypeptides in Immobilized pH Gradients Can Be Predicted from Their Amino Acid Sequences.”** *Electrophoresis* 14 (1): 1023–31.
- Biasini, M., S. Bienert, A. Waterhouse, K. Arnold, G. Studer, T. Schmidt, F. Kiefer, et al. 2014. **“SWISS-MODEL: Modelling Protein Tertiary and Quaternary Structure Using Evolutionary Information.”** *Nucleic Acids Research* 42 (W1): 252–58.
- Bienert, S., A. Waterhouse, T. De Beer, G. Tauriello, G. Studer, L. Bordoli, and T. Schwede. 2017. **“The SWISS-MODEL Repository-New Features and Functionality.”** *Nucleic Acids Research* 45 (D1): D313–19.
- Bordoli, L., Florian K., Konstantin A., Pascal B., James B., and Torsten S. 2009. **“Protein Structure Homology Modeling Using SWISS-MODEL Workspace.”** *Nature Protocols* 4 (1): 1–13.

- Borrelli, G. M., and Trono D. 2015. **“Recombinant Lipases and Phospholipases and Their Use as Biocatalysts for Industrial Applications.”** *International Journal of Molecular Sciences* 16 (9): 20774–840.
- Carugo, O. 2007. **“Statistical Validation of the Root-Mean-Square-Distance, a Measure of Protein Structural Proximity.”** *Protein Engineering, Design and Selection* 20 (1): 33–37.
- Casas-Godoy, L., S. Duquesne, F. Bordes, G. Sandoval, and A. Marty. 2009. **Lipases and Phospholipases: Methods and Protocols.** Edited by Georgina Sandoval. *Life Sciences* 531.
- Deive, F. J., M. Costas, and M. A. Longo. 2003. **“Production of a Thermostable Extracellular Lipase by *Kluyveromyces marxianus*.”** *Biotechnology Letters* 25 (17): 1403–6.
- Domínguez, de M. P., J. M. Sánchez-Montero, J. V. Sinisterra, and A. R. Alcántara. 2006. **“Understanding *Candida rugosa* Lipases: An Overview.”** *Biotechnology Advances* 24.
- Farré, D., R. Roset, M. Huerta, J. E. Adsuara, L. Roselló, M. M. Albà, and X. Messeguer. 2003. **“Identification of Patterns in Biological Sequences at the ALGGEN Server: PROMO and MALGEN.”** *Nucleic Acids Research* 31 (13): 3651–53.
- Fischer, M., and J. Pleiss. 2003. **“The Lipase Engineering Database: A Navigation and Analysis Tool for Protein Families.”** *Nucleic Acids Research* 31 (1): 319–21.
- Gasteiger, E., C. Hoogland, A. Gattiker, S. Duvaud, M. R. Wilkins, R D Appel, and A. Bairoch. 2005. **“Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server.”** *The Proteomics Protocols Handbook*, 571–607.
- González-Hernández, J. C., E. Pérez, R. M. Damián, and M. C. Chávez-Parga. 2012. **“Isolation, Molecular and Fermentative Characterization of a Yeast Used in Ethanol Production during Mezcal Elaboration.”** *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 11 (3): 389–400.
- Guex, N., M. C. Peitsch, and T. Schwede. 2009. **“Automated Comparative Protein Structure Modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: A Historical Perspective.”** *Electrophoresis* 30: 162–73.
- Gupta, R., N. Gupta, and P. Rathi. 2004. **“Bacterial Lipases: An Overview of Production, Purification and Biochemical Properties.”** *Applied Microbiology and Biotechnology* 64 (6): 763–81.
- Gupta, R., A. Kumari, P. Syal, and Y. Singh. 2015. **“Molecular and Functional Diversity of Yeast and Fungal Lipases: Their Role in Biotechnology and Cellular Physiology.”** *Progress in Lipid Research* 57: 40–54.

- Gurvitz, A., and H. Rottensteiner. 2006. **“The Biochemistry of Oleate Induction: Transcriptional Upregulation and Peroxisome Proliferation.”** *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1763 (12): 1392–1402.
- Hsu, K.-H., G.-C. Lee, and J.-F. Shaw. 2008. **“Promoter Analysis and Differential Expression of the *Candida rugosa* Lipase Gene Family in Response to Culture Conditions.”** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56 (6): 1992–98.
- Jeong, H., D. H. Lee, S. H. Kim, H. J. Kim, K. L., J. Y. Song, B. K. Kim, et al. 2012. **“Genome Sequence of the Thermotolerant Yeast *Kluyveromyces marxianus* Var. *marxianus* KCTC 17555.”** *Eukaryotic Cell* 11 (12): 1584–85.
- Källberg, M., H. Wang, S. Wang, J. Peng, Z. Wang, H. Lu, and J. Xu. 2012. **“Template-Based Protein Structure Modeling Using the RaptorX Web Server.”** *Nat. Protocols* 7 (8): 1511–22.
- Katoh, K., and D. M. Standley. 2013. **“MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability.”** *Molecular Biology and Evolution* 30 (4): 772–80.
- Kelley, L. A., S. Mezulis, C. M. Yates, M.N. Wass, and M. J. E. Sternberg. 2015. **“The Phyre2 Web Portal for Protein Modelling, Prediction, and Analysis.”** *Nature Protocols* 10 (6): 845–58.
- Kiefer, F., K. Arnold, M. Künzli, L. Bordoli, and T. Schwede. 2009. **“The SWISS-MODEL Repository and Associated Resources.”** *Nucleic Acids Research* 37: 387–92.
- Kopp, J. 2006. **“The SWISS-MODEL Repository: New Features and Functionalities.”** *Nucleic Acids Research* 34 (90001): D315–18.
- Kufareva, I., and R. Abagyan. 2012. **“Methods of Protein Structure Comparison.”** *Methods of Molecular Biology* 857: 231–57.
- Lane, M. M., N. Burke, R. Karreman, K. H. Wolfe, C. P. Oapos;Byrne, and J. P. Morrissey. 2011. **“Physiological and Metabolic Diversity in the Yeast *Kluyveromyces marxianus*.”** *Antonie van Leeuwenhoek* 100 (4): 507–19.
- Lane, M. M., and J. P. Morrissey. 2010. **“*Kluyveromyces marxianus*: A Yeast Emerging from Its Sister’s Shadow.”** *Fungal Biology Reviews* 24 (1-2): 17–26.
- Lee, K. S., J. S. Kim, P. Heo, T. J. Yang, Y. J. Sung, Y. Cheon, H. M. Koo, et al. 2013. **“Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* Promoters for Heterologous Gene**

- Expression in *Kluyveromyces marxianus*.**” *Applied Microbiology and Biotechnology* 97 (5): 2029–41.
- Lertwattanasakul, N., T. Kosaka, A. Hosoyama, Y. Suzuki, N. Rodrussamee, M. Matsutani, M. Murata, et al. 2015. “**Genetic Basis of the Highly Efficient Yeast *Kluyveromyces marxianus*: Complete Genome Sequence and Transcriptome Analyses.**” *Biotechnology for Biofuels* 8 (1): 47.
- Liu, K., T. J. Warnow, M. T. Holder, S. M. N., J. Yu, A. P. Stamatakis, and C. R. Linder. 2012. “**SATé-II: Very Fast and Accurate Simultaneous Estimation of Multiple Sequence Alignments and Phylogenetic Trees.**” *Systematic Biology* 61 (1): 90–106.
- Ma, J, S. Wang, F. Zhao, and J. Xu. 2013. “**Protein Threading Using Context-Specific Alignment Potential.**” *Bioinformatics* 29 (13): 257–65.
- Maiti, R., G. H. Van Domselaar, H. Zhang, and D. S. Wishart. 2004. “**SuperPose: A Simple Server for Sophisticated Structural Superposition.**” *Nucleic Acids Research* 32: 590–94.
- Messeguer, X., R. Escudero, D. Farré, O. Núñez, J. Martínez, and M. M. Albà. 2002. “**PROMO: Detection of Known Transcription Regulatory Elements Using Species-Tailored Searches.**” *Bioinformatics* 18 (2): 333–34.
- Peng, J., and J. Xu. 2011. “**Raptorx: Exploiting Structure Information for Protein Alignment by Statistical Inference.**” *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics* 79: 161–71.
- Peng, J., and J. Xu. 2011. 2012. “**A Multiple-Template Approach to Protein Threading.**” *Proteins* 76 (6): 1930–39.
- Petersen, T. N., S. Brunak, G. von Heijne, and H. Nielsen. 2011. “**SignalP 4.0: Discriminating Signal Peptides from Transmembrane Regions.**” *Nature Methods* 8 (10): 785–86.
- Pleiss, J., M. Fischer, M. Peiker, C. Thiele, and R. D. Schmid. 2000. “**Lipase Engineering Database: Understanding and Exploiting Sequence-Structure-Function Relationships.**” *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 10 (5): 491–508.
- Ray, A., E. Lindahl, and B. O. Wallner. 2012. “**Improved Model Quality Assessment Using ProQ2.**” *BMC Bioinformatics* 13 (224): 1–12.
- Robert, X., and P. Gouet. 2014. “**Deciphering Key Features in Protein Structures with the New ENDscript Server.**” *Nucleic Acids Research* 42 (W1): 320–24.



- Ronquist, F., M. Teslenko, P. Van Der Mark, D. L. Ayres, A. Darling, S. Höhna, B. Larget, L. Liu, M. A. Suchard, and J. P. Huelsenbeck. 2012. “**MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice across a Large Model Space.**” *Systematic Biology* 61 (3): 539–42.
- Stamatakis, A. 2006. “**RAxML-VI-HPC: Maximum Likelihood-Based Phylogenetic Analyses with Thousands of Taxa and Mixed Models.**” *Bioinformatics* 22 (21): 2688–90.
- Stergiou, P.-Y., A. Foukis, H. Sklivaniti, P. Zacharaki, M. Papagianni, and E. M. Papamichael. 2012. “**Experimental Investigation and Optimization of Process Variables Affecting the Production of Extracellular Lipase by *Kluyveromyces marxianus* IFO 0288.**” *Applied Biochemistry and Biotechnology* 168 (3): 672–80.
- Swofford, D. L. 2002. “**PAUP\*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and Other Methods),**” Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massach.
- Tan, C. H-, P. L. Show, C. W. Ooi, E.-P. Ng, J. Chi-Wei Lan, and T. Chuan Ling. 2015. “**Novel Lipase Purification Methods - a Review of the Latest Developments.**” *Biotechnology Journal* 10 (1): 31–44.
- Wallace, I. M., O. O’Sullivan, D. G. Higgins, and C. Notredame. 2006. “**M-Coffee: Combining Multiple Sequence Alignment Methods with T-Coffee.**” *Nucleic Acids Research* 34 (6): 1692–99.

## 6.2 CAPÍTULO II: IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LAS LIPASAS EXTRACELULARES DE *K. marxianus* L-2029 EXPRESADAS HETERÓLOGAMENTE EN *S. cerevisiae* BY4742

### 6.2.1 RESUMEN

Las lipasas son enzimas capaces de catalizar reacciones de hidrólisis de triglicéridos; son usadas en numerosos procesos dentro de la industria alimenticia, energética, farmacéutica, etc. Ante la necesidad de buscar nuevas alternativas de este tipo de enzimas con potenciales aplicaciones biotecnológicas respecto a las lipasas usadas comercialmente, se han buscado nuevos sistemas capaces de sintetizarlas. *K. marxianus* es una levadura que presenta actividad lipásica, en la cual se ha detectado la presencia de hasta 8 probables lipasas en su genoma. El objetivo principal de este trabajo fue determinar las propiedades bioquímicas de las lipasas extracelulares de la cepa *K. marxianus* L2029, codificadas en los genes LIP3 y YJR107W, expresadas heterológamente en *S. cerevisiae* BY4742. Los dos genes fueron identificados en la cepa *K. marxianus* L2029 y posteriormente fueron insertados en el vector de expresión lanzadera pYES2.1/V5-His-TOPO®. Los plásmidos correspondientes construidos con ambos genes fueron propagados en *E. coli* TOP10F', y usados para la obtención de transformantes de *S. cerevisiae*. El extracto proteico de la transformante inducida con galactosa para el gen LIP3 no mostró actividad lipásica; por otro lado, la proteína recombinante *pYJR107W* tuvo un máximo de actividad de 0.397 U/mL. La lipasa mostró tener una temperatura óptima de 37° C y un pH óptimo de 6, los cuales son comparables con extractos enzimáticos obtenidos de la cepa original.

### ABSTRACT

Lipases are enzymes responsible for catalyzing triglyceride hydrolysis reactions; they are used in many processes within the food, energy, pharmaceutical, and other industries. Given the need to find new alternatives of this type of enzymes with possible biotechnological applications regarding commercially used lipases, new systems have been sought to synthesize them. *K. marxianus* is a yeast with lipase activity, in which the presence of up to 8 probable lipases in its genome has been detected. The main objective of this work was to determine the biochemical properties of the extracellular lipases of the strain *K. marxianus* L2029, encoded in the genes

LIP3 and YJR107W, expressed heterologously in *S. cerevisiae* BY4742. The two genes were identified in the strain *K. marxianus* L2029 and subsequently inserted in the shuttle expression vector pYES2.1 / V5-His-TOPO®. The corresponding plasmids, constructed with both genes, were propagated in *E. coli* TOP10F', and then used to obtain the *S. cerevisiae* transformants. The protein extract of the galactose-induced transformant with the LIP3 gene had not lipase activity; on the other hand, the recombinant protein *pYJR107W* had a maximum activity of 0.397 U/mL. The lipase had an optimum temperature of 37 ° C and an optimum pH of 6, which are comparable with specific enzyme extracts of the wild type strain.

### 6.2.2 INTRODUCCIÓN

Las lipasas son enzimas que catalizan una amplia variedad de reacciones, como la hidrólisis parcial o total de triacilglicéridos, y reacciones de síntesis, que se clasifican en dos principales tipos de reacciones: esterificación y transesterificación (Colla *et al.*, 2010). Son enzimas de serina definidas como triacilglicerol acilhidrolasas (E.C. 3.1.1.3), capaces de hidrolizar ésteres carboxílicos de acilglicerol de cadena larga, con cadenas mayores a 10 átomos de carbono, lo que las distingue de las estereasas (Casas-Godoy *et al.*, 2009).

Este tipo de enzimas tienen una alta importancia en la industria gracias a sus múltiples aplicaciones en la degradación de sustratos con alto contenido graso, así como en reacciones de esterificación en la industria alimenticia, papelera, farmacéutica, energética y cosmética (Diez & Sandoval, 2012).

Las lipasas realizan diferentes funciones fisiológicas. En eucariotas, son componentes clave del metabolismo de lípidos y lipoproteínas, por lo que son producidas en el sistema digestivo (Sharma *et al.*, 2001). En insectos, son encontradas principalmente en músculos, plasma, órganos digestivos y glándulas mamarias; en plantas se localizan principalmente en las semillas, como parte de los tejidos de reserva de energía (Pahoja & Sethar, 2002). Sin embargo, las lipasas microbianas son mucho más versátiles y presentan características notables como estabilidad en solventes orgánicos, actividad bajo diversas condiciones, alta especificidad de sustrato y amplia selectividad (Kempka *et al.*, 2008; Tan *et al.*, 2015).

Los microorganismos con una alta capacidad para producir lipasas pueden ser encontrados en diferentes hábitats, principalmente en desechos o residuos de aceites vegetales empleados en la elaboración de frituras, industrias de productos lácteos, suelos contaminados con aceites y

alimentos deteriorados. Se han aislado bacterias, hongos filamentosos y levaduras, entre los que sobresalen *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Staphylococcus*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Candida*, *Aspergillus*, *Penicillium* y *Geotrichum* spp. por su capacidad para producir lipasas extracelulares (Ertuğrul *et al.*, 2007; Yadav *et al.*, 1998). A pesar de ello, la producción de lipasas para uso industrial se ha enfocado en las obtenidas solo por algunas especies, que en muchas ocasiones presentan una falta de reproducibilidad o de ciertas características deseables para procesos específicos (Vakhlu & Kour, 2006). Alternativas de producción se han buscado continuamente, en busca de enzimas con características potenciales para diversas aplicaciones biotecnológicas.

En ese sentido, *K. marxianus* es una levadura no convencional homotética, hemiascomiceta, filogenéticamente relacionada a *S. cerevisiae* (Lane *et al.*, 2011), que presenta actividad lipásica, con características deseables para su aplicación en diversos procesos biotecnológicos: asimila azúcares clave, tiene una tasa de crecimiento rápida, con tiempo de duplicación aproximado de 70 minutos, es termotolerante, con la habilidad de crecer hasta 52° C, y tiene una alta capacidad secretoria (Jeong *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2013).

Existen pocos reportes del estudio de las lipasas producidas por *K. marxianus*. Su actividad lipolítica fue reportada por primera vez por Deive *et al.* (2003), los cuales indujeron su producción con ácido oleico, ácido palmítico, aceite de oliva, aceite de maíz, glicerol y tributirina; el extracto enzimático obtenido, con baja actividad lipásica, presentó estabilidad a 50° C y pH ácido, además de alta estabilidad en presencia de solventes orgánicos. Por su parte, Stergiou *et al.* (2012) estudiaron la influencia del pH y la temperatura sobre la producción de lipasas con esta levadura; la optimización en los rangos utilizados de cada variable determinó que las mejores condiciones son pH de 6.4 y temperatura de 32.5° C. El nivel máximo de actividad logrado fue de 0.168 U/mL. Además, la actividad lipásica de la cepa *K. marxianus* L-2029 fue detectada recientemente por nuestro grupo de trabajo, cuya inducción de la síntesis de lipasas fue usando aceite de aguacate (Anexo 10.4), el cual tiene un alto contenido de ácido oleico y otros ácidos grasos de cadena larga, en forma de triglicéridos (USDA, 2011). En dicho análisis, se determinó que la concentración de 3.5 % v/v de aceite, es la que mejor promueve la síntesis de lipasas y que la temperatura óptima del extracto enzimático es de 36° C, a un pH de 6.

Tomando como referencia el genoma secuenciado de la cepa *K. marxianus* DMKU 3-1042 (Lertwattanasakul *et al.*, 2015), se hizo una búsqueda de probables secuencias codificantes para

lipasas en la base de datos del Centro Nacional para la Información en Biotecnología (NCBI, por sus siglas en inglés); se detectaron 8 lipasas putativas en el genoma en cuestión. Como se mencionó en la sección anterior, se identificaron dos de ellas, denominadas *pLIP3* y *pYJR107W*, como las probables responsables de la actividad lipásica extracelular. Sin embargo, no existe información acerca de las características bioquímicas de dichas lipasas, para ser consideradas como una alternativa en ciertos procesos industriales. Así, el objetivo principal de este estudio fue identificar las lipasas extracelulares en la cepa *K. marxianus* L-2029 y expresar heterológamente dichas enzimas en un sistema heterólogo, como lo es *S. cerevisiae* BY4742, que facilitó diferencias las características bioquímicas de las dos lipasas putativas extracelulares.

### 6.2.3 MATERIALES Y MÉTODOS

#### 6.2.3.1 LEVADURAS UTILIZADAS EN EL ESTUDIO

La cepa utilizada en este estudio, *K. marxianus* L-2029 (ver sección 6.1.3.1). Para el mantenimiento y crecimiento de la levadura se utilizó medio de cultivo agar YPD: 2 % glucosa, 1 % peptona, 1 % extracto de levadura, 2 % agar.

En el caso de la levadura usada para la transformación, se seleccionó una cepa auxotrófica para uracilo, *S. cerevisiae* BY4742, por las características del plásmido de transformación, que serán comentadas en apartados posteriores. Para el mantenimiento, transformación, propagación e inducción de las enzimas recombinantes se utilizó medio mínimo SMM: 0.192 % suplemento sintético sin uracilo, Drop-out Sigma®, 0.67 % suplemento base de nitrógeno sin aminoácidos Sigma®, 2 % glucosa, 2 % agar; además, para medio de control positivo se añadió 0.0067 % uracilo.

#### 6.2.3.2 IDENTIFICACIÓN DE LIPASAS PUTATIVAS EN LA CEPA *K. marxianus* L-2029

Para la identificación de las 2 lipasas putativas extracelulares, obtenidas de la base de datos GenBank, con números de acceso: BAO41717.1 (*pYJR07W*) y BAO38130.1 (*pLIP3*), cuyas secuencias se muestran en el Anexo 10.2, se diseñaron *primers* específicos y se amplificaron por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los fragmentos de ADN amplificados, fueron analizados para una comprobación parcial por digestión con enzimas de restricción. La

estrategia metodológica de la segunda etapa experimental del proyecto se muestra en la Figura 23.

#### 6.2.3.3 EXTRACCIÓN DE ADN DE *K. marxianus* L-2029

Previo a la amplificación de los genes de las lipasas putativas extracelulares, se extrajo el ADN genómico de la levadura *K. marxianus* L-2029 (Sambrook & Russell, 2001). Se inocularon 50 mL de medio YPD y se llevaron a incubación durante 6 h, en agitación, a 30° C, para promover la fase exponencial de la levadura. Pasado dicho tiempo, el medio se transfirió a tubos Eppendorf y se centrifugó a 3500 rpm durante 5 min. El sobrenadante se eliminó y se hizo un lavado con 500 µL agua destilada estéril por cada tubo. Una vez centrifugado y eliminada el agua destilada, se añadieron, por tubo, 200 µL de solución TSNTTE (tritónX-100 2 %, SDS 10 %, NaCl 500 mM, Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM), 200 µL de mezcla fenol:cloroformo:alcohol isoamílico y perlas de vidrio estériles.

Para provocar la lisis de la pared y membrana celular, se agitó en vórtex por 1 min y se dejó reposar 1 min, en 3 ciclos. Al finalizar, se añadieron 200 µL de TAE 1X (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM) y se centrifugó por 5 min a 13000 rpm. El sobrenadante de cada tubo, conteniendo el ADN genómico, se transfirió a tubos nuevos estériles, a los cuales se les añadió 1 mL de etanol absoluto (a -20° C) y se mezcló cuidadosamente por inversión. Posteriormente, se incubó a -80° C por 10 min. Se centrifugó el precipitado a máxima velocidad durante 5 min, y se eliminó el sobrenadante. La pastilla se lavó con etanol 70 % y se repitieron los pasos anteriores.

La pastilla obtenida se dejó secar por 20 min y se resuspendió en 100 µL de agua libre de nucleasas. Finalmente, para eliminar fragmentos de RNA, se añadieron 3 µL de RNAasa A y se incubó a 37° C por 5 min.

#### 6.2.3.4 CUANTIFICACIÓN DE ADN

A partir del ADN extraído como se mencionó en el apartado anterior, se tomaron 2 µL y se diluyeron en 48 µL de agua libre de nucleasas, en una celda de cuarzo con capacidad de 50 µL. Posteriormente se determinó la absorbencia a dos longitudes de onda: 260 y 280 nm. Con el fin de obtener la concentración de ADN en las muestras extraídas, se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración } \left( \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right) = \text{Abs } 260 * \text{Factor de Corrección} * \text{Factor de Dilución}$$

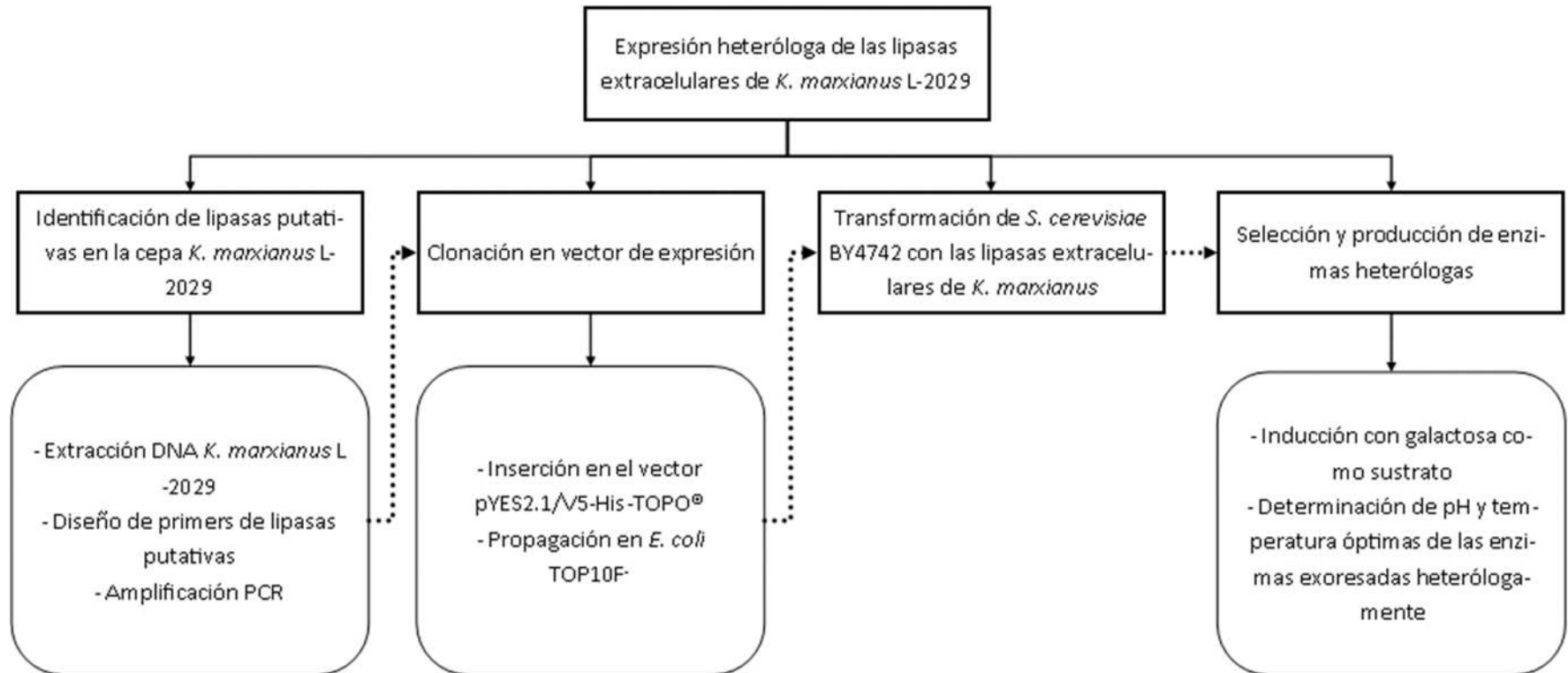


Figura 23. Estrategia metodológica para la identificación, clonación, transformación y producción de las lipasas extracelulares de *K. marxianus* L-2029

El factor de corrección utilizado para ADN es de 50, ya que una Unidad de Absorbencia, a longitud de onda de 260 nm, corresponde aproximadamente a 50 µg/mL de ADN de doble cadena. El factor de integridad (FI) se calculó dividiendo la absorbencia a 260 nm entre la absorbencia a 280 nm, que determina la presencia de fragmentos de ADN, o bien ADN degradado.

#### 6.2.3.5 ELECTROFORESIS DE ADN

Con el fin de corroborar la extracción de ADN y la integridad del mismo, se llevó a cabo una electroforesis con bromuro de etidio como revelador y azul de bromofenol como buffer de carga. El gel se elaboró diluyendo 0.5 g de agarosa en 50 mL de TAE 1X, para una concentración final de 1 %, por ciclos de calentamiento en microondas cada 10 s durante 1 min. A la solución se le agregó un volumen de 2.5 µL de bromuro de etidio, de un stock de 10 mg/mL, para una concentración final de 0.5 µg/mL. La solución se vació al molde del gel de electroforesis (previamente armado), y se colocó el peine para generar los pozos para cargar las muestras.

Las muestras se prepararon agregando 9 µL de ADN extraído y 1 µL de azul de bromofenol (en glicerol al 30 %). Una vez montado el gel en el aparato para electroforesis y en solución TAE 1X, marca Galileo®, las muestras se cargaron en los pozos correspondientes. Todas las electroforesis realizadas se llevaron a corriente de 90 V por 40 min utilizando un Power Supply®.

Una vez concluido el tiempo, el gel se colocó en la bandeja para luz UV con papel adherente y se introdujo al equipo ImageLab®. Con el software correspondiente se obtuvieron las imágenes correspondientes.

#### 6.2.3.6 DISEÑO DE *PRIMERS* DE LAS LIPASAS PUTATIVAS DE *K. marxianus* L-2029

*Primers* de los genes de las lipasas putativas extracelulares (*pLIP3* y *pYJR107W*) de *K. marxianus*, reconocidas a partir del análisis bioinformático de las secuencias de las 8 probables lipasas, fueron diseñados tanto para la identificación de las mismas en la cepa L-2029, como para su correcta inserción en el vector de clonación y expresión, pYES2.1/V5-His-TOPO®, cuyas características se enumeran más adelante. Por tanto, los *primers* fueron diseñados para amplificar desde el codón de inicio con secuencia ATG, y eliminando el codón de término de la



misma secuencia. Las secuencias de los *primers* para cada uno de los genes implicados se muestran en la Tabla 6.

Todos los *primers* fueron diseñados en el software DNA STAR®, y validados con la herramienta *Primer-BLAST*, pertenecientes a la base de datos del NCBI. Los oligonucleótidos fueron sintetizados por Elim Biopharm®.

**Tabla 6. Características y secuencias de los *primers* diseñados para cada gen de las lipasas putativas de *K. marxianus* L-2029**

Gen codificante para lipasa	Clave	T <sub>m</sub> (°C)	Longitud (bases)	Secuencia
LIP3	LIP3F	59.70	25	ATGTTGTGGCTCAAACAGATGTTTA
	LIP3R	58.33	23	AATATGCGTAATTTGCTGTGGTG
YJR107W	LIPYJF	56.17	25	GAAGCCAGAACAATTGTTTATCATA
	LIPYJR	57.55	25	ATGAAACTTTTTAAACAGCGACAAG

#### 6.2.3.7 AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES DE LAS LIPASAS PUTATIVAS DE *K. marxianus* L-2029

Para identificar los genes de las lipasas putativas, se usó como ADN plantilla o base, aquel extraído de la cepa *K. marxianus* L-2029, para amplificar cada uno de los genes a partir de los *primers* diseñados y mencionados en los apartados anteriores. Para la amplificación se utilizó la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). En esta etapa, se utilizó una ADN Polimerasa recombinante de *Thermus aquaticus*, obtenida con *E. coli*, Taq ADN polimerasa de Thermo Scientific™. Con el fin de determinar la temperatura de alineación óptima para los *primers* de cada lipasa putativa extracelular, se hizo utilizó un gradiente de temperatura para cada uno de los genes en un rango de 50 a 60° C. Cada una de las reacciones, a las diferentes temperaturas del gradiente, se realizó para un volumen total de 50 µL, siendo necesario para la reacción: *primers* correspondientes para cada gen (0.5 µM), dinucleótidos trifosfato dNTPs (0.2 mM para cada uno de ellos: adenina, timina, citosina y guanina), magnesio (MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM), buffer específico para la enzima (1X), ADN (1 µg/mL) y Taq polimerasa (1 U/µL). Para cada uno de

los genes se preparó un master mix de los componentes antes mencionados y se adicionaron 20  $\mu\text{L}$  de aceite mineral para evitar la evaporación de las muestras.

Las muestras se llevaron a un termociclador, el cual fue programado con las condiciones básicas especificadas para la *Taq* polimerasa utilizada; sin embargo, algunas de las condiciones debieron ser modificadas específicamente para cada uno de los genes. Las condiciones básicas usadas fueron: tiempo de desnaturalización inicial del ADN de 2 min y posteriormente de 30 s para cada ciclo, a 95° C, tiempo de alineación de 30 s (temperatura a determinar en el gradiente), tiempo de extensión de 2 min (1 min/kb) a 72° C, y tiempo de extensión final de 10 min a 72° C; se programaron 40 ciclos, y las muestras se mantuvieron a 4° C.

#### 6.2.3.8 IDENTIFICACIÓN DE LOS GENES AMPLIFICADOS

Para comprobar la identidad de los genes amplificados en las etapas anteriores, los productos de PCR se sometieron a digestión con enzimas de restricción. Las enzimas utilizadas, para los genes implicados fueron: *TaqI*, *HaeII*, *DdeI* y *ScrFI* para el gen de la lipasa con clave YJR107W y, *SacI*, *AluI*, *DdeI*, *HhaI* y *HinfI* para el gen de la lipasa con clave LIP3. Para cada caso se preparó la reacción a un volumen total de 10  $\mu\text{L}$ , mismos que incluyeron 5  $\mu\text{L}$  de producto de PCR, 1  $\mu\text{L}$  de buffer (1X, específico para cada enzima de restricción), 0.5  $\mu\text{L}$  de cada enzima y completando el volumen con agua destilada estéril. Todas las reacciones se incubaron a 37° C por 3 h, salvo aquellas realizadas con la enzima *TaqI*, cuya temperatura óptima de reacción es de 65° C. La reacción se detuvo en cada caso por inactivación a 80° C por 20 min.

Los fragmentos generados de cada una de las reacciones, realizadas por duplicado, se sometieron a electroforesis para su revelado, a una concentración de gel de 1 %, bajo el mismo procedimiento descrito anteriormente. Se usaron marcadores de peso molecular de 1 kb y 100 pb.

El número de fragmentos y el tamaño de los mismos, para cada uno de los genes, se predijeron en el software Ugene®, y se presentan en la Tabla 7.

Posteriormente, los fragmentos amplificados de ADN fueron preparados y enviados para su secuenciación por Elim Biopharm®. Las secuencias obtenidas fueron comparadas e identificadas por análisis Blast en la plataforma del NCBI.

**Tabla 7. Perfil de corte de enzimas de restricción para cada gen de las lipasas putativas**

Lipasa	Enzima de restricción	Secuencia de reconocimiento	Sitios de corte	Tamaño de fragmentos (pb)
LIP3 (Tamaño: 1779 pb)	<i>SacI</i>	GAGCTC	1231..1236	1235, 544
	<i>AluI</i>	AGCT	165..168 1057..1060 1232..1235 1416..1419 1472..1475	166, 892, 175, 184, 56, 306
	<i>DdeI</i>	CTGAG	503..507 709..713 1263..1267 1600..1604	503, 206, 554, 337, 179
	<i>HhaI</i>	GCGC	313..316 571..574 680..683 1562..1565 1706..1709	315, 258, 109, 882, 144, 71
	<i>HinfI</i>	GAGTC	219..223 289..293 642..646 1192..1196	219, 70, 353, 550, 587
YJR107W (Tamaño: 1167 pb)	<i>TaqI</i>	TCGA	142..145 542..545	142, 400, 625
	<i>HaeIII</i>	GGCC	638..641	639, 528
	<i>DdeI</i>	CTGAG	410..414 864..868	410, 454, 303
	<i>ScrFI</i>	CCAGG	218..222 485..489	219, 267, 681

### 6.2.3.9 CLONACIÓN EN VECTOR DE EXPRESIÓN

Para la obtención del vector para expresión regulada en *S. cerevisiae*, se usó el kit pYES2.1 TOPO® TA de Invitrogen. El kit provee de una estrategia sencilla y altamente eficiente para la inserción directa de productos de PCR amplificados con la enzima *Taq* polimerasa a un vector de expresión en *S. cerevisiae*. Una vez clonado, analizado y transformado en la cepa usada para la expresión heteróloga, el producto de PCR puede ser expresado por inducción con galactosa.

El plásmido pYES2.1/V5-His-TOPO® se encuentra linealizado con terminaciones de timina 3' para la inserción del producto de PCR, ya que la enzima *Taq* polimerasa añade naturalmente adeninas a los extremos 3' de los productos de PCR. El plásmido provee extremos de timina que pueden unirse eficientemente a dichos extremos presentes en los productos de PCR.

En cada uno de estos extremos, se encuentra unida covalentemente una topoisomerasa (proveniente del virus *Vaccinia*) que se une a la cadena base de una hebra del ADN, específicamente en el extremo de timina, a través de un residuo de tirosina (274) de la enzima. El apareamiento con el residuo de adenina en el producto de PCR, provoca la liberación de la enzima y la inserción de la secuencia en el vector.

El producto de PCR insertado correctamente en el vector, se encuentra bajo regulación de un promotor fuertemente inducible con galactosa, y reprimible con glucosa, como lo es *GALI* (Figura 12). De esta manera, el producto de PCR pudo ser expresado por inducción con este azúcar.

Además de las características antes mencionadas, el vector cuenta con la señal de terminación de transcripción *CYCI*, origen de replicación en *E. coli* pUC, gen de resistencia a ampicilina para la selección de transformantes en *E. coli* y el gen *URA3* para la selección de transformantes en levaduras, en un medio deficiente de uracilo (Figura 24).

#### PREPARACIÓN DE CÉLULAS DE *E. coli* TOP10F' PARA TRANSFORMACIÓN

Para preparar las células de *E. coli* a fin de hacerlas competentes para la posterior transformación, se utilizó el tratamiento químico con cloruro de calcio (Sambrook & Russell, 2001). El genotipo de *E. coli* utilizado para la transformación con el plásmido pYES2.1/V5-His-TOPO®, fue el generado por la propia empresa Invitrogen, TOP10F'.

Se activó la cepa un día antes de la transformación, transfiriendo directamente del stock en congelación a una caja de Petri con medio SOB (triptona 20 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 0.5 g/L, agar bacteriológico 20 g/L). Experimentos recientes de Invitrogen, proveedores del kit utilizado, destacan que el uso de algunas sales añadidas a los medios de cultivo de crecimiento de la cepa, ayudan a incrementar el número de transformantes de 2 a 3 veces. De tal manera, al medio estéril SOB se le añadieron KCl 250 mM, MgCl<sub>2</sub> 2M y MgSO<sub>4</sub> 1 M. La caja donde se activó la cepa se llevó a incubación a 37° C de 16 a 20 h.

Cumplido el tiempo de incubación, se transfirió una colonia del medio sólido a 50 mL de medio SOB en un matraz de 500 mL, y se incubó a la misma temperatura, en agitación constante, durante un tiempo aproximado de entre 3 y 4 h. Se determinó la densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm, con el fin de obtener células en crecimiento en fase exponencial (densidad óptica entre 0.35 y 0.4), recomendadas para los procesos de competencia y transformación.

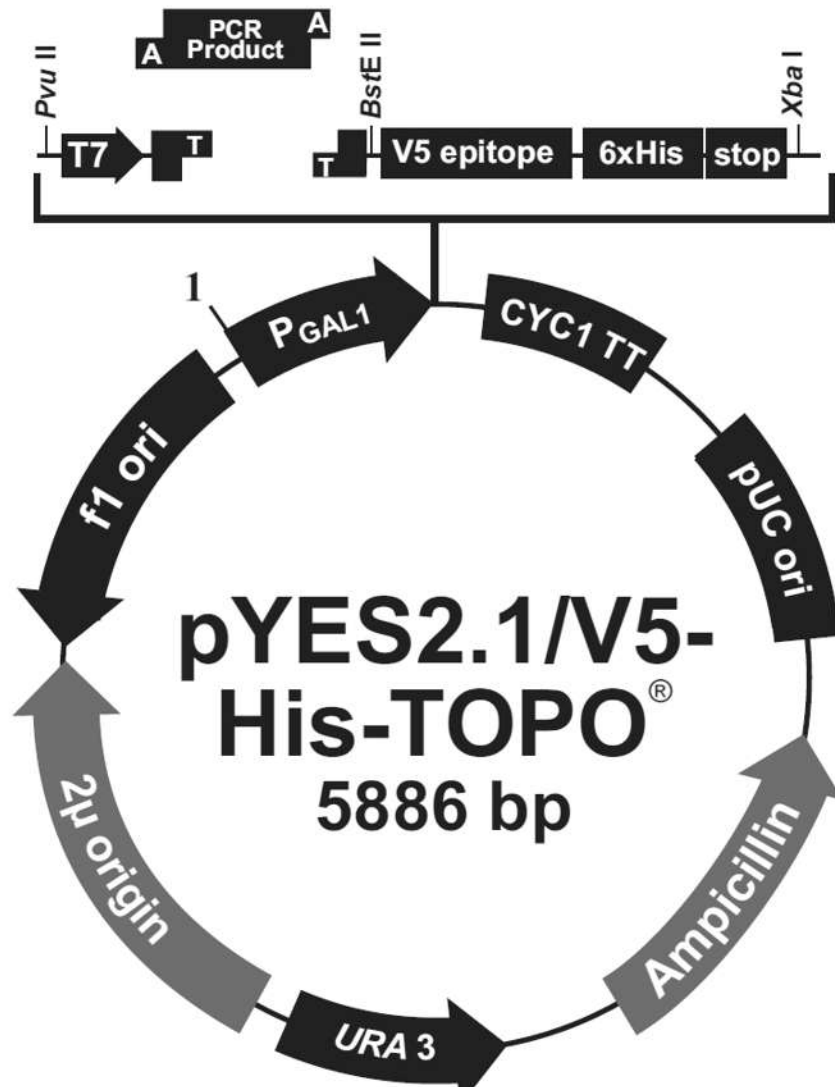


Figura 24. Características del vector pYES2.1/V5-His-TOPO<sup>®</sup>

Alcanzada dicha densidad óptica, se transfirieron 30 mL del medio de cultivo a dos tubos de propileno estériles fríos, y se dejaron reposar por 10 min a 0° C, con el fin de detener el crecimiento de la bacteria. Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 4100 rpm por 10 min a 4° C, y se eliminó el sobrenadante.

El pellet fue resuspendido en 30 mL de solución fría de MgCl<sub>2</sub>-CaCl<sub>2</sub> (80 mM y 20 mM, respectivamente) y se centrifugó nuevamente a las mismas condiciones mencionadas anteriormente. Eliminado el sobrenadante, se resuspendieron las células en 0.6 mL de buffer estándar de transformación TFB (MES 10 mM, MnCl<sub>2</sub> 45 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, KCl 100 mM) y se hicieron alícuotas de 200 µL, para su transformación.

### INSERCIÓN DE GENES EN VECTOR DE CLONACIÓN

Uno de los requerimientos para llevar a cabo la reacción de inserción de los genes de las lipasas putativas de *K. marxianus* en el vector pYES2.1/V5-His-TOPO®, es el uso de productos frescos de PCR. La amplificación de los dos genes codificantes para las lipasas putativas extracelulares, LIP3 y YJR107W, se realizó a las condiciones determinadas durante la identificación de los mismos en la cepa *K. marxianus* L-2029, pero utilizando una ADN polimerasa de alta fidelidad, la enzima *DreamTaq* polimerasa®. La clonación de los genes se comprobó por electroforesis a una concentración de gel del 1 %.

Para la reacción de inserción de los genes amplificados en el vector de expresión, se añadieron 1 µL de producto fresco de PCR, 1 µL del vector, 1 µL de solución salina y se aforó con agua destilada hasta un volumen de reacción final de 6 µL. La reacción se incubó en agitación baja a temperatura ambiente por un tiempo de 15 min.

### TRANSFORMACIÓN DE *E. coli* TOP10F'

Las células competentes, preparadas por tratamiento con cloruro de calcio, se transformaron con el vector de clonación con los insertos de las dos lipasas putativas extracelulares. Como cepa control se realizó la transformación de células competentes con el plásmido pUC19, que pone de manifiesto la resistencia a ampicilina para su selección. Además, como control negativo de la síntesis de las lipasas, se transformó una alícuota de la bacteria con el vector sin inserto.

La técnica utilizada, se realizó como fue descrita por Sambrook & Russell, (2001). Se tomó una alícuota de 200 µL de células competentes, y se adicionaron 2 µL del respectivo plásmido,

con cada uno de los insertos, y el control. Para promover el ingreso del plásmido al interior de la célula y la recuperación de la misma, se incubó en hielo durante 30 min. Posteriormente se llevó a choque térmico a 42° C durante 90 s, e inmediatamente después se transfirieron a hielo los tubos. Se dejó descansar las células durante 2 min. Se añadieron 800 µL de medio SOB y se incubó durante 45 min a 37° C para la recuperación de la bacteria y la expresión del marcador de resistencia.

Finalmente, las células competentes transformadas fueron transferidas a medio agar SOB con el marcador usado, el antibiótico ampicilina (50 µg/mL). A una caja de medio se agregaron 300 µL, a otra se agregaron 100 µL de cada transformación, y a otro más se agregaron únicamente células competentes (100 µL) que no sufrieron transformación, pero siguieron todos los pasos de aquellas que si fueron transformadas (control negativo). Además, las células también fueron incubadas en medio SOB sin antibiótico (controles positivos). Todas las cajas fueron incubadas por 37° C de 12 a 16 h, para permitir el crecimiento de la bacteria y la expresión del marcador de resistencia.

#### VERIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL PLÁSMIDO CON EL INSERTO

Para la verificación de colonias expresando el plásmido con los genes insertados en el mismo, se eligieron 10 colonias de cada uno, y por picadura se incubaron en 3 mL de medio SOB con antibiótico durante 16 h. Posteriormente, se extrajo el ADN plasmídico de aquellas colonias que resultaron positivas en crecimiento en dicho medio (aquellas colonias negativas fueron descartadas).

El método usado para la extracción de ADN fue por tratamiento con lizozima (Sambrook & Russell, 2001). El medio de crecimiento proveniente de la etapa anterior fue transferido a tubos Eppendorf y centrifugados a 13000 rpm por 3 min. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió la biomasa en 100 µL de solución STE (sacarosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM, EDTA 10 mM, pH 8); se agregaron 20 µL de lizozima (20 mg/mL) y se agitó en vórtex manual, se dejó reposar a temperatura ambiente por 5 min. Después de transcurrido el tiempo, se agregaron 200 µL de solución, recién preparada, de NaOH 0.2 M y SDS 1 %, se mezcló cuidadosamente y se incubó en hielo por 5 min. Se adicionaron 200 µL de acetato de sodio 3 M (pH 4.8) y se incubó en hielo por 10 min.

La mezcla de lisis celular fue centrifugada a 13000 rpm por 2 min y se adicionaron 150  $\mu$ L de mezcla fenol/cloroformo 1:1, para separar la fracción de ADN de los demás componentes celulares; se mezcló con vórtex y se centrifugó por 7 min a 13000 rpm. El sobrenadante se transfirió a otro tubo y se agregaron 500  $\mu$ L de mezcla etanol/isopropanol (60 %/40 %) para provocar la precipitación del ADN, y se incubó en hielo por 10 min. Posteriormente se centrifugó a la misma velocidad por 2 min. Se hicieron 3 lavados adicionando 500  $\mu$ L de etanol al 70 % y posterior centrifugación por 5 min a máxima velocidad.

Finalmente, se resuspendió en 50  $\mu$ L de agua estéril y se agregaron 3  $\mu$ L de RNAasa. Se corrió gel de electroforesis de agarosa al 1 % para verificar la extracción correcta del ADN plasmídico.

Con el fin de seleccionar aquellas colonias con una correcta posición del inserto, se llevó a cabo una reacción de PCR usando el ADN plasmídico extraído. Como *primer* Forward se utilizó el *primer* específico de cada uno de los genes; en el caso del Reverse, se utilizó el *primer* específico para la secuencia V5 C-terminal, con la enzima *DreamTaq* polimerasa.

#### 6.2.3.10 TRANSFORMACIÓN HETERÓLOGA DE *S. cerevisiae* BY4742

Para la preparación de las células de *S. cerevisiae* BY4742 y su posterior transformación, se usó tratamiento con acetato de litio (Gietz & Schiestl, 2007). Para ello, inicialmente se inocularon 30 mL de medio YPD con una colonia de la levadura y se permitió su crecimiento durante la noche en incubación a 30° C; dicho medio de crecimiento se utilizó entonces para inocular 30 mL de medio YPD con una concentración  $5 \times 10^6$  cel/mL. El medio se incubó en agitación a 200 rpm, 30 °C, por alrededor de 4 h, hasta alcanzar una concentración celular de  $2 \times 10^7$  cel/mL.

Se recuperaron 15 mL de dicho medio y se centrifugó durante 5 min a máxima velocidad, aproximadamente 4,000 rpm. El medio se desechó y se realizaron dos lavados con 15 mL de agua destilada y centrifugando a las mismas condiciones. Posteriormente, se resuspendió la biomasa en 600  $\mu$ L de agua destilada y se transfirió a un tubo Eppendorf, el cual se centrifugó a 13,000 rpm por 30 s, descartando el sobrenadante. Se resuspendió en 600  $\mu$ L de agua destilada y se transfirieron 100  $\mu$ L a tubos Eppendorf por cada transformación, los cuales se centrifugaron nuevamente a 13,000 rpm por 30 s.



Preparadas las células se añadieron los siguientes componentes: 240  $\mu\text{L}$  de solución PEG (4000) 50 %, 36  $\mu\text{L}$  de acetato de litio 1 M, 10  $\mu\text{L}$  de acarreador *calv thymus* 10 mg/mL, 2  $\mu\text{L}$  de ADN plasmídico y se completó con agua destilada a un volumen de 360  $\mu\text{L}$ . Se agitó vigorosamente en vórtex y se incubó en baño maría a 42° C durante 40 min.

Finalmente, se centrifugó a 13,000 rpm por 30 s y se removió el sobrenadante, para resuspender en 1 mL de agua destilada. Para la selección de las transformantes se usó medio mínimo SMM (extracto de levadura sin aminoácidos y con sulfato de amonio 0.67 %, glucosa 2 %, aminoácidos 0.005 %, agar 2 %) sin uracilo como marcador de selección, transfiriendo 100  $\mu\text{L}$  de las células transformadas, para llevar a incubación a 30° C durante 2 a 3 días.

#### 6.2.3.11 SELECCIÓN Y PRODUCCIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE

Los genes de las lipasas putativas de *K. marxianus*, quedaron bajo regulación del promotor *GALI* en el plásmido pYES2.1/V5-His-TOPO® (Figura 12), en la cepa transformante de *S. cerevisiae* BY4742. El mismo, es fuertemente reprimido por la presencia de glucosa en el medio de cultivo (West *et al.*, 1984), e inducido por la adición de galactosa como fuente de carbono (Giniger *et al.*, 1985); por lo que transferir las células de un medio conteniendo glucosa a un medio conteniendo galactosa, provocaría la inducción de la transcripción bajo acción del promotor *GALI*.

Para la producción de las proteínas recombinantes, se inocularon 50 mL de las cepas transformadas con el plásmido conteniendo los genes LIP3 y YJR107W en medio SMM adicionado con glucosa como fuente de carbono, y se incubaron durante 12 h a 180 rpm y 28° C para la propagación de su crecimiento. Posteriormente, se determinó la concentración celular por cuenta de células viables en cámara de Neubauer, recuperando la biomasa necesaria para inocular  $2 \times 10^7$  cel/mL en medio SMM adicionado con galactosa; la biomasa se centrifugó a 13000 rpm durante 5 min, y se lavó 2 veces con agua destilada. Durante la cinética de inducción se tomaron alícuotas cada hora durante las primeras 6 h y se determinaron los siguientes factores: crecimiento celular, concentración de proteína intracelular y extracelular, actividad lipásica intracelular y extracelular. Finalmente, en aquella muestra que fue determinada con mayor actividad lipásica se le determinaron las siguientes características (Abdou, 2003; Alarcón, 2008):

- pH óptimo: se prepararon soluciones a diferentes pH en un rango de 4 a 11; se determinó la actividad lipásica bajo estas condiciones, usando la técnica descrita a continuación.
- Temperatura óptima: Se midió la actividad lipásica en temperaturas de 20 a 70° C.

#### DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN CELULAR

Para la determinación de la concentración celular se utilizó la técnica de conteo de células viables en cámara de Neubauer, por tinción diferencial con azul de metileno. El conteo fue realizado en un microscopio óptico de campo claro, a partir del promedio de la suma de 5 cuadrantes. Para hacer la dilución, se tomaron 100  $\mu\text{L}$  del medio de cultivo con las levaduras transformadas, y se les añadieron 895  $\mu\text{L}$  de agua destilada y 5  $\mu\text{L}$  de azul de metileno. El resultado fue expresado en cel/mL.

#### EXTRACTO DE PROTEÍNA INTRACELULAR

Se recuperó la biomasa de cada alícuota (12 mL) generada por centrifugación a 13000 rpm durante 5 min; posteriormente, se trataron las células resuspendiendo en 1 mL de hidróxido de sodio 0.4 M, incubando 5 min en hielo y posteriormente eliminando la solución por centrifugación a 13000 rpm por 1 min.

Para lisar las células tratadas se agregaron 300  $\mu\text{L}$  de solución de lisis, diluyendo con agua destilada 60  $\mu\text{L}$  de buffer de carga 5X sin azul de bromofenol (Tris 0.5 M, pH 6.8, SDS 10 %, 2-mercaptoetanol 25 %, glicerol 25 %), y se incubaron en baño maria a 100° C durante 5 min. Después, las muestras se centrifugaron a 13000 rpm durante 1 min y el sobrenadante se recuperó como la proteína intracelular total.

#### DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA INTRACELULAR Y EXTRACELULAR

Se utilizó el método de Bradford (Bradford, 1976); es un método espectrofotométrico basado en el cambio de color del azul de Coomassie a diferentes concentraciones de proteínas. El azul de Coomassie interacciona con aminoácidos básicos y aromáticos, provocando el cambio de color de rojo a azul, a una longitud de onda de 595 nm.

Para la determinación de proteína intracelular, se tomaron 10  $\mu\text{L}$  del extracto, se añadieron 190  $\mu\text{L}$  de solución salina 0.5 M y se mezclaron con 2 mL de reactivo de Bradford (preparado a partir de la mezcla de 5 mL de azul de Coomassie G-250, 2.5 mL de etanol y 5 mL de ácido

fosfórico, para un volumen con agua destilada de 50 mL y previamente filtrado); se agitó la mezcla y se midió a en espectrofotómetro a la longitud de onda mencionada. Para calcular la concentración de proteína en los extractos, se elaboró previamente una curva de calibración a concentraciones conocidas usando un stock de albúmina de suero bovino con una concentración de 1 mg/mL.

En el caso de la determinación de proteína al extracto extracelular, se tomaron directamente 200  $\mu$ L de extracto y se mezclaron con 2 mL de reactivo de Bradford. Se procedió como describió en el párrafo anterior.

## DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD LIPÁSICA, INTRACELULAR Y EXTRACELULAR

A fin de comparar la actividad del extracto enzimático sobre ácidos grasos de cadena corta con respecto a cadena larga, se usó la técnica colorimétrica de la hidrólisis del *p*-nitrofenilbutirato (sin color) a ácido butírico y *p*-nitrofenol (de color amarillento y medido a 400 nm). Un volumen de 5 mL de solución amortiguadora de fosfato (100 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.25) se incubaron con 100  $\mu$ L de extracto enzimático, intracelular o extracelular, en baño maría a 30° C durante 10 min; posteriormente, se añadieron 50  $\mu$ L de una solución de *p*-nitrofenilbutirato 100 mM y se permitió reaccionar por un tiempo de 10 min a la misma temperatura. Las soluciones se colocaron en baño de hielo por 10 min y se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 min. El sobrenadante se usó para determinar su absorbencia a la longitud de onda antes mencionada. Previamente se debe elaborar una curva estándar usando un stock de *p*-nitrofenol 100  $\mu$ g/mL. Una unidad de actividad lipásica se define como la cantidad de enzima liberada por 1 mmol de ácido graso por minuto (Casas-Godoy *et al.*, 2009).

Para la determinación de la actividad lipásica, se usó el método de hidrólisis del *p*-nitrofenilpalmitato modificado, que se convierte en un sustrato ácido graso de cadena larga para identificar y cuantificar la actividad lipásica de una muestra problema (Winkler and Stuckmann, 1979; Kordel *et al.*, 1991; Pencreac'h and Baratti, 1996). La técnica permite determinar la cantidad de *p*-nitrofenol (*p*-NF) liberado, lo que ocasiona un cambio en la absorbencia de una muestra a una longitud de onda de 410 nm. Se mezclaron y preincubaron 50  $\mu$ L de solución de *p*-nitrofenilpalmitato 16.5 mM (diluido en isopropanol) con 2.35 mL de solución amortiguadora Tris HCl 50 mM (Triton X100 0.4 %, goma arábica 0.1 %, pH 8) a 37° C en baño maría por 5

min. Transcurrido el tiempo se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de extracto enzimático, intracelular o extracelular y se permitió la reacción por 10 min. Finalmente se determinó la absorbencia en espectrofotómetro a la longitud de onda antes mencionada. Para calcular la cantidad de p-nitrofenol hidrolizado, se elaboró una curva patrón a concentraciones conocidas, a partir de un estándar de p-nitrofenol 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

### ELECTROFORESIS DE PROTEÍNA INTRACELULAR Y EXTRACELULAR

Una vez determinada la concentración por el método de Bradford de los extractos intracelulares, se hizo el cálculo del volumen necesario para cargar 0.1 mg de proteína (entre 10 y 20  $\mu\text{L}$ ) y se mezclaron con 3  $\mu\text{L}$  de azul de bromofenol 0.1 mg/mL. Tales muestras quedaron listas para someterlas a SDS-PAGE.

Para la electroforesis SDS-PAGE se usó gel de separación a una concentración de 10 % (1.9 mL agua destilada, 1.7 mL acrilamida/bisacrilamida 30 %, 1.3 mL Tris 1 M, pH 8.8, 50  $\mu\text{L}$  SDS 10 %, 25  $\mu\text{L}$  persulfato de amonio 10 %, 2.5  $\mu\text{L}$  TEMED), y gel concentrador a 4 % (1.4 mL agua destilada, 330  $\mu\text{L}$  acrilamida/bisacrilamida 30 %, 250  $\mu\text{L}$  Tris 0.5 M, pH 6.8, 20  $\mu\text{L}$  SDS 10 %, 10  $\mu\text{L}$  persulfato de amonio 10 %, 2  $\mu\text{L}$  TEMED).

Como ya se mencionó, dependiendo de la concentración de proteína de las muestras obtenidas a partir de la inducción con galactosa de las cepas transformantes para cada gen, se cargaron de 10 a 20  $\mu\text{L}$  de las mismas, se añadió buffer de corrida (tris 25mM, glicina 192mM, SDS 3.5 mM) y se llevó a 120 V durante 2 h aproximadamente. Como controles se utilizaron muestras de las cepas transformantes con el plásmido sin inserto, y de la cepa *S. cerevisiae* BY4742 sin transformar, en crecimiento tanto en glucosa como galactosa. Como referencia de peso molecular se utilizó marcador azul preteñido de la marca Sigma (180 KDa  $\alpha_2$ -macroglobulina de suero equino, 116 KDa  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli*, 90 KDa lactoferrina de leche humana, 58 KDa piruvato kinasa de músculo de conejo, 48.5 KDa fumarasa de corazón porcino, 36.5 KDa deshidrogenasa láctica de músculo de conejo y 26.6 KDa trosofosfato isomerasa de músculo de conejo). Para la tinción del gel se usó una solución estándar de azul brillante de Comassie. Para la decoloración del gel, se usó una mezcla de agua 50 %, metanol 40 % y ácido acético 10 %.

En el caso de las muestras extracelulares, fue necesario concentrar la proteína para que esta fuera reconocida en la electroforesis. Para este fin se mezclaron 200  $\mu\text{L}$  de extracto con 800 L

de acetona. Se incubaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 1 h; posteriormente, las muestras se centrifugaron a 13,000 rpm por 10 min y el pellet se recuperó como el total de proteína. El exceso de acetona se dejó evaporar antes de lisar las muestras para electroforesis. Para ello, se añadieron 40  $\mu\text{L}$  de buffer de carga SDS y se trataron como las muestras del extracto intracelular.

## 6.2.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.2.4.1 IDENTIFICACIÓN DE LIPASAS PUTATIVAS EN LA CEPA *K. marxianus* L-2029

La presencia de genes que codifican para la síntesis de enzimas con actividad lipásica extracelular han sido identificadas en la cepa *K. marxianus* DMKU 3-1042 (Lertwattanasakul *et al.*, 2015), por lo que, en primera instancia, fue necesario reconocer tales genes en la cepa nativa del estado de Michoacán no-convencional *K. marxianus* L-2029. Así, se diseñaron *primers* específicos, tomando como referencia el estudio antes mencionado, de los genes de las 2 lipasas putativas extracelulares presentes en el genoma de esta levadura (Tabla 6).

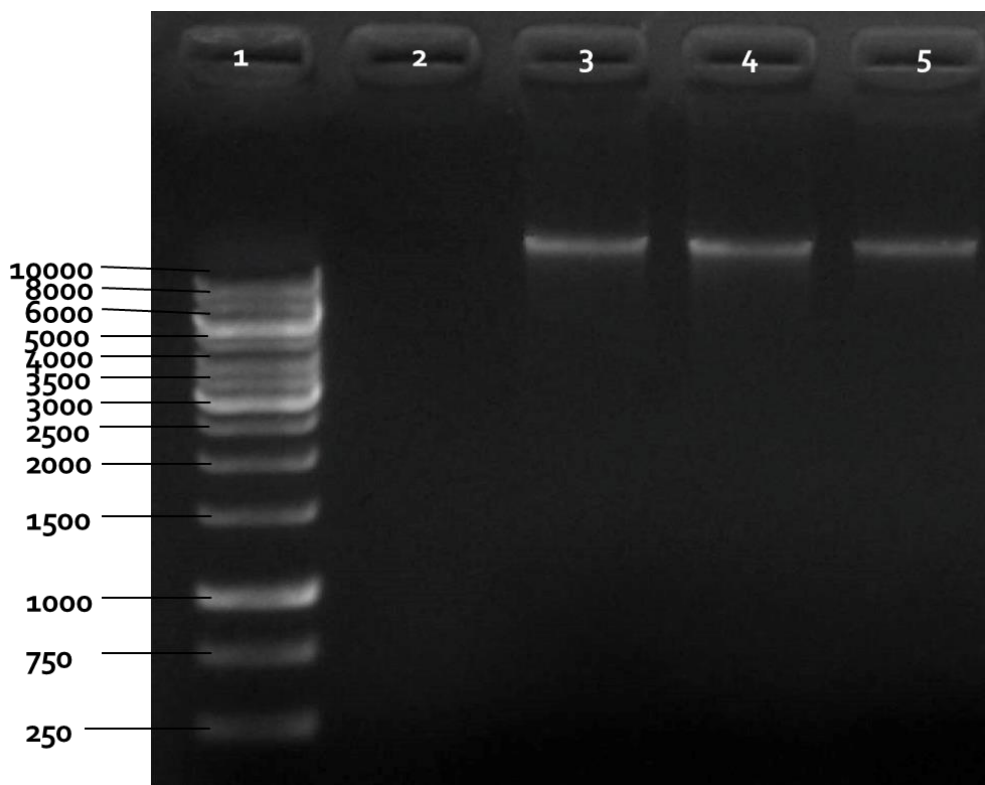
Como ya se mencionó, los *primers* fueron diseñados sin el codón de paro propio de cada una de los genes codificantes para las lipasas putativas extracelulares en estudio: LIP3 y YJR107W. De esta manera, la amplificación de los genes de estas lipasas putativas usando como base el ADN genómico extraído de la cepa *K. marxianus* L-2029 por PCR, produciría fragmentos de 1779 pb y 1167 pb, respectivamente.

### 6.2.4.2 EXTRACCIÓN DE ADN DE LA CEPA *K. marxianus* L-2029

En primera instancia, se extrajo por triplicado el ADN de la levadura por lisis mecánica (Sambrook & Russell, 2001). Posterior a dicha extracción, se calculó la concentración de las muestras obtenidas, denominadas KM1, KM2 y KM3, así como el factor de integridad de las mismas, haciendo medición de los factores implicados a densidad óptica de 260 nm y 280 nm. Los ácidos nucleicos y las proteínas tienen absorbencia máxima a 260 y 280 nm, respectivamente; el factor de integridad de ADN busca detectar la contaminación de la muestra durante la extracción, ya sea por la presencia de proteínas o restos de fenol usado durante el proceso. Un factor de integridad entre 1.5 y 2.0 es normalmente aceptado para ADN (ThermoScientific, 2011). Ambos parámetros se muestran en la Tabla 8.

**Tabla 8. Concentración y factor de integridad de cada muestra de ADN extraída de la cepa *K. marxianus* L-2029**

Clave (muestra de ADN)	Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	Factor de pureza
KM1	1225	1.13
KM2	2450	1.22
KM3	2167.5	1.81

**Figura 25. ADN genómico extraído de la cepa *K. marxianus* L-2029.** Carriles: (1) Marcador de tamaño molecular (2) control negativo, (3 a 5) muestras de ADN extraídos de *K. marxianus* L-2029.

En la muestra KM2 se obtuvo una mayor concentración teórica de ADN, siendo esta de 2,450  $\mu\text{g/mL}$ ; sin embargo, el factor de integridad determinado fue bajo (1.22), por la probable contaminación de proteínas arrastradas durante la extracción, por lo que dicha muestra fue descartada. Asimismo, el factor de integridad de la muestra KM1 fue muy bajo, al igual que su concentración, respecto a las otras dos muestras. Para la muestra KM3 se obtuvo una concentración alta, de 2167.5  $\mu\text{g/mL}$ , y un índice de integridad 1.81, aceptado para su uso en pruebas posteriores.

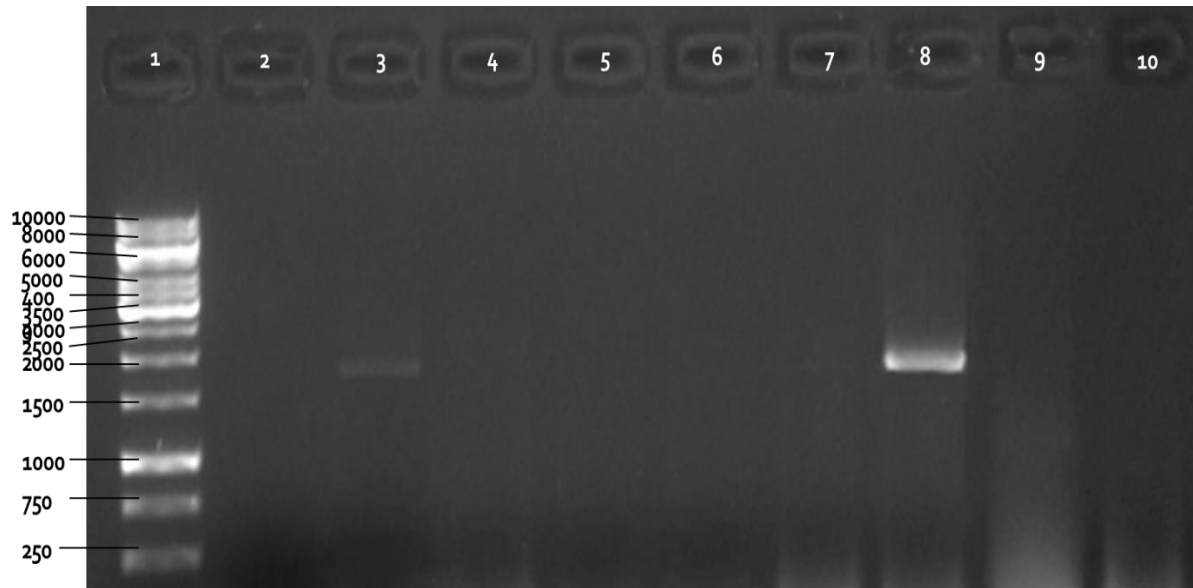
Para verificar la integridad del ADN extraído, se llevó a cabo una electroforesis de las muestras antes mencionadas (Figura 25). En todas las muestras se detectó una sola banda, correspondiente al ADN genómico de la levadura. En base a su factor de integridad calculado, por tanto, se determinó utilizar la muestra KM3 para los estudios posteriores de amplificación de los genes LIP3 y YJR107W, de las lipasas putativas extracelulares.

#### 6.2.4.3 AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES DE LIPASAS PUTATIVAS EXTRACELULARES: LIP3 Y YJR107W

Usando como base la muestra de ADN extraído a partir de la cepa *K. marxianus* L-2029 (KM3) se procedió a la identificación de los genes de las lipasas putativas: LIP3 y YJR107W. A fin de determinar la temperatura ideal de alineación de los *primers* específicos diseñados para cada lipasa (Tabla 6) con el ADN base, se realizó un PCR con gradiente de temperatura. Para la amplificación de tales genes se utilizaron las condiciones propuestas en el manual de uso de la enzima *Taq* polimerasa utilizada: desnaturalización inicial a 95° C por 2 min y 30 s para cada ciclo, tiempo de alineación de 30 s, extensión a 72° C 1 min/kb, extensión final de 10 min y mantenimiento a 4° C, durante 40 ciclos.

En el caso de la amplificación del gen codificante para *pLIP3*, fue necesario la modificación de algunos de los parámetros antes mencionados. El tiempo de alineación de los *primers* con el ADN base se aumentó a 45 s, mientras el tiempo de extensión se aumentó a 2:15 min, debido a la longitud del gen. El rango de temperatura utilizado fue a una temperatura máxima de 61° C y una mínima de 50° C (Figura 26).

Al comprobar la amplificación del gen LIP3 por electroforesis, se denotó la presencia de una banda de entre 1500 y 2000 pb, en relación al marcador de tamaño molecular, principalmente a una temperatura de 52° C (carril 8); por tanto, fue la temperatura determinada como ideal para la alineación de los *primers*. El tamaño del fragmento de ADN amplificado en el gradiente de PCR, coincidió con el tamaño del gen esperado (1779 pb). Para constatar la identidad de la secuencia amplificada, se realizó una digestión de los productos amplificados, con diferentes enzimas de restricción.



**Figura 26. Amplificación del gen de la lipasa LIP3 de *K. marxianus* L-2029 en gradiente de temperatura.** Carriles: (1) Marcador de tamaño molecular de 1 kb, (2) control negativo, (3) 61.0° C, (4) 60.2° C, (5) 58.8° C, (6) 56.7° C, (7) 54.2° C, (8) 52.0° C, (9) 50.8.

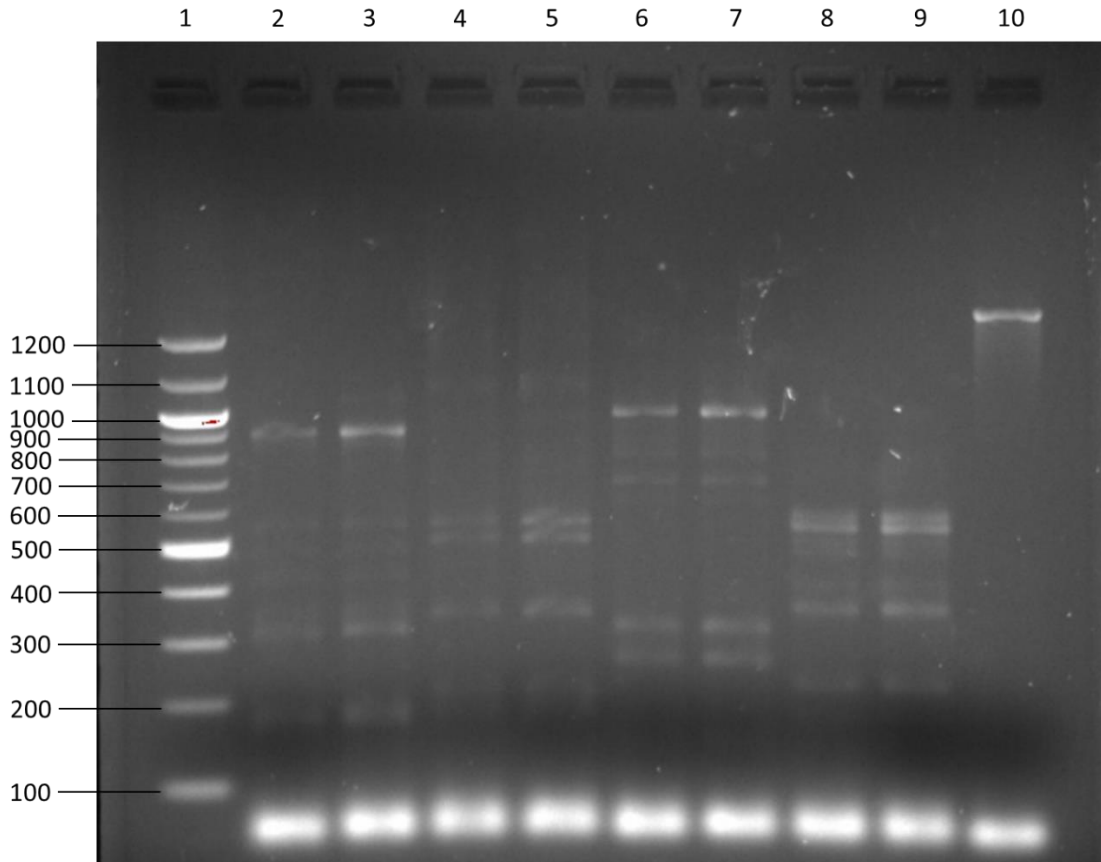
Para la digestión se utilizaron 4 enzimas de restricción: *AluI*, de la cual se esperaban 6 fragmentos, *DdeI*, que generaría 5 fragmentos, *HhaI*, produciendo 6 fragmentos, y *Hinfi*, que daría como resultado 5 fragmentos. Dichos fragmentos teóricos, y el tamaño de los mismos, se muestran en la Tabla 7. El revelado de la digestión con tales enzimas se muestra en la Figura 27. En el caso de la digestión con *AluI* (Figura 27, carriles 2 y 3), se observa claramente la presencia de una banda cercana a las 900 pb, que coincide con el fragmento esperado de 892 pb; además, se observan bandas en 300 pb y entre 100 y 200 pb, que coincidirían con las esperadas en 306 y probablemente los fragmentos de 166, 175 y 184, que eran esperados.

La presencia de otras bandas de tamaño no esperado, puede deberse a una digestión incompleta del producto de PCR por parte de la enzima, debido a un tiempo bajo de incubación. Para la digestión con la enzima *DdeI* (Figura 27, carriles 4 y 5), se observan 2 bandas entre las 500 y 600 pb, que coinciden con los fragmentos esperados de 557 y 503 pb; también se observa un fragmento de aproximadamente 337 pb y otro más por debajo de las 200 pb, todos coincidentes con los resultados teóricos. En el caso de la digestión con *HhaI* (carriles 6 y 7) se denotan los fragmentos esperados de 882, 315 y 258 pb; sin embargo, nuevamente parece haber una digestión incompleta del producto de LIP3. Para la digestión de *Hinfi*, se observan



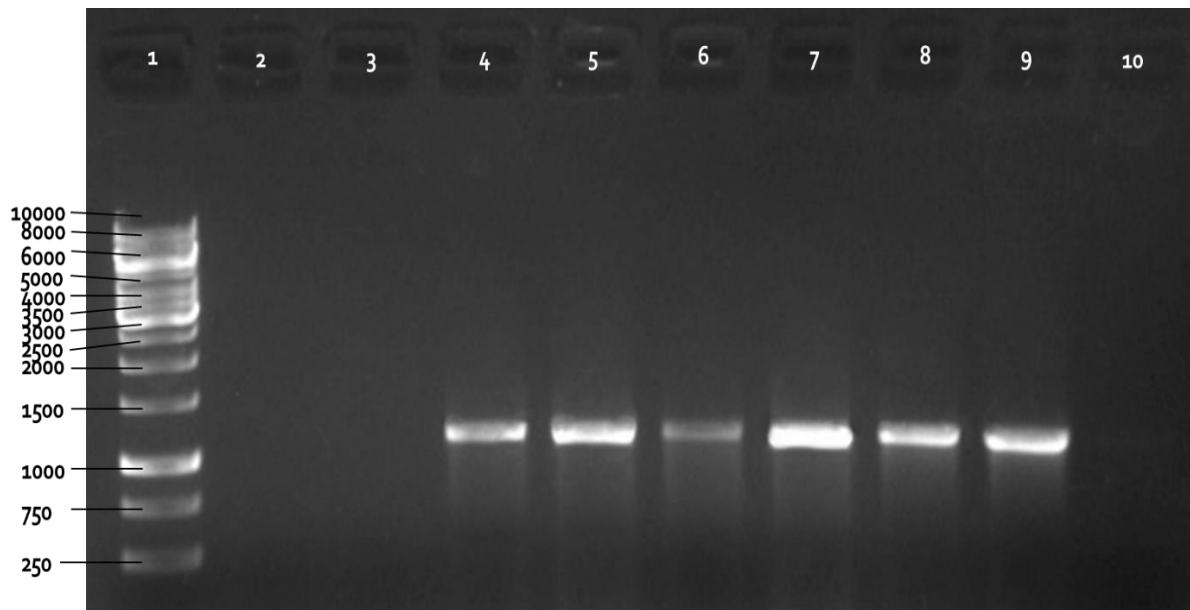
fragmentos coincidentes con los esperados, dos bandas que podrían ser de 587 y 550 pb, uno cercano a las 350 pb, y otro más de aproximadamente 219 pb.

En el caso de la amplificación del gen codificante para la lipasa putativa *pYJR107W*, las condiciones utilizadas fueron las mismas propuestas por el fabricante de la polimerasa utilizada. El gradiente usado fue el mismo que para el gen LIP3. Las temperaturas del gradiente a las cuales hubo amplificación de un fragmento de ADN, fueron de 60.8° C a 50.8° C (Figura 28, carriles del 4 a 9). El tamaño de los fragmentos se encuentra entre las 1100 y las 1200 pb, coincidentes con el fragmento esperado de 1167 pb. Al igual que con el gen LIP3, se determinó una temperatura ideal de alineación de 52° C para el gen YJR107W.



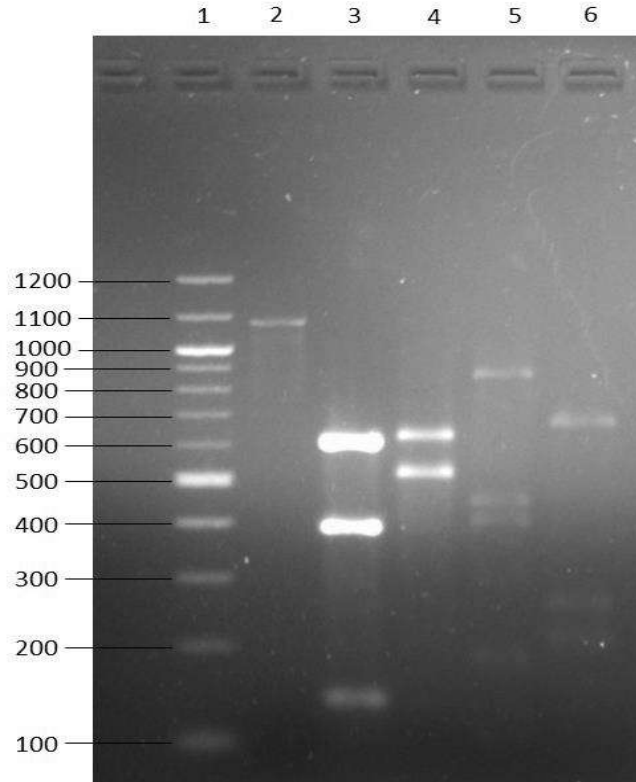
**Figura 27. Digestión con enzimas de restricción del producto de PCR proveniente del gen LIP3.** Carriles: (1) Marcador de tamaño molecular de 100 pb, (2 y 3) digestión con *AluI*, (4 y 5) digestión con *DdeI*, (6 y 7) digestión con *HhaI*, (8 y 9) digestión con *HinfI*, (10) producto de PCR (LIP3).

La comprobación del producto amplificado esperado del gen YJR107W, se realizó con las enzimas de restricción *TaqI*, *HaeIII*, *DdeI* y *ScrFI* (Figura 29). Para el caso de *TaqI*, se obtuvieron los 3 fragmentos esperados resultados de la digestión: uno cercano a 625 pb, otro cercano a las 400 pb, y otro más de 142 pb, aproximadamente. Dichos datos coinciden con los fragmentos teóricos calculados en la Tabla 7. Para el caso de la digestión con *HaeIII* (carril 4), se observa la presencia de dos bandas definidas entre las 500 y 700 pb, que podrían coincidir con los fragmentos de 520 pb y 639 pb esperados. Para las enzimas *DdeI* y *ScrFI* (carriles 5 y 6, respectivamente), se esperaba la generación de 3 fragmentos por cada digestión. En el segundo caso, se aprecia claramente la presencia de dichas bandas, que coincidirían con los fragmentos teóricos de 681, 267 y 219 pb esperados. En el caso de *DdeI*, a pesar que se denotan fragmentos en el tamaño esperado (454, 410 y 303 pb), se observan otras bandas que pudieron obtenerse por una digestión incompleta del fragmento de PCR, probablemente debido a un tiempo de reacción de la enzima de restricción bajo.



**Figura 28. Amplificación del gen YJR107W de *K. marxianus* L-2029 en gradiente de temperatura.** Carriles: (1) Marcador de tamaño molecular de 1 kb, (2) control negativo, (3) 61.0° C, (4) 60.2° C, (5) 58.8° C, (6) 56.7° C, (7) 54.2° C, (8) 52.0° C, (9) 50.8° C, (10) 50.0° C.

Los productos de PCR, además, obtenidos a las mejores condiciones de amplificación, fueron secuenciados por Elim Biopharm®, y comparados por Blast en la plataforma NCBI con los genes de las lipasas usadas como referencia. En el caso de LIP3, se obtuvo una identidad del 97 % con solo 5 desfases respecto a la reportada para *K. marxianus* DMKU 3-1042; por su parte, para el producto de YJR107W, se detectó una identidad del 98 %, con 6 desfases.



**Figura 29. Digestión con enzimas de restricción del producto de PCR proveniente del gen YJR107W.** Carriles: (1) Marcador de peso molecular de 100 pb, (2) producto de PCR (YJR107W), (3) digestión con *TaqI*, (4) digestión con *HaeIII*, (5) digestión con *DdeI*, (6) digestión con *ScrFI*.

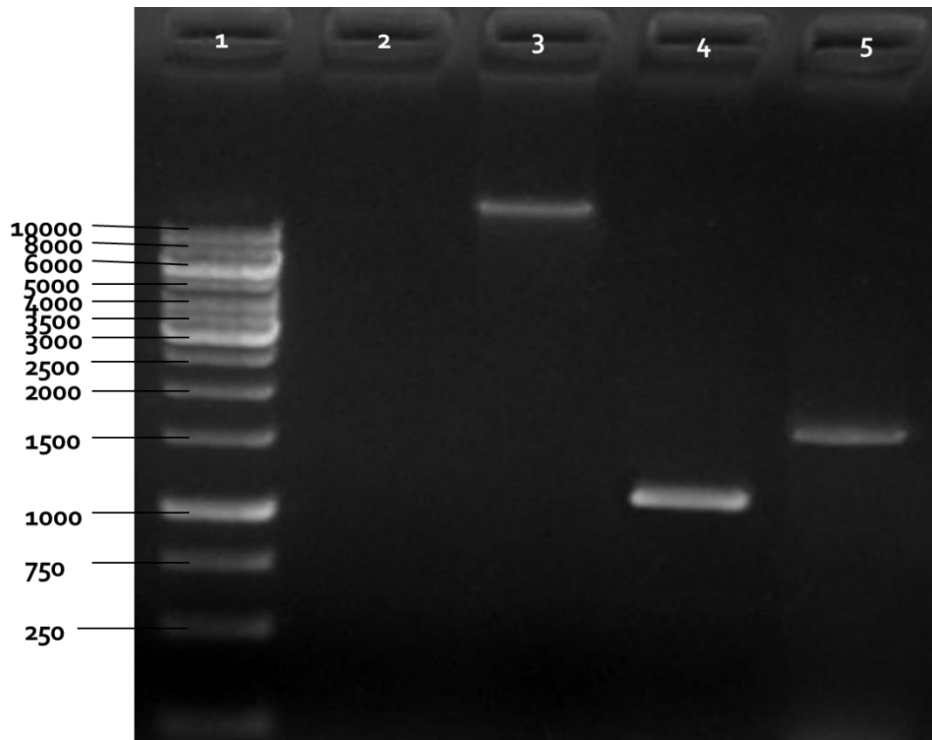
#### 6.2.4.4 CLONACIÓN EN VECTOR DE EXPRESIÓN

Células del genotipo de *E. coli* TOP10F', fueron preparadas mediante tratamiento con cloruro de calcio, para hacerlas competentes de cara a la transformación con los constructos de los genes LIP3 y YJR107W insertados en el plásmido pYES2.1/V5-His-TOPO®. Además de la preparación del sistema de clonación del vector con la inserción de LIP3 y YJR107W, fue necesaria la construcción propiamente del vector con los insertos. Para ello, el sistema requirió

de productos frescos de PCR, amplificados con los *primers* diseñados para cada uno de los genes, antes mencionados.

Además, para obtener una mayor concentración de tales productos, con un alto porcentaje de rendimiento, se utilizó una ADN polimerasa de alta fidelidad, la enzima *DreamTaq* polimeras. Las condiciones a las cuales se amplificaron los productos fueron las determinadas previamente durante la identificación de los genes LIP3 y YJR107W en la cepa *K. marxianus* L-2029.

Los productos recién amplificados (Figura 30), con el uso de la enzima *DreamTaq* polimerasa, fueron entonces utilizados para la construcción de los vectores, nombrados “a” para el vector con el inserto LIP3 y “b” para el vector con el inserto YJR107W, que serían utilizados para transformar las células competentes de *E. coli* TOP10F’. Construidos los vectores pYES2.1/V5-His-TOPO®-a y pYES2.1/V5-His-TOPO®-b, se procedió a la transformación por choque térmico de las células competentes, por incubación a 42° C, y posterior incubación en hielo; se permitió la recuperación de las células mediante incubación con medio SOB.



**Figura 30.** Amplificación con la enzima *DreamTaq* polimerasa de las lipasas putativas LIP3 y YJR107W para inserción en el vector pYES2.1/V5-His-TOPO®. Carriles: (1) Marcador de tamaño molecular, (2) control negativo, (3) ADN genómico de *K. marxianus* L-2029, (4) YJR107W, (5) LIP3.

Las células transformadas para el constructo *a* y el constructo *b*, fueron inoculadas en medios de cultivo sólido SOB con la presencia del marcador de resistencia para colonias positivas, en este caso el antibiótico ampicilina ( $\text{Amp}^+$ ), en una concentración de  $50 \mu\text{g/mL}$ ; como control positivo, las células transformadas también fueron cultivadas en el mismo medio sin la presencia del antibiótico ( $\text{Amp}^-$ ). Por otro lado, células no transformadas, es decir, sin la adición de ninguno de los constructos mencionados anteriormente, fueron cultivadas en medio SOB  $\text{Amp}^+$  y  $\text{Amp}^-$ . Un tercer control incluyó la transformación de la bacteria usando el plásmido sin inserto.

Después de inoculados los medios de cultivo, tanto  $\text{Amp}^+$  como  $\text{Amp}^-$ , con las células transformadas y por las células competentes usadas como control, se llevaron a incubación durante 16 h a  $37^\circ \text{C}$  para permitir el crecimiento de colonias que expresaran el plásmido, según fuera el caso.

En el caso de las células transformadas con el vector pYES2.1/V5-His-TOPO®-*a*, a partir del gen de la lipasa putativa LIP3, se observó el crecimiento de colonias en el medio SOB  $\text{Amp}^+$ , tanto en el medio donde inicialmente se inocularon  $300 \mu\text{L}$  de células transformadas, como para el medio donde inicialmente se inocularon  $100 \mu\text{L}$  (Figura 31). En el caso del medio SOB  $\text{Amp}^-$  (control positivo), se observó el crecimiento abundante de la bacteria transformada, permitiendo comprobar la viabilidad de la misma.

Resultados similares se obtuvieron para las células de *E. coli* transformadas con el plásmido pYES2.1/V5-His-TOPO®-*b*, a partir del gen YJR107W (Figura 32). Se observó el crecimiento de colonias transformadas en los medios SOB  $\text{Amp}^+$ , tanto en aquella inoculada con  $300 \mu\text{L}$ , como en aquella inoculada con  $100 \mu\text{L}$ . En el caso del cultivo control  $\text{Amp}^-$ , se observó un crecimiento abundante de las células transformadas sobre la superficie del medio de cultivo.

En el medio de cultivo  $\text{Amp}^+$  usado como control negativo, inoculado con células competentes sin transformación no se observó crecimiento alguno de la bacteria, constatando la funcionalidad del marcador de resistencia. A su vez, los medios  $\text{Amp}^-$  inoculados con las mismas células sin transformación, y con células competentes viables, mostraron crecimiento abundante como era de esperarse. Finalmente, las células transformadas únicamente con el plásmido generaron colonias de crecimiento, mostrando la correcta transformación con el plásmido (Figura 33).

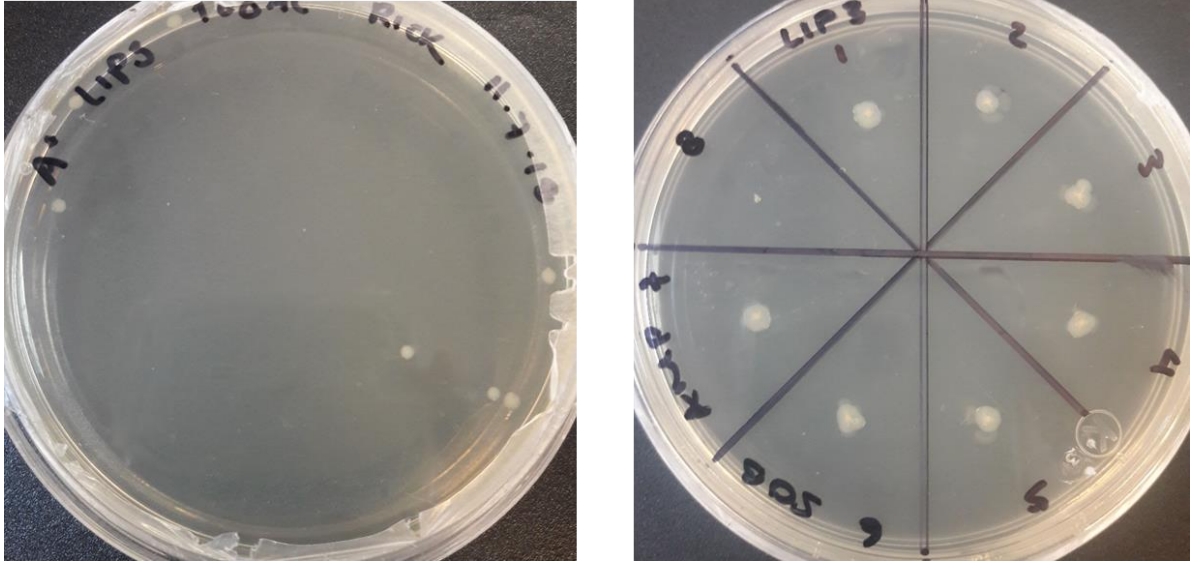


Figura 31. Cultivo en medio sólido con marcador de selección (ampicilina) de colonias transformadas con el vector pYES2.1/V5-His-TOPO<sup>®</sup>-a construido con el gen LIP3, seleccionadas al azar.

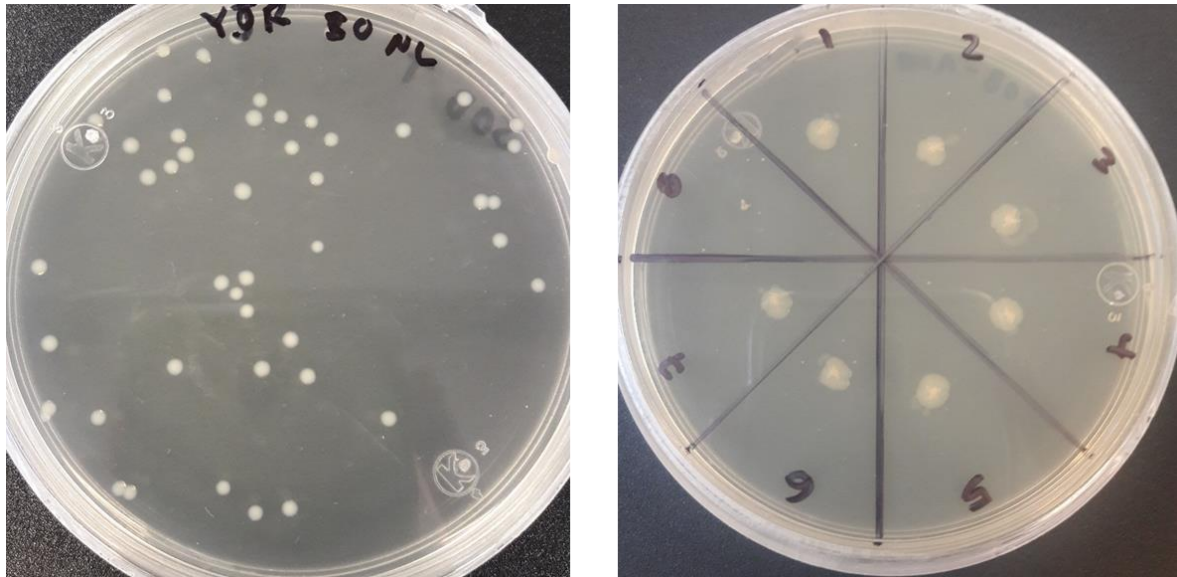
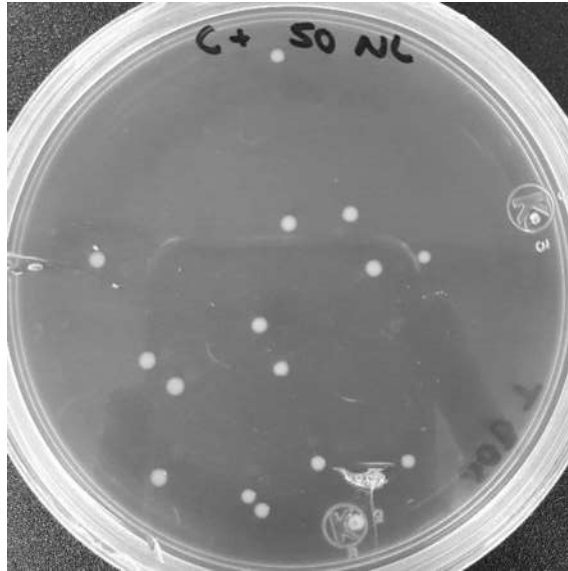


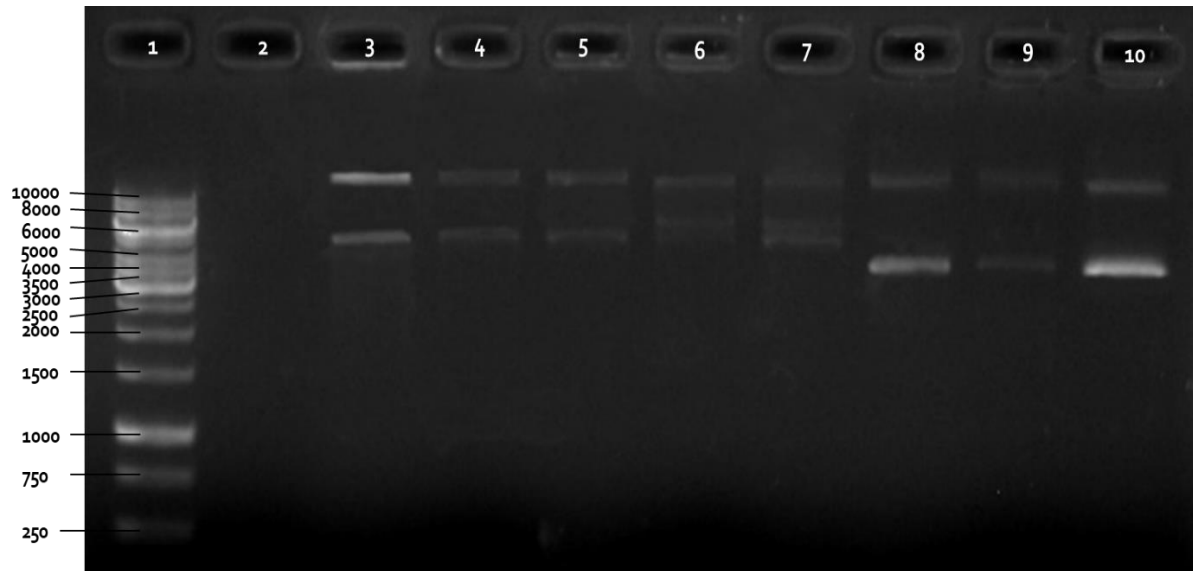
Figura 32. Cultivo en medio sólido con marcador de selección (ampicilina) de colonias transformadas con el vector pYES2.1/V5-His-TOPO<sup>®</sup> construido con el gen YJR107W, seleccionadas al azar.



**Figura 33. Cultivo en medio sólido con marcador de selección (ampicilina) de colonias transformadas con el vector pYES2.1/V5-His-TOPO® sin inserto.**

Una vez detectadas las colonias de células transformadas, expresando el gen de resistencia al antibiótico y, por tanto, el plásmido, se procedió a la verificación de 7 colonias, seleccionadas al azar, para cada uno de los constructos utilizados de LIP3 y YJR107W. La finalidad de este estudio fue detectar posibles falsos positivos en el crecimiento del medio SOB Amp<sup>+</sup>, por la presencia de colonias satélite (colonias que no expresan el gen de resistencia pero que pueden crecer cercanas a colonias que sí lo hacen). Para ello, se picaron las 7 colonias, pertenecientes a cada tipo de célula transformada y se inocularon en medio sólido SOB Amp<sup>+</sup> y medio sólido SOB Amp<sup>-</sup>. Como control de crecimiento negativo, se picó una colonia de células de *E. coli* TOP10F' proveniente de medio sólido SOB Amp<sup>-</sup>.

Como se muestra en la Figura 32 y Figura 33, las colonias seleccionadas al azar crecieron en el medio sólido SOB Amp<sup>-</sup>, comprobándose así la presencia del plásmido; además, en el cuadrante 8 de los medios de cultivo, no se observó crecimiento alguno de la bacteria no transformada. Las colonias transformadas con el inserto de LIP3 fueron denominadas con la letra *a*, numeradas de 1 a 7 de acuerdo al cuadrante de crecimiento en dicho medio de cultivo. Para las colonias transformadas con el plásmido con el gen YJR107W, se denominaron con la letra *b*. Para confirmar la transformación de las bacterias con los respectivos plásmidos, se extrajo el ADN genómico y plasmídico de las 14 colonias seleccionadas al azar. Mediante electroforesis se detectó el correcto aislamiento de ADN de las 14 colonias (Figura 34).



**Figura 34. Extracción de ADN de colonias de *E. coli* TOP10F' transformadas.** Carriles: (1) Marcador de tamaño molecular, (2) control negativo, (3 a 7) ADN genómico y plasmídico proveniente de colonias transformadas con el gen YJR107W, (8 a 10) ADN genómico y plasmídico proveniente de colonias transformadas con el gen LIP3.

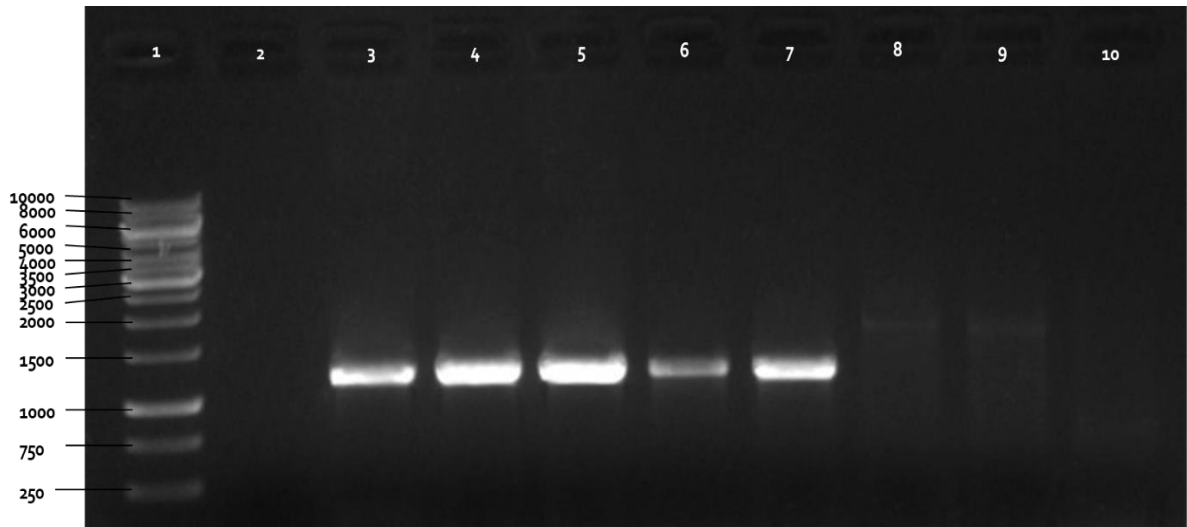
En la Figura 34 se muestran ejemplos representativos de la electroforesis con las muestras de ADN genómico y plasmídico de 5 colonias transformadas con el gen YJR107W (muestras *a1* – *a5*), y 3 colonias transformadas con el gen LIP3 (muestras *b1* – *b3*). En la mayoría de los carriles (3 a 10) se observa la presencia de dos bandas, que corresponderían a cada una de las fracciones esperadas durante la extracción. Las muestras, por tanto, fueron utilizadas para la comprobación de la correcta inserción de ambos genes en los plásmidos respectivos, la cual se realizó por amplificación en PCR. Para ello, se utilizó el *primer Forward* específico de cada uno de los genes, y como *primer Reverse*, el oligo específico para la secuencia V5, propia del plásmido. Una correcta inserción tendría como resultado la amplificación del fragmento de ADN, mientras la detección de un fragmento de distinta longitud o la nula amplificación demostraría una incorrecta inserción.

En las 5 muestras de ADN provenientes de colonias utilizadas para el reconocimiento de la correcta inserción del gen YJR107W, se observó una banda ubicada entre los 1000 y 1500 pb, que correspondería al tamaño de dicho gen (Figura 35, carriles 3 a 7). Para aquellas muestras de reconocimiento de la correcta inserción del gen LIP3, se observó una banda cercana a las 1700 pb en dos de ellas, correspondiente a la longitud del gen en cuestión. Sin embargo, la muestra



de ADN proveniente de la colonia *b3*, no mostró amplificación alguna (Figura 35, carriles 8 a 9).

De esta manera, se seleccionaron 2 muestras de ADN provenientes de la transformación con el gen LIP3, y 5 provenientes de la transformación con el gen YJR107W, para la posterior transformación heteróloga en *S. cerevisiae* BY4742.



**Figura 35. Amplificación de los genes de lipasas extracelulares con el primer plasmídico V5.** Carriles: (1) Marcador de tamaño molecular de 1 kb, (2) control negativo, (3 a 7) constructos con el gen YJR107W, (8 a 10) constructos con el gen LIP3.

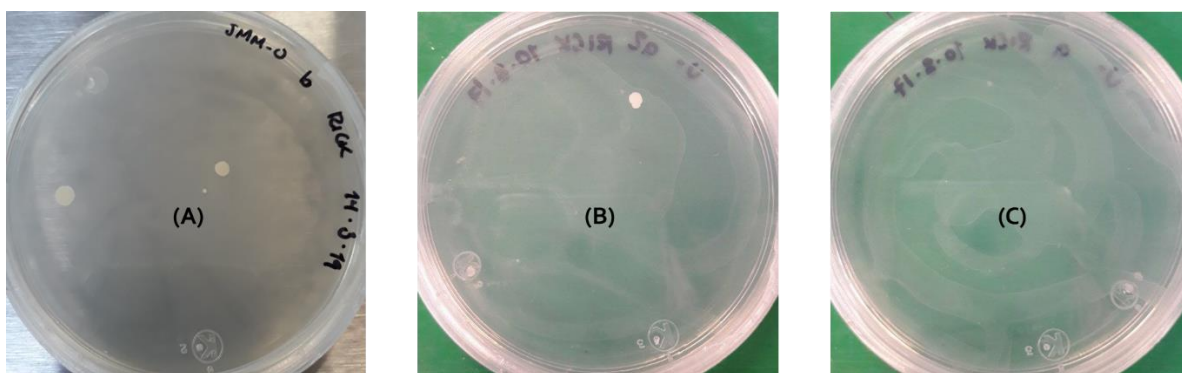
#### 6.2.4.5 EXPRESIÓN HETERÓLOGA EN *S. cerevisiae* BY4742

El ADN extraído a partir de colonias transformadas de *E. coli* TOP10F' con el inserto correctamente posicionado de los genes codificantes para las lipasas putativas extracelulares LIP3 y YJR107W, fue utilizado para la transformación de la levadura auxotrófica para uracilo *S. cerevisiae* BY4742. Además, el ADN extraído de una colonia transformada con el plásmido sin inserto, fue usado para la transformación de la misma levadura auxotrófica, cuyas colonias obtenidas serían usadas más tarde como control negativo de la expresión de las lipasas recombinantes.

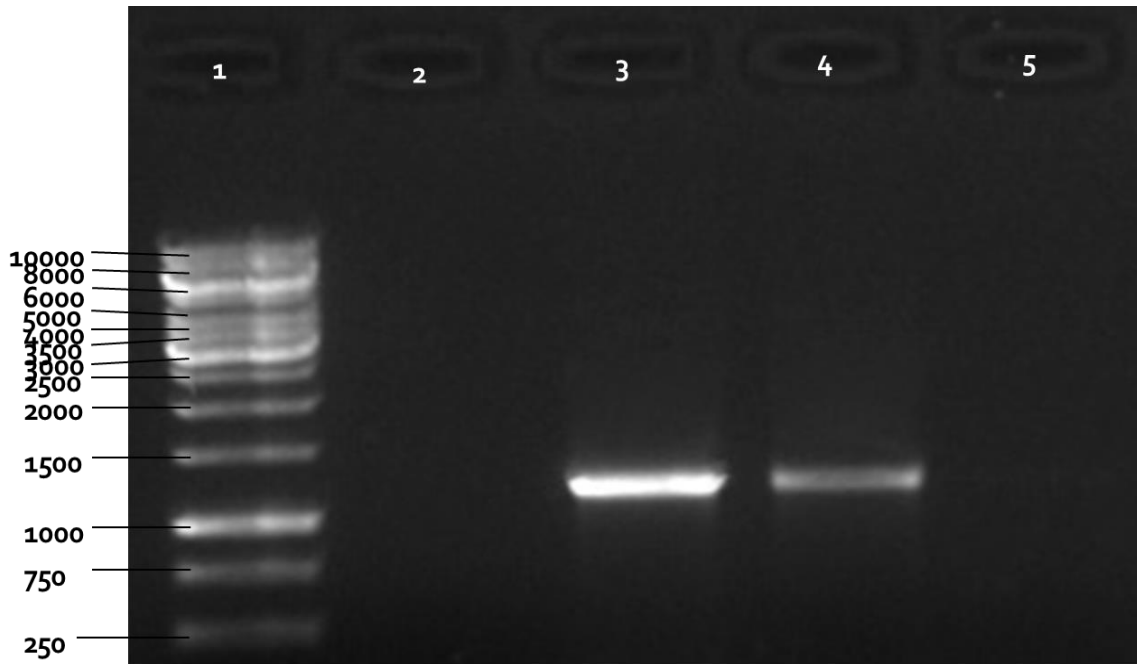
Uno de los componentes del plásmido lanzadera utilizado en la transformación de *S. cerevisiae*, es la presencia del gen URA3 (Figura 24); este gen codifica para la orotidina 5-fosfato descarboxilasa, enzima que se encuentra implicada en la síntesis de pirimidinas de

ribonucleótidos, específicamente el uracilo. Para la selección de las colonias transformantes, por tanto, se utilizó medio sintético mínimo sin uracilo (SMM-U<sup>-</sup>).

Al no obtener colonias transformantes usando la técnica utilizada para la transformación de *S. cerevisiae* BY4742, y debido a que ésta se basa en el uso de un exceso de concentración de acarreador para permitir el ingreso del plásmido al interior de la levadura a transformar, se decidió realizar una prueba aumentando al doble la concentración de *calf thymus* (acarreador) durante la transformación. En dicha prueba, se observó el crecimiento de solo una colonia en el medio de selección con ausencia de uracilo, que podría tratarse de una colonia transformante con el inserto del gen LIP3 (Figura 36B). Con el fin de comprobar la presencia del gen LIP3 en la única colonia transformada de *S. cerevisiae*, se extrajo el ADN de la misma y se amplificó por PCR usando como *primers* específicos el forward del gen en cuestión, y como reverse el *primer* V5 específico del vector utilizado. Se detectó la amplificación del fragmento esperado, confirmando la presencia de dicho gen en la colonia transformada. Al no detectarse la presencia de colonias transformantes para el vector con el gen YJR107W usando una concentración de 0.2 mg de acarreador de ADN *calf thymus*, se decidió triplicar la concentración inicial. La alta concentración de acarreador tuvo un efecto positivo, ya que se detectaron hasta 6 colonias transformantes de *S. cerevisiae* BY4742, en el medio de cultivo de selección sin uracilo (colonias representativas se muestran en la Figura 36A); tales colonias se sembraron para comprobar su crecimiento. Se detectó la amplificación del gen a partir de ADN obtenido de 2 de dichas colonias y el *primer* plasmídico V5 (Figura 37).



**Figura 36. Colonias de *S. cerevisiae* BY4742 transformadas con los constructos de las lipasas putativas LIP3 y YJR107W.** (A) colonias transformadas con constructo del gen YJR107W; (B) colonia transformada con constructo del gen LIP3; (C) control negativo.



**Figura 37.** Amplificación del gen de la lipasa putativa YJR107W con el *primer* plasmídico V5 de colonias transformadas de *S. cerevisiae* BY4742. Carriles: (1) Marcador de tamaño molecular, (2) control negativo, (3 a 5) amplificación a partir de ADN de colonias transformantes con el gen YJR107W.

#### 6.2.4.6 INDUCCIÓN Y SÍNTESIS DE LAS LIPASAS RECOMBINANTES

Una vez obtenidas las colonias transformantes de *S. cerevisiae* BY4742 (2 con el gen YJR107W y 1 con el gen LIP3), y haber confirmado la presencia de los genes de interés en las mismas por amplificación PCR, se procedió a la inducción de su síntesis para su detección por SDS-PAGE y determinación de su actividad lipásica intracelular y extracelular. Debido a las características del vector utilizado para la inserción de los genes en el sistema de expresión, los genes LIP3 y YJR107W quedaron bajo control del promotor *GALI*, inducible con galactosa (Figura 24).

Debido a que el promotor *GALI* es fuertemente reprimido por glucosa e inducido por galactosa, se utilizó medio mínimo sin uracilo con glucosa 2 % para promover el crecimiento de las transformantes en primera instancia; se utilizaron una cepa transformada con cada gen y el control de la levadura transformada sin inserto. Tras 12 h de incubación, se determinó la concentración celular del crecimiento de las 3 muestras. Posteriormente, se recuperó la biomasa

del volumen requerido para inocular una concentración de  $1 \times 10^7$  cel/mL en medio mínimo sin uracilo con el inductor galactosa 2 %.

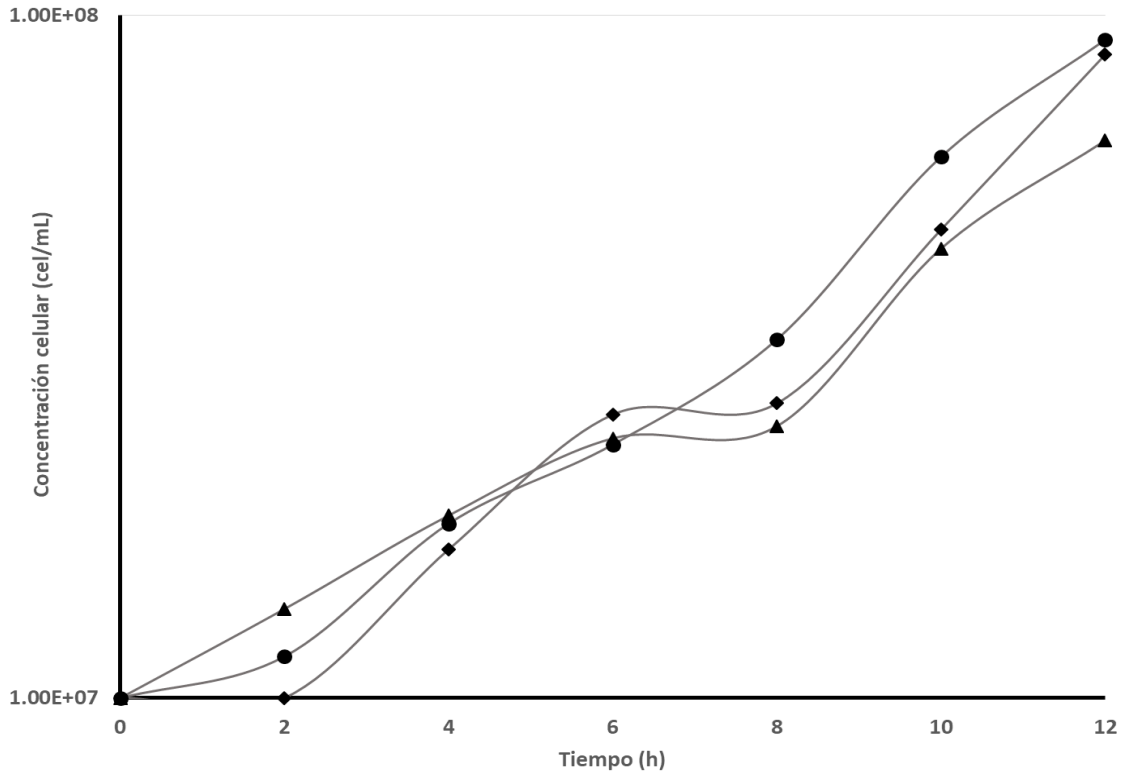
Alícuotas de cada una de las cepas en inducción con galactosa se tomaron cada 2 h, a fin de conocer la concentración celular, la producción de proteína y la actividad lipásica a través de la hidrólisis del p-nitrofenil palmitato; estas dos últimas medidas fueron necesarias para calcular la actividad lipásica tanto intracelular como extracelular. En los siguientes apartados se muestran los resultados obtenidos durante la inducción con galactosa de las diferentes cepas transformadas.

#### DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD LIPÁSICA DE LAS CEPAS DE *S. cerevisiae* BY4742 TRANSFORMADAS CON LOS GENES LIP3 Y YJR107W

Durante la inducción, que se llevó a cabo en un tiempo total de 12 h, se observó un crecimiento celular regular (Figura 38). Sin embargo, no se observó la conclusión de la posible fase exponencial y el paso a la fase estacionaria del crecimiento de las tres cepas de levadura bajo las condiciones de incubación a las que fueron sometidas. El cambio repentino de azúcar, de glucosa a galactosa, por tanto, supuso un impacto en el crecimiento de la levadura en los tres casos. Aunado a ello, es importante señalar que las cepas de levadura transformadas se desarrollaron en un medio de cultivo auxotrófico para uracilo, lo que supone la expresión del plásmido por parte de las mismas.

Con el fin de determinar la producción de las lipasas putativas extracelulares expresadas en *S. cerevisiae* BY4742 e inducidas con galactosa, se determinó la actividad lipásica de las mismas. Para ello, fue necesario primero calcular la producción de proteína total al paso del tiempo, tanto intracelular como extracelularmente.

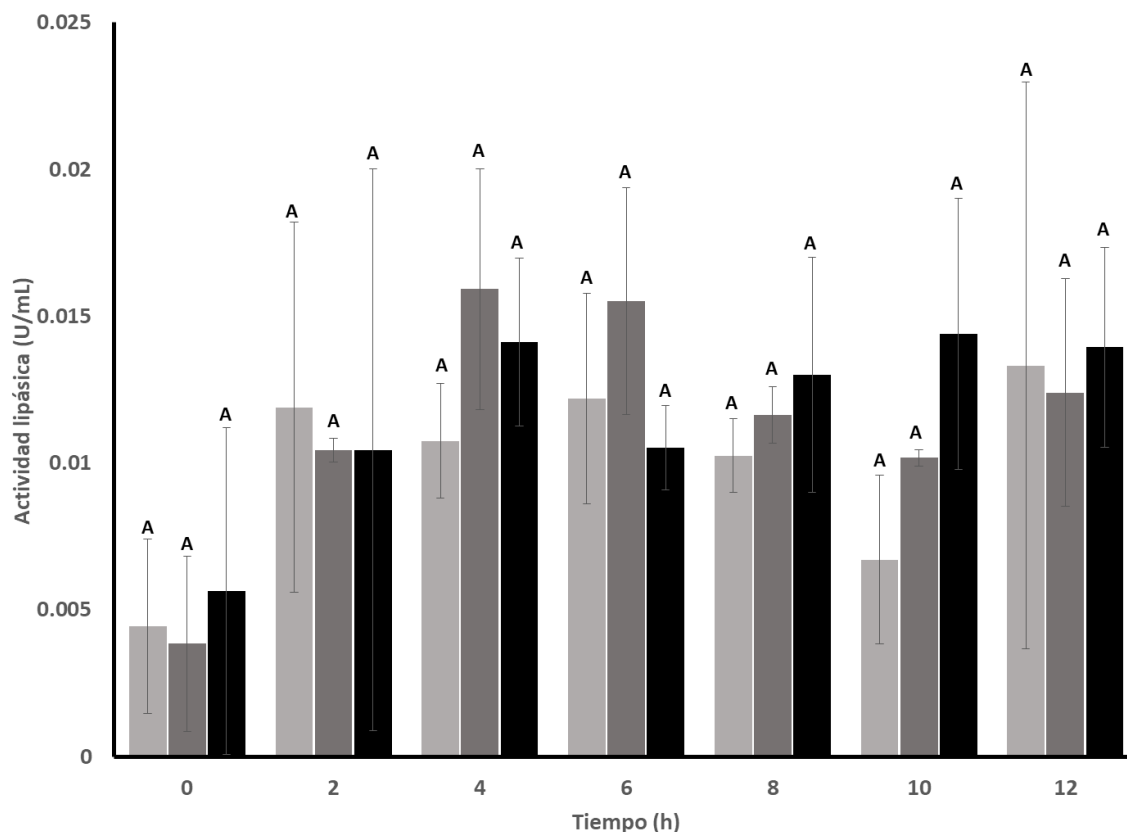
La detección probable de las lipasas recombinantes en el medio extracelular se debió a que, durante el diseño de los *primers* utilizados para la amplificación de las secuencias de nucleótidos que fueron insertados en el plásmido de expresión, se mantuvo la secuencia del péptido señal de ambas lipasas putativas extracelulares, previamente detectado en el análisis bioinformático.



**Figura 38. Concentración celular a través del tiempo durante la inducción con galactosa de las cepas transformadas de *S. cerevisiae* BY4742.** (◆) Cepa transformada con el gen LIP3, (▲) cepa transformada con el gen YJR107W, (●) cepa transformada con el plásmido sin inserto.

La alta relación filogenética entre la levadura no-convencional *K. marxianus* y la usada para la expresión heteróloga, *S. cerevisiae* (Lane & Morrissey, 2010), podría conllevar el reconocimiento de dicho péptido señal y, por tanto, la secreción de las proteínas recombinantes al medio extracelular.

Una vez recuperada la biomasa de cada muestra tomada durante la inducción, y la posterior recuperación del extracto proteico, se determinó la concentración de proteína intracelular, la cual osciló entre 5.7 y 6.5 mg/mL, mostrando una tendencia constante durante todo el tiempo de incubación. A partir de los datos obtenidos de la concentración de p-nitrofenol liberado a partir del p-nitrofenil palmitato, se calculó la actividad lipásica de cada muestra (Figura 39). Los valores obtenidos se compararon estadísticamente por prueba de Tukey-Kramer, a un nivel de significancia de 0.05, para cada tiempo de muestreo entre las dos cepas transformadas con los genes LIP3 y YJR107W y la cepa control.

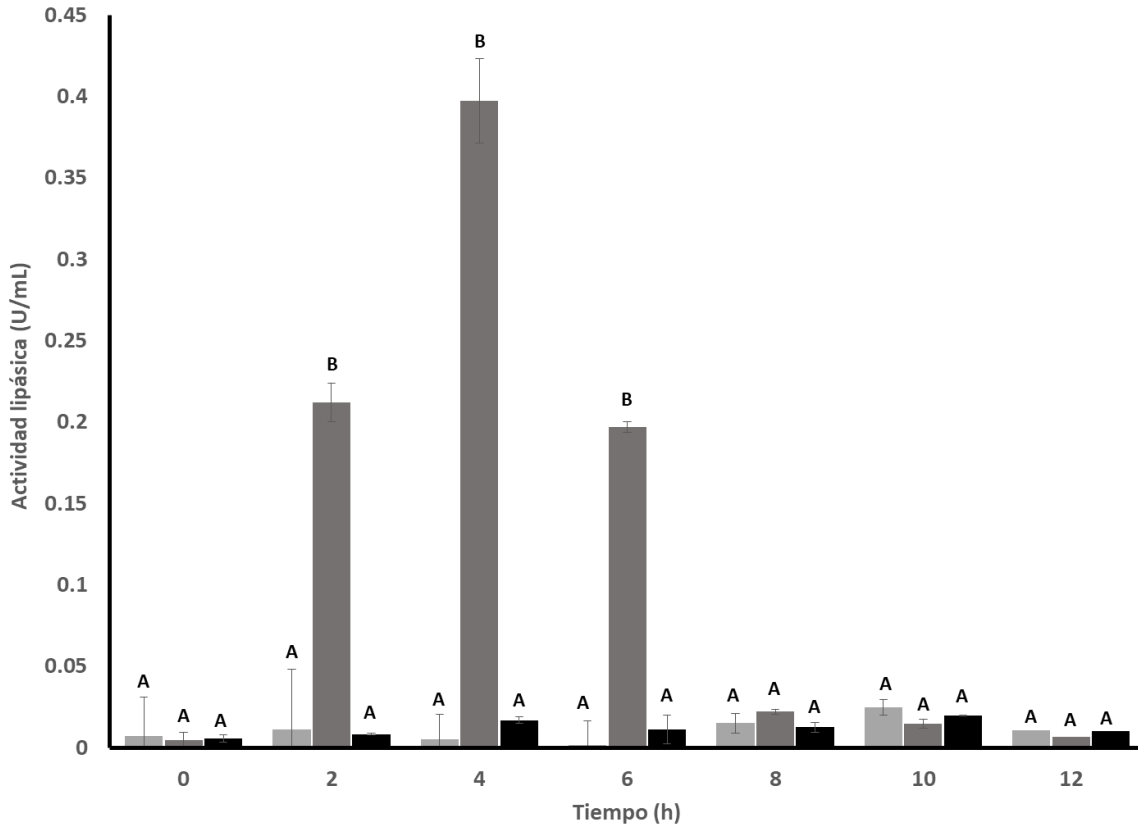


**Figura 39. Actividad lipásica del extracto intracelular de colonias transformadas de *S. cerevisiae* BY4742.**

Gris claro: transformante con gen LIP3; gris oscuro: transformante con gen YJR107W; negro: transformante con plásmido sin inserto. Letras diferentes entre las tres barras de cada punto particular del tiempo, representan diferencia estadística significativa por prueba de Tukey-Kramer a un nivel de significancia de 0.05. n=3.

De acuerdo a los datos obtenidos, no se observó diferencia estadística significativa en ninguna de las muestras analizadas para la actividad lipásica intracelular. La actividad alcanzada a través del tiempo para las 3 cepas, supone la actividad de lipasas intracelulares propias de la levadura.

Por otro lado, se determinó la concentración de proteína total obtenida directamente de los extractos proteicos extracelulares en cada tiempo de muestreo. En este caso, la concentración de proteína osciló entre 0.01 y 0.1 mg/mL, siendo variable entre las 3 cepas y en los distintos tiempos de muestreo. Al igual que con las muestras intracelulares, se determinó la actividad lipásica de las muestras extracelulares y se compararon estadísticamente por prueba de Tukey-Kramer. Al inicio de la inducción no se observó diferencia estadística significativa entre las muestras extracelulares de las tres cepas transformantes; sin embargo, en los tiempos 2, 4 y 6, se detectó un aumento significativo de la actividad lipásica para la muestra proveniente de la



**Figura 40. Actividad lipásica del extracto extracelular de colonias transformadas de *S. cerevisiae* BY4742.**

Gris claro: transformante con gen LIP3; gris oscuro: transformante con gen YJR107W; negro: transformante con plásmido sin inserto. Letras diferentes entre las tres barras de cada punto particular del tiempo, representan diferencia estadística significativa por prueba de Tukey-Kramer a un nivel de significancia de 0.05. n=3.

cepa transformada con el gen YJR107W (Figura 40). La máxima actividad lipásica obtenida fue de 0.397 U/mL, valor estadísticamente mayor al detectado para el control (0.017 U/mL).

El aumento significativo de la actividad lipásica durante las primeras 6 h de incubación en presencia de galactosa está ligada, por tanto, a la posible síntesis de la lipasa recombinante *pYJR107W*, proveniente de *K. marxianus* L-2029.

Existen pocos reportes de la actividad lipásica extracelular utilizando *K. marxianus*. Deive *et al.* (2003) reportaron una actividad lipásica de 4.5 U/mL utilizando aceite de oliva como agente inductor de la cepa *K. marxianus* CECT 1018, tras 7 días de incubación con el agente inductor. A pesar de que este valor es mucho mayor al obtenido para la síntesis de la lipasa recombinante *pYJR107W*, expresada en *S. cerevisiae* BY4742, se debe considerar el tiempo total en el que ambos valores fueron obtenidos y la técnica de determinación de dicha actividad, la

cual fue distinta en ambos casos. En el estudio mencionado se utilizó un ensayo de titulación usando aceite de oliva y tributirina.

Utilizando una técnica de determinación de la actividad lipásica similar a la usada en este estudio, Stergiou *et al.* (2012) optimizaron el proceso de producción del extracto lipásico extracelular en un fermentador aeróbico de tipo *batch*, logrando un aumento de 18 veces la actividad detectada a pH 6.5 y temperatura de 35° C, con aceite de oliva como agente inductor, de la cepa *K. marxianus* IFO 0288; la técnica de medición de la actividad lipásica se basó en la hidrólisis del lauril-p-nitrofenil ester, cuya reacción libera el p-nitrofenol, la cual fue detectada a 405 nm por espectrofotometría. La actividad lipásica obtenida tras la optimización fue de 0.175 U/mL; comparando este valor obtenido con la actividad lipásica detectada para la proteína recombinante *pYJR107W*, es 2 veces menor del valor obtenido tras 4 h de inducción con galactosa.

La medición de la actividad lipásica utilizando la técnica de titulación, sigue siendo utilizada a pesar de sus deficiencias, tales como largos tiempos de análisis baja sensibilidad y potenciales errores debido a una titulación incompleta o sobreexpresada; las deficiencias del uso de métodos espectrofotométricos de la hidrólisis de p-nitrofenil ésteres principalmente se relacionan a la dependencia del pH para detectar la absorción del p-nitrofenol liberado o una incompleta hidrólisis enzimática (Stoytcheva *et al.*, 2012). Estas consideraciones deben tomarse en cuenta al momento de comparar los valores de actividad previamente mencionados y comparados para entender las diferencias entre los mismos.

En un estudio realizado en el grupo de trabajo (Anexo 10.4), se indujo la síntesis de lipasas extracelulares utilizando aceite de aguacate como agente inductor. En el mismo, se determinó la concentración inicial de aceite de aguacate que promoviera la mayor actividad lipásica utilizando la cepa *K. marxianus* L-2029. De Acuerdo a los resultados obtenidos, se observó una actividad de 4.69 U/mL a una concentración inicial de aceite de 3.5 % v/v, tras 8 h de incubación a 30° C y 200 rpm (Figura 5). El valor obtenido directamente de la inducción de la levadura es mucho menor a la determinada en este estudio para la misma lipasa expresada heterológamente. Sin embargo, al constatar recientemente la actividad lipásica de inducción con aceite de aguacate, tratamiento usado como control positivo de la hidrólisis lipásica durante la determinación de actividad enzimática para las muestras extracelulares de la inducción de las transformantes de *S. cerevisiae* BY4742 con los genes *LIP3* y *YJR107W*, se obtuvo un valor de



0.25 U/mL; dicho valor es menor al obtenido para la lipasa recombinante *pYJR107W*. Las posibles variaciones pudieron deberse al pH utilizado durante la medición en cada muestreo, ya que, como se menciona en los siguientes apartados, el pH óptimo de actividad de la proteína en cuestión se vió parcialmente modificado tras la expresión heteróloga.

A pesar de no verse alterado el crecimiento de la cepa transformada con el gen *LIP3*, no se encontró una diferencia significativa en la actividad lipásica extracelular respecto a la cepa transformada sin inserto. La posible razón de esta nula actividad se discute más adelante.

### DETECCIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE POR SDS-PAGE

Además de la determinación de actividad lipásica, las muestras tanto intracelulares como extracelulares se llevaron a SDS-PAGE con el fin de detectar posibles diferencias en el perfil proteico de las mismas. Debido a la baja concentración de proteínas totales, determinadas por el método de Bradford, los extractos se concentraron por precipitación con acetona a baja temperatura. Los extractos obtenidos para las muestras de las 3 cepas alcanzaron concentraciones máximas de proteína de 21 mg/mL. En todos los casos se calculó el volumen necesario para alcanzar una concentración aproximada de 0.1 mg/mL en el gel de electroforesis.

En el caso de las muestras intracelulares, no se observó diferencia alguna de expresión proteica entre las cepas transformadas con los genes *LIP3* y *YJR107W*, respecto a la cepa transformada sin inserto. En la Figura 41 se ejemplifica este hecho para la cepa transformada con el gen *YJR107W* respecto a la cepa control; esto hace suponer que la síntesis de ambas lipasas recombinantes sería de tipo extracelular debido al probable reconocimiento de la péptido señal, y en base a los resultados obtenidos para la actividad lipásica intracelular y extracelular.

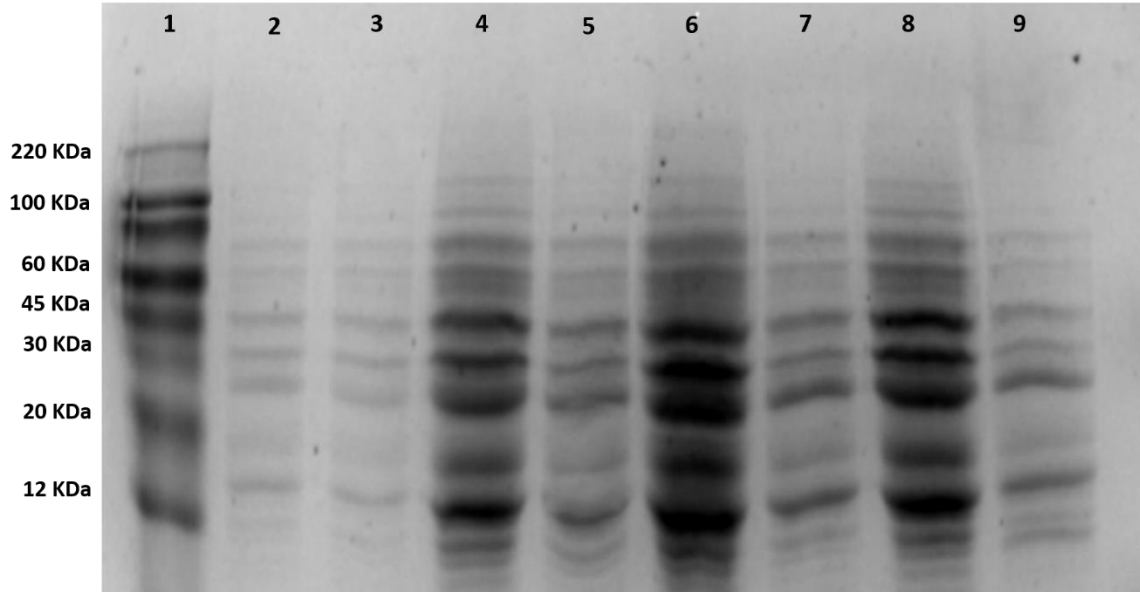
Sin embargo, no se detectó ninguna banda correspondiente a proteína en la muestra extracelular obtenida a partir de la inducción con la cepa de *S. cerevisiae* BY4742 transformada con el gen *LIP3* (no mostrado). Aunado a los resultados nulos de actividad lipásica tanto intracelular como extracelular, no fue posible determinar la síntesis de la lipasa putativa recombinante *pLIP3*. A pesar de la presencia de péptido señal en la secuencia de nucleótidos del gen *LIP3*, las proteínas con un alto porcentaje de identidad a la probable lipasa *pLIP3* no correspondieron propiamente a lipasas, como fue comentado en el análisis bioinformático y modelamiento de dicha enzima. La relación más alta de la lipasa putativa *pLIP3* a una enzima con actividad similar, fue a la proteína ExoU de *P. aeruginosa*. En dicha bacteria, la proteína

mencionada se encuentra translocada en la membrana celular, formando parte del sistema de secreción tipo III; aunado a ello, se ha reportado que dicha proteína tiene actividad de carácter fosfolipasa (Sato & Frank, 2004). Sin embargo, se ha demostrado que la proteína proveniente de *P. aeruginosa* posee un alto efecto citotóxico, y afecta tanto a células mamíferas como levaduras, específicamente comprobado en *S. cerevisiae* (Rabin & Hauser, 2003).

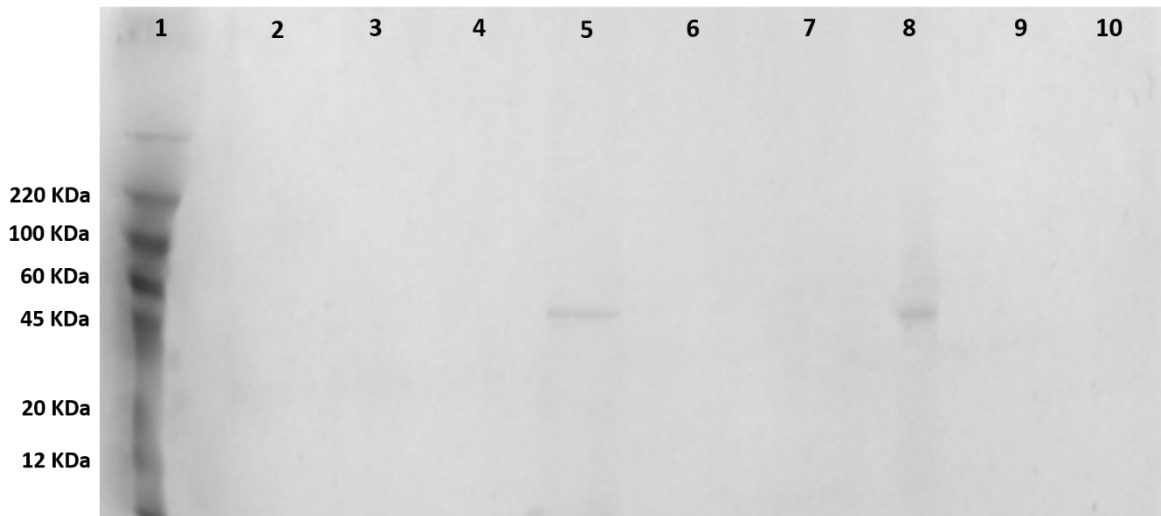
Por otro lado, la alta identidad de ambas secuencias a las de proteínas involucradas en el mantenimiento de lípidos en el citoplasma (Tabla 4), podría poner en evidencia una predicción incorrecta del mecanismo extracelular, siendo *pLIP3* una lipasa de carácter intracelular. Sin embargo, no existió una evidencia de la actividad o presencia de la misma en la cepa de *S. cerevisiae* BY4742 transformada con dicho gen. Además, no se podría descartar que dicha secuencia correspondiera a un pseudogen, ya que, aunque se determinó la presencia de elementos regulatorios en la zona promotora de dicho gen para la cepa *K. marxianus* L-2029, existen ciertos tipos de pseudogenes que mantienen dichos elementos en su estructura (Tutar, 2012). Por la alta relación filogenética encontrada entre los genes *LIP3* y *LIP5*, se podría hablar de un proceso de duplicación en el cromosoma 1 de la levadura (Lertwattanasakul *et al.*, 2015), con la posterior pérdida de la función génica.

En las muestras de extracto proteico extracelular obtenido a partir de la inducción con galactosa de la cepa transformada de *S. cerevisiae* BY4742 con el gen *YJR107W*, se detectó una banda derivada de SDS-PAGE, específicamente a la hora 3 de inducción (Figura 43). Aparentemente la misma se observa en las horas 6, 5 y 4 de inducción, aunque prácticamente es imperceptible. A pesar de tener una concentración adecuada para su detección por SDS-PAGE, el método de concentración por precipitación con acetona podría impactar en su reconocimiento, debido a una baja solubilidad de la proteína después del procedimiento, o debido a la presencia de otros componentes del extracto extracelular (Fic *et al.*, 2010).

A fin de conocer el tamaño molecular aproximado de dicha proteína detectada, se utilizó como control positivo para la electroforesis la lipasa *LIP2* de *C. rugosa* (muestra comercial), la cual tiene un tamaño aproximado de 45 KDa, similar al predicho para la proteína *pYJR107W* en el análisis bioinformático de la misma.



**Figura 41.** SDS-PAGE del extracto intracelular de la cepa *S. cerevisiae* BY4742 transformada con la lipasa *pYJR107W* de *K. marxianus* L-2029. Carril 1: Marcador de tamaño molecular. Carriles 2, 4, 6 y 8: Extractos proteicos intracelulares de la cepa transformada con el gen YJR107W tras 0, 2, 4 y 6 h de inducción, respectivamente. Carriles 3, 5, 7 y 9: Extractos proteicos intracelulares de la cepa transformada con el plásmido sin inserto tras 0, 2, 4 y 6 h, respectivamente.



**Figura 42.** SDS-PAGE del extracto extracelular concentrado de la cepa *S. cerevisiae* BY4742 transformada con la lipasa *pYJR107W* de *K. marxianus* L-2029. Carril 1: Marcador de tamaño molecular. Carriles 2 a 7: Extracto proteico concentrado de la cepa transformada con el gen YJR107W en 6 h (carril 2), 5 h (carril 3), 4 h (carril 4), 3 h (carril 5), 2 h (carril 6) y 0 h (carril 7). Carril 8: Lipasa *LIP2* de *Candida rugosa*. Carriles 9 – 10: Extracto proteico concentrado de la cepa transformada con el plásmido sin inserto a las 6 y 3 h de inducción con galactosa, respectivamente.

La lipasa usada como control positivo se había utilizado previamente para comparar el tamaño molecular de un extracto proteico extracelular proveniente de la inducción de lipasas, usando aceite de aguacate como inductor, directamente de la levadura nativa *K. marxianus* L-2029 (Anexo 10.4, Figura 46), donde se detectó ciertamente la presencia de una proteína con similar tamaño molecular.

En el carril 5 de la Figura 43, se puede apreciar que la banda se encuentra ubicada ligeramente arriba de la banda detectada en el carril 8, correspondiente a la lipasa *LIP2* de *C. rugosa*. Esta posible variación se pudo deber directamente a la inserción del gen en el plásmido utilizado para la transformación de la levadura *S. cerevisiae* BY4742, ya que, como el protocolo del proveedor del plásmido lo menciona, este añade aproximadamente 5 KDa al tamaño molecular de la proteína.

Queda de manifiesto, por tanto, que la única enzima responsable de la actividad lipásica en *K. marxianus*, es la lipasa *pYJR107W*, determinada tanto por inducción directa de la levadura nativa, como por su expresión en otro sistema heterólogo.

#### 6.2.4.7 DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES DEL EXTRACTO OBTENIDO CON PROTEÍNA *pYJR107W* EXPRESADA EN *S. cerevisiae* BY4742

Una vez detectada aparentemente la síntesis y actividad de la lipasa recombinante *pYJR107W*, se determinó el pH y temperatura óptimos de actividad de la misma tomada del extracto lipásico extracelular proveniente de la inducción con galactosa de la cepa *S. cerevisiae* BY4742, las cuales se observan en la Figura 43 y 44, respectivamente.

El pH que mejor promovió la actividad hidrolítica más alta de la enzima recombinante fue de 6 (Figura 43). Este resultado coincide con el obtenido por la inducción directa con aceite de aguacate de la levadura no-convencional *K. marxianus* L-2029. Finalmente, la temperatura óptima de la lipasa recombinante, se encuentra entre 36 y 38° C, la cual coincide con la detectada para la lipasa de la levadura nativa.

Por tanto, no hubo alteraciones en la actividad de la lipasa extracelular *pYJR107W* de *K. marxianus* L-2029, aun cuando esta fue expresada heterológamente en el sistema *S. cerevisiae* BY4742.

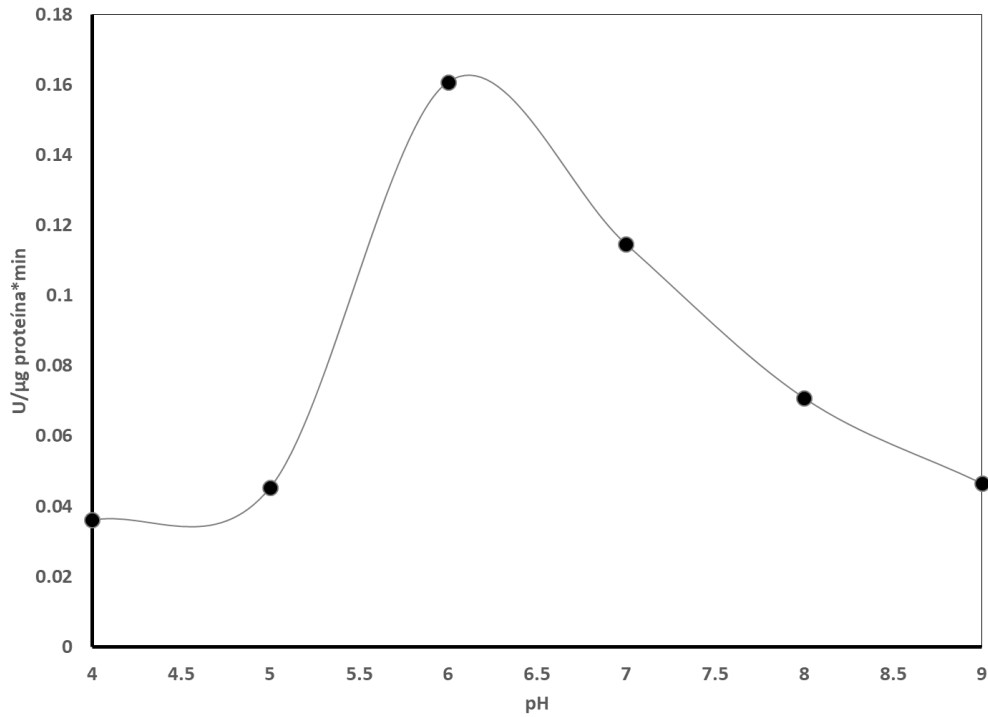


Figura 43. Actividad lipásica a distinto pH del extracto extracelular obtenido de *S. cerevisiae* BY4742 transformada con la lipasa *pYJR107W* de *K. marxianus* L-2029.

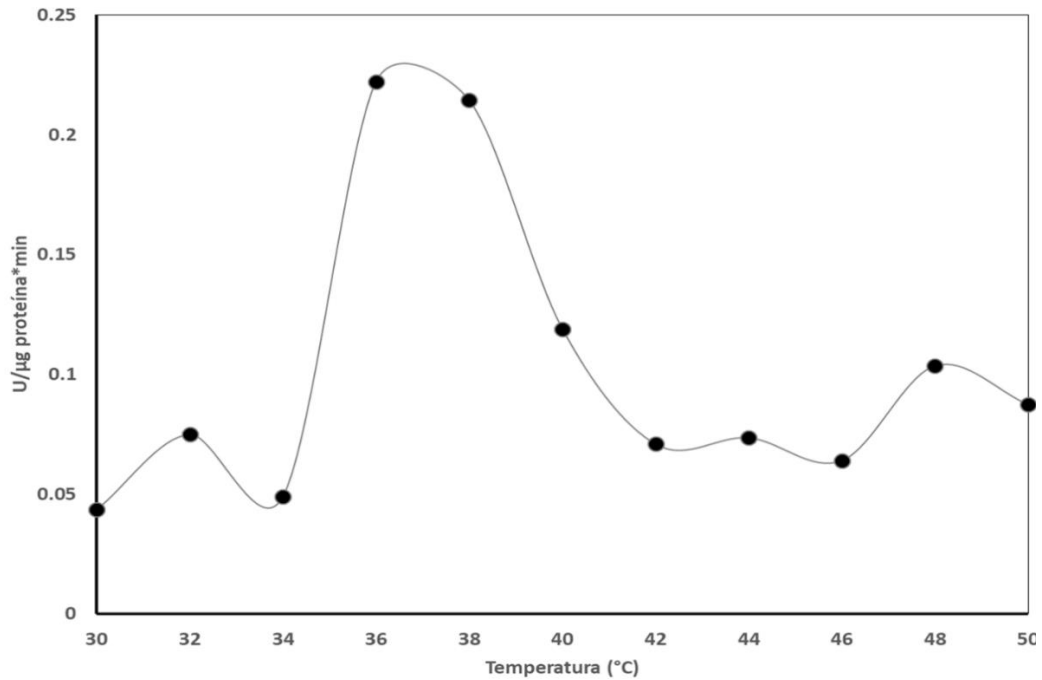


Figura 44. Actividad lipásica dependiente de la temperatura del extracto extracelular obtenido de *S. cerevisiae* BY4742 transformada con la lipasa *pYJR107W* de *K. marxianus* L-2029.

### 6.2.5 CONCLUSIONES

A pesar de que se reconocieron colonias transformantes de *S. cerevisiae* BY4742 con el gen LIP3 de *K. marxianus*, aparentemente codificante para una lipasa extracelular, esta no mostró actividad lipásica, al no reconocerse diferencia estadística significativa con el control. Como se discutió, es probable que la secuencia de nucleótidos perteneciente a LIP3 corresponda a un pseudogen. Por otro lado, debido a su alta relación estructural con proteínas membranales dedicadas al transporte activo, no se podría descartar que la probable enzima *pLIP3* tuviera funciones similares.

Caso contrario sucedió con la lipasa *pYJR107W* expresada heterológamente en *S. cerevisiae*, cuya actividad lipásica extracelular fue detectada. La lipasa sintetizada mostró tener el doble de actividad que la enzima original proveniente de *K. marxianus*. Además, sus pH y temperatura óptimos fueron similares a dicha enzima. Queda de manifiesto que la única enzima extracelular responsable de la actividad lipásica de *K. marxianus* L-2029 se encuentra codificada en el gen YJR107W.

### 6.2.6 LITERATURA CONSULTADA

A continuación, se muestran las referencias de aquellas citas que no mencionadas en el capítulo anterior:

- Abdou, A. M. 2003. **“Purification and Partial Characterization of Psychrotrophic *Serratia marcescens* Lipase.”** *Journal of Dairy Science Association* 86: 127–32.
- Alarcón, V. M. R. 2008. **Producción de La Lipasa LIP2 de *Candida rugosa* En El Sistema *Pichia pastoris*: Caracterización Y Aplicación En Reacciones de Síntesis.** Tesis de Doctorado. Departamento de Ingeniería Química, Universidad Autónoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona, España.
- Bradford, Marion. 1976. **“A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding”.** 254 (72): 248–54.
- Colla, L. M., J. Rizzardi, M. Heidtmann, C. Oliveira, T. E. Bertolin, and Costa J. A. 2010. **“Simultaneous Production of Lipases and Biosurfactants by Submerged and Solid-State Bioprocesses.”** *Bioresource Technology* 101: 8308–14.

- Diez, A. E. A., and L. M. Castañeda S. 2012. **“Producción Biotecnológica de Lipasas Microbianas, Una Alternativa Sostenible Para La Utilización de Residuos Agroindustriales.”** *Vitae* 19 (3): 244–47.
- Ertuğrul, S., G. Dönmez, and S. Takaç. 2007. **“Isolation of Lipase Producing *Bacillus* Sp. from Olive Mill Wastewater and Improving Its Enzyme Activity.”** *Journal of Hazardous Materials* 149 (3): 720–24.
- Fic, E., S. Kedracka-Krok, U. Jankowska, A. Pirog, and M. Dziejzicka-Wasylewska. 2010. **“Comparison of Protein Precipitation Methods for Various Rat Brain Structures prior to Proteomic Analysis.”** *Electrophoresis* 31 (21): 3573–79.
- Giniger, E., S. M. Varnum, and M. Ptashne. 1985. **“Specific DNA Binding of GAL4, a Positive Regulatory Protein of Yeast.”** *Cell* 40 (4): 767–74.
- Kempka, A. P., N. Lamb L., T. Da Luz Fontoura P., S. Menoncin, H. Treichel, D. M G Freire, M. Di Luccio, and D. De Oliveira. 2008. **“Response Surface Method to Optimize the Production and Characterization of Lipase from *Penicillium verrucosum* in Solid-State Fermentation.”** *Bioprocess and Biosystems Engineering* 31 (2): 119–25.
- Kordel, M., B. Hofmann, D. Schomburg, and R. D. Schmid. 1991. **“Extracellular Lipase of *Pseudomonas* Sp. Strain ATCC 21808: Purification, Characterization, Crystallization, and Preliminary X-Ray Diffraction Data.”** *Journal of Bacteriology* 173 (15): 4836–41.
- Pahoja, V. M., and M. A. Sethar. 2002. **“A Review of Enzymatic Properties of Lipase in Plants, Animals and Microorganisms.”** *Pakistan Journal of Applied Sciences* 2 (4): 474–84.
- Pencreac’h, G., and J. Baratti. 1996. **“Hydrolysis of P-Nitrophenyl Palmitate in N-Heptane by the *Pseudomonas cepacia* Lipase: A Simple Test for the Determination of Lipase Activity in Organic Media.”** *Enzyme and Microbial Technology* 18 (6): 417–22.
- Rabin, S. D.P., and A. R. Hauser. 2003. **“*Pseudomonas aeruginosa* ExoU, a Toxin Transported by the Type III Secretion System, Kills *Saccharomyces cerevisiae*.”** *Infection and Immunity* 71 (7): 4144–50.
- Sambrook, J., and D. W. Russell. 2001. **Molecular Cloning.** Third. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA.
- Sato, H., and D. W. Frank. 2004. **“ExoU Is a Potent Intracellular Phospholipase.”** *Molecular Microbiology* 53 (5): 1279–90.

- Sharma, R., Y. Chisti, U. Chand B., and U. Chand. 2001. **“Production, Purification, Characterization, and Applications of Lipases.”** *Biotechnology Advances* 19 (8): 627–62.
- Stoytcheva, M., G. Montero, R. Zlatev, J. A. Leon, and V. Gochev. 2012. **“Analytical Methods for Lipases Activity Determination: A Review.”** *Current Analytical Chemistry* 8 (3): 400–407.
- ThermoScientific. 2011. **“Assessment of Nucleic Acid Purity.”** *Protocols and Product Manuals T042* (Technical Bulletin): 1–2.
- Tutar, Y. 2012. **“Pseudogenes.”** *Comparative and Functional Genomics* 2012: 1–4.
- USDA (U.S. Department of Agriculture). 2011. **Avocado, almond, pistachio and walnut Composition. Nutrient Data Laboratory.** USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 24. Washington, DC: U.S. Department of Agriculture.
- Vakhlu, J., and A. Kour. 2006. **“Yeast Lipases: Enzyme Purification, Biochemical Properties and Gene Cloning.”** *Electronic Journal of Biotechnology* 9 (1): 69–85.
- West, R. W., R. R. Yocum, and M. Ptashne. 1984. **“Saccharomyces cerevisiae GAL1-GAL10 Divergent Promoter Region: Location and Function of the Upstream Activating Sequence UASG.”** *Molecular and Cellular Biology* 4 (11): 2467–78.
- Winkler, U. K., and 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.
- Yadav, R. P., R. K. Saxena, R. Gupta, and S. Davidson. 1998. **“Lipase Production by *Aspergillus* and *Penicillium* Species.”** *Folia Microbiologica* 43 (4): 373–78.



## VII. CONCLUSIONES GENERALES

A pesar de que se detectaron dos lipasas con posible actividad extracelular en *K. marxianus*, resultado del análisis bioinformático de las secuencias codificantes de los genes de las mismas, se comprobó que sólo una de ellas (*pYJR107W*) es la responsable de la actividad lipásica extracelular reportada previamente y constatada en este estudio para la cepa L-2029, de acuerdo a los resultados obtenidos para la proteína recombinante que fue expresada en *S. cerevisiae* BY4742 y cuya síntesis fue inducida con galactosa. La detección únicamente de dicha lipasa en un extracto extracelular obtenido directamente de la inducción con aceite de aguacate a partir de la levadura *K. marxianus* L-2029, confirma tal aseveración.

De acuerdo al análisis realizado a partir de la secuencia del gen de la hasta entonces lipasa putativa, y posteriormente de la enzima expresada heterológamente, *pYJR107W* pertenece a la familia abH23.02, clase GX, con pentapéptido GHSLG; su triada catalítica está conformada por los residuos S196, D264 e H333, mientras la brecha oxianiónica está compuesta por L197 y S121. El gen codificante para dicha lipasa, además, parece estar regulado por elementos de respuesta a oleato (ORE), los cuales fueron detectados en la zona promotora del gen *YJR107W* de *K. marxianus* L-2029.

En relación a la lipasa *pYJR107W* de *K. marxianus* L-2029, expresada heterológamente en *S. cerevisiae* BY4742, presentó su máxima actividad tras 4 h de inducción, y ésta fue casi 2 veces mayor de la medida para el extracto extracelular obtenido directamente de la levadura nativa. Aunado a ello, mantuvo un máximo de actividad a pH y temperatura similares y dentro de los rangos determinados para la lipasa nativa.

Por otro lado, la otra lipasa putativa de *K. marxianus*, *pLIP3*, tiene un pentapéptido conservado GTSMG, el cual no coincide con ninguna familia de lipasas reportadas hasta el momento. La inducción con galactosa de la cepa de *S. cerevisiae* BY4742 transformada con el gen *LIP3*, no mostró actividad lipásica alguna, ni la probable proteína recombinante pudo ser detectada por electroforesis (SDS-PAGE). Su alta relación de estructura, además, a proteínas asociadas a la membrana celular, podría explicar la prácticamente nula actividad que la cepa transformada con este gen mostró.

## VIII. PERSPECTIVAS Y/O RECOMENDACIONES

A pesar que el análisis bioinformático de las secuencias de las 8 lipasas putativas de *K. marxianus* indicó la existencia de dos posibles lipasas extracelulares, sólo se comprobó la actividad de una de ellas, codificada en el gen YJR107W. Respecto a la probable enzima putativa codificada en el gen LIP3, no se obtuvo un buen modelo tridimensional que la representara ni esta fue expresada durante su expresión heteróloga. A partir de estos resultados, surge la duda si la probable proteína codificada en dicho gen corresponde propiamente a una enzima del tipo lipasa, que pudiera ubicarse posiblemente en la membrana celular; la alternativa a dicha respuesta es que se tratara de un pseudogen, ocurrida durante la duplicación de la lipasa putativa intracelular codificada en el gen LIP5.

Por otro lado, la lipasa extracelular YJR107W, de la cual se comprobó es la responsable de la actividad lipásica extracelular de *K. marxianus*, debe estudiarse a profundidad para conocer sus probables usos y aplicaciones a gran escala, ya que en el presente estudio sólo se determinó su pH y temperatura óptimos. La lipasa expresada heterológamente en *S. cerevisiae* BY4742, mostró tener una actividad similar a la sintetizada por la levadura *K. marxianus*, por lo que, en primera instancia, se podría hacer un análisis comparativo de las propiedades de ambas enzimas, a fin de determinar aquella con un mejor perfil de cara a ser usada en otros procesos. Para ello se deberá determinar el perfil de ácidos grasos de los cuales son capaces de catalizar mejor su hidrólisis, su estabilidad en diversos solventes orgánicos, las reacciones de esterificación y transesterificación que son capaces de catalizar y la selectividad que estas enzimas presentan, que podrá predecir las posibles aplicaciones que tendrían estas enzimas en alguna de las industrias donde comúnmente son utilizadas.

Por último, las lipasas putativas de *K. marxianus* L-2029, detectadas con actividad intracelular, se estudian actualmente dentro del grupo de trabajo, con la finalidad de reconocer sus propiedades y funciones en la levadura, además de reconocer su actividad, por lo que podrían también tener aplicaciones potenciales a futuro.

## IX. BIBLIOGRAFÍA COMPLEMENTARIA

A continuación, se muestran las referencias de aquellas citas no mencionadas en los capítulos anteriores:

Akoh, C. C., G. C. Lee, and J. F. Shaw. 2004. “**Protein Engineering and Applications of *Candida rugosa* Lipase Isoforms.**” *Lipids* 39 (6): 513–26.

Athenstaedt, K, D Zweytick, A Jandrositz, S D Kohlwein, and G Daum. 1999. “**Identification and Characterization of Major Lipid Particle Proteins of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*.**” *Journal of Bacteriology* 181 (20): 6441–48.

Athenstaedt, Karin, and Günther Daum. 2003. “**YMR313c/TGL3 Encodes a Novel Triacylglycerol Lipase Located in Lipid Particles of *Saccharomyces cerevisiae*.**” *The Journal of Biological Chemistry* 278 (26): 23317–23.

Brady, L., A. M. Brzozowski, Z. S. Derewenda, E. Dodson, G. Dodson, S. Tolley, J. P. Turkenburg, et al. 1990. “**A Serine Protease Triad Forms the Catalytic Centre of a Triacylglycerol Lipase.**” *Nature* 343 (6260): 767–70.

Brzozowski, A. Marek, H. Savage, C. S. Erma, J. P. Turkenburg, D. M. Lawson, A. Svendsen, and S. Patkar. 2000. “**Structural Origins of the Interfacial Activation in *Thermomyces (humicola) lanuginosa* Lipase.**” *Biochemistry* 39 (49): 15071–82.

Dulermo, T., B. Tréton, A. Beopoulos, A. P. K. Gnankon, R. Haddouche, and J. M. Nicaud. 2013. “**Characterization of the Two Intracellular Lipases of *Y. lipolytica* Encoded by TGL3 and TGL4 Genes: New Insights into the Role of Intracellular Lipases and Lipid Body Organization.**” *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1831 (9): 1486–95.

Epple, U. D., I. Suriapranata, E. L. Eskelinen, and M. Thumm. 2001. “**Aut5/Cvt17p, a Putative Lipase Essential for Disintegration of Autophagic Bodies inside the Vacuole.**” *Journal of Bacteriology* 183 (20): 5942–55.

Epple, U. D., E. L. Eskelinen, and M. Thumm. 2003. “**Intravacuolar Membrane Lysis in *Saccharomyces cerevisiae*: Does Vacuolar Targeting of Cvt17/Aut5p Affect Its Function?**” *Journal of Biological Chemistry* 278 (10): 7810–21.

Fonseca, G. G., E. Heinzle, C. Wittmann, and A. K. Gombert. 2008. “**The Yeast *Kluyveromyces***

- marxianus* and Its Biotechnological Potential.”** *Applied Microbiology and Biotechnology* 79 (3): 339–54.
- Galibert, F, D Alexandraki, A Baur, E Boles, N Chalwatzis, J C Chuat, F Coster, et al. 1996. **“Complete Nucleotide Sequence of *Saccharomyces cerevisiae* Chromosome X.”** *The EMBO Journal* 15 (9): 2031–49.
- Gellissen, G., and C. P. Hollenberg. 1997. **“Application of Yeasts in Gene Expression Studies: A Comparison of *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha* and *Kluyveromyces lactis* - A Review.”** *Gene* 190 (1): 87–97.
- Goffeau, A, B. G. Barrell, H. Bussey, R. W. Davis, B. Dujon, H. Feldmann, F Galibert, et al. 1996. **“Life with 6000 Genes.”** *Science* 274: 546–67.
- Grillitsch, K., and G. Daum. 2011. **“Triacylglycerol Lipases of the Yeast”** 6 (3): 219–30.
- Grochulski, P., Y. Li, J. D. Schrag, and M. Cygler. 1994. **“Two Conformational States of *Candida rugosa* Lipase.”** *Protein Science* 3 (1): 82–91.
- Ham, H. J., H. J. Rho, S. K. Shin, and H. J. Yoon. 2010. **“The TGL2 Gene of *Saccharomyces cerevisiae* Encodes an Active Acylglycerol Lipase Located in the Mitochondria.”** *Journal of Biological Chemistry* 285 (5): 3005–13.
- Hasan, F., A. A. Shah, and A. Hameed. 2009. **“Methods for Detection and Characterization of Lipases: A Comprehensive Review.”** *Biotechnology Advances* 27 (6): 782-98.
- Inokuma, K., J. Ishii, K. Y. Hara, M. Mochizuki, T. Hasunuma, and A. Kondo. 2015. **“Complete Genome Sequence of *Kluyveromyces marxianus* NBRC1777, a Nonconventional Thermotolerant Yeast.”** *Genome Announcements* 3 (2): 1–2.
- Jaeger, K. E., B. W. Dijkstra, and M. T. Reetz. 1999. **“Bacterial Biocatalysts: Molecular Biology, Three-Dimensional Structures, and Biotechnological Applications of Lipases.”** *Annual Review of Microbiology* 53: 315–51.
- Jaeger, K. E., B. Schneidinger, F. R., M. Werner, D. Lang, B. W. Dijkstra, K. Schimossek, A. Zonta, and M. T. Reetz. 1997. **“Bacterial Lipases for Biotechnological Applications.”** *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 3 (1-4): 3–12.
- Kurat, C. F., K. Natter, J. Petschnigg, H. Wolinski, K. Scheuringer, H. Scholz, R. Zimmermann, R. Leber, R. Zechner, and S. D. Kohlwein. 2006. **“Obese Yeast: Triglyceride Lipolysis Is**

- Functionally Conserved from Mammals to Yeast.”** *Journal of Biological Chemistry* 281 (1): 491–500.
- Maeda, Y., M. Oku, and Y. Sakai. 2015. “**A Defect of the Vacuolar Putative Lipase Atg15 Accelerates Degradation of Lipid Droplets through Lipolysis.**” *Autophagy* 11 (8): 1247–58.
- Meunchan, M., S. Michely, H. Devillers, J. M. Nicaud, A. Marty, and C. Neuvéglise. 2015. “**Comprehensive Analysis of a Yeast Lipase Family in the *Yarrowia* Clade.**” *PLOS ONE* 10 (11): 1–22.
- Mizushima, N., T. Yoshimori, and Y. Ohsumi. 2011. “**The Role of Atg Proteins in Autophagosome Formation.**” *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 27 (1): 107–32.
- Pleiss, J., M. Fischer, and R. D. Schmid. 1998. “**Anatomy of Lipase Binding Sites: The Scissile Fatty Acid Binding Site.**” *Chemistry and Physics of Lipids* 93 (1-2): 67–80.
- Rajakumari, S., R. Rajasekharan, and G. Daum. 2010. “**Triacylglycerol Lipolysis Is Linked to Sphingolipid and Phospholipid Metabolism of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*.**” *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1801 (12): 1314–22.
- Schmidt, C., K. Athenstaedt, B. Koch, B. Ploier, and G. Daum. 2013. “**Regulation of the Yeast Triacylglycerol Lipase Tgl3p by Formation of Nonpolar Lipids.**” *Journal of Biological Chemistry* 288 (27): 19939–48.
- Selvaraju, K., S. Rajakumar, and V. Nachiappan. 2014. “**Identification of a Phospholipase B Encoded by the LPL1 Gene in *Saccharomyces cerevisiae*.**” *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1841 (10): 1383–92.
- Shirazi, S. H., S. R. Rahman, and M. M. Rahman. 1998. “**Short Communication: Production of Extracellular Lipases by *Saccharomyces cerevisiae*.**” *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 14 (4): 595–97.
- Sun, L. L., M. Li, F. Suo, X. M. Liu, E. Z. Shen, B. Yang, M. Q. Dong, W. Z. He, and L. L. Du. 2013. “**Global Analysis of Fission Yeast Mating Genes Reveals New Autophagy Factors.**” *PLoS Genetics* 9 (8).
- Suzuki, T., T. Hoshino, and A. Matsushika. 2014. “**Draft Genome Sequence of *Kluyveromyces***

- marxianus* Strain DMB1, Isolated from Sugarcane Bagasse Hydrolysate.”** *Genome Announcements* 2 (4): 733–14.
- Svendsen, Allan. 2000. “**Lipase Protein Engineering.**” *Biochimica et Biophysica Acta* 1543 (2): 223–38.
- Varthini, L. V., K. Selvaraju, M. Srinivasan, and V. Nachiappan. 2015. “**ROG1 Encodes a Monoacylglycerol Lipase in *Saccharomyces cerevisiae*.**” *FEBS Letters* 589 (1): 23–30.
- Verma, N., S. Thakur, and A. K. Bhatt. 2012. “**Microbial Lipases: Industrial Applications and Properties (A Review).**” *International Research Journal of Biological Sciences* 1 (8): 88–92.
- Zouaoui, Benattouche, and Abbouni Bouziane. 2012. “**Production, Optimization and Characterization of the Lipase from *Pseudomonas aeruginosa*.**” *Romanian Biotechnological Letters* 17 (2): 7187–93.

## X. ANEXOS

### 10.1 SCREENING DE LEVADURAS CON ACTIVIDAD LIPÁSICA

Previo a la determinación del uso de la levadura *K. marxianus* en este estudio, se estableció la actividad lipásica de forma cualitativa de 19 levaduras aisladas de ambientes naturales del estado y caracterizadas en el Laboratorio de Bioquímica del Instituto Tecnológico de Morelia, las cuales se enlistan en la Tabla 10.

La determinación se hizo en medio sólido Spirit Blue con una composición de caseína pancreática digerida (10 g/L), extracto de levadura (5 g/L), agar (20 g/L) y el colorante Spirit Blue (0.15 g/L). La producción de lipasas en este medio es indicada por la formación de halos claros alrededor de las colonias de crecimiento en placas de Petri. El colorante indicador cambia de color por el descenso de pH debido a la liberación de ácidos grasos (Hasan *et al.*, 2009).

Medios de cultivo líquido YPD (glucosa 20 g/L, extracto de levadura 10 g/L, peptona 10 g/L) fueron incubados por 24 h en agitación y temperatura controladas, para el crecimiento de las diferentes cepas. Por cada caja de medio de cultivo *Spirit Blue* se incubaron 3 levaduras con una concentración inicial de  $3 \times 10^7$  cel/mL y en tres diluciones seriadas. Las placas fueron inoculadas y monitoreadas hasta un tiempo final de 72 h.

La determinación cualitativa de la actividad lipásica de 19 levaduras (Tabla 10), del cepario del Laboratorio de Bioquímica del Instituto Tecnológico de Morelia, se realizó por crecimiento en medio agar Spirit Blue, por diluciones seriadas. El medio permite conocer la actividad enzimática por formación de halos de degradación (del color azul característico del medio) en respuesta al cambio de pH y la acidificación del mismo (Casas-Godoy *et al.*, 2009).

Para reconocer la actividad lipásica de la levadura *K. marxianus* ITMLB03, ahora L-2029 (Figura 45, fila inferior), se utilizó un control positivo de *Y. lipolytica* E129 (fila central) y uno negativo de *S. cerevisiae* W303 (carril superior), los cuales fueron determinados previamente por separado (datos no mostrados).

La degradación de coloración del medio cultivo, y por tanto la actividad lipásica, fue monitoreada cada 12 h. En la Figura 8 se muestra la degradación parcial a las 24 h (izquierda), y total a las 48 h (derecha). Transcurridas 24 h de incubación, se muestra una clara formación de halos de degradación debido al crecimiento y actividad de *K. marxianus* ITMLB03, así como del control positivo de *Y. lipolytica* E129; no así del control negativo *S. cerevisiae* W303.

**Tabla 9. Levaduras pertenecientes al cepario del Laboratorio de Bioquímica del Instituto Tecnológico de Morelia**

<b>Levadura</b>	<b>Clave</b>
<i>P. pastoris</i>	PYCGS115
<i>D. hansenii</i>	PY
<i>S. cerevisiae</i>	LA AZTECA
<i>S. cerevisiae</i>	W303
<i>Z. bailli</i>	ISA1307
<i>C. tropicalis</i>	ITMLB01
<i>K. marxianus</i>	ITMLB03
<i>C. shehatae</i>	ITMLB04
<i>P. stipitis</i>	ITMLB05
<i>K. apiculata</i>	ITMLB10
<i>K. africana</i>	ITMLB11
<i>A1</i>	ITMLB14
<i>D3</i>	ITMLB15
<i>Y. lipolytica</i>	E129
<i>K. lactis</i>	WM27
<i>Dri Ale Yeast</i>	-
<i>D2</i>	ITMLB18
<i>C. albicans</i>	ATCC14066
<i>C. albicans</i>	ATCC14055

Por su parte, 48 h después de la inoculación de las levaduras al medio de cultivo, se observa una degradación total en la coloración del medio de cultivo, debido a la presencia de las dos levaduras que sí presentaron actividad lipásica.

Por tanto, la cepa *K. marxianus* ITMLB03, ahora L-2029, presentó actividad lipásica de forma cualitativa en una forma similar al control positivo de *Y. lipolytica* E129, lo que la hizo competente para los estudios posteriores propuestos en este trabajo.





**Figura 45. Determinación cualitativa de actividad lipásica de 3 cepas pertenecientes al cepario del Laboratorio de Bioquímica del Instituto Tecnológico de Morelia.** Medio Spirit Blue después de incubación a diferentes tiempos: 24 horas (izquierda) y 48 horas (derecha). Fila superior: *S. cerevisiae* W303; fila central: *Y. lipolytica* E129; fila inferior: *K. marxianus* ITMLB03.

## 10.2 SECUENCIAS DE LAS LIPASAS PUTATIVAS EXTRACELULARES DE *K. marxianus*

SECUENCIAS DE LAS LIPASAS PUTATIVAS EXTRACELULARES DE *K. marxianus*  
DMU 3-1042

LIPASA 3 (LIP3)

>gi|574139827:1076718-1078499 *Kluyveromyces marxianus* DMKU3-1042 DNA, complete genome, chromosome 1

ATGTTGTGGCTCAAACAGATGTTTATACTCTTTTTTTACGCGATTTTGAACCATGTGCCGA  
AGCCCGTATGGGACATTATGCACGTAATATCGGACATTTACATGTTCTGGTGGAGACGGTT  
TATGAACAAAGTACGGCCGAGATCGAGGACAGTGTACCGGGAAGCTGTTTCTGGGCTTGA  
TGGGTGTGAGGACTACGAAGAATGGTACGAAAAGGCGAGTCTAGTGGACGAATTGACCG  
GGGTTCGATCTTTGGCGTCGCAATTTCTTTTCTAAACGGTACGACTTTGAGTCCGGTATTGGA  
GCAGTATGGGGCGCTGTTGGAGGCTCTTGAGAATGAGGATATCGATGCAGTGGTATCGAG  
GTTTATAAATACAGGGCCGACCATGCTTCGGAATTTTGTGGGATTGTGGATAAACGTCTT  
TTCACAAAGTCGTTTGTGGGACGAAGTTGCTCATCGAGCAGTATCTCGATAAGGTGGTG  
GAGACGTTGTACATGTTGGCTGAGAGACGGACGCAGCAGGTGCAGCGGCCGTTTTTTCAG  
CGGTGCAAGTTGTCTCTTGGAGCCACGGCGCTCGCTCTTCAAGGTGGGTTCGTTTTTCGGAC  
TATTTTCATCTTGGCGTGTTGAAAGGGTTGTTGGATAGGAATCTCCTGCCCAATATCATCAA  
CGGGACGTCTATGGGCGCGTGTTGCTAGTATGGCGTGCTGTCTCAGCGATGTCGAGTTG  
GAGGACCTTTTGACGGCAAATAGGCTCGTATCCACGATAAAAAGAGACACGGTGTTGCTA  
CTGGAATGTGGCTACGGTGCCATCGATGAGCACTTCAGCATAGGAACTTTGGTGCAAAAC  
GTGGTCCACAACGGTTACTCCAAGGACGTGTATCTGTTTATCAAGTTTGTTCAGCGGTCTA  
TCATTGGCGACCTGACTTTTCGAGGAAGCGTTTCGTCGCACGGGCAAAGTGTGAGCATAG  
TGGTACATCCAACAACAAGAACATCTGTCCCACGTTGTTGAATTACGTAACCACGCCAA  
ACGTGCTCATCTCGAGTGCGATAAACTGCAGCTTTGGCTCGAACACAATCTCGAAGGACA  
CTTGGCTCTTGGCCAAAACATCCACAACGAGGTCGTGGACTTCTTGGACAGAAACGAGC  
CCTGCTACCAAACTTAAAGTTTTTATCCCCTCAAAGCGTACAGGATTCTAGCGAACTAGA  
GGCCCCCTACACAGTTTTAACCGAGCTCTTCAACGTAAACAACCTTTATCGTATCCTTAGCC  
AGGCCGTACTTGGCCCCATTGGCACTAAACGATTTGAAACACGATATCAGAACTTCAGAG  
TACTACTACTACAAGAGATACCCTACATCGATCCAGGAACTTTCACCTCCTGGTCAACTCT  
CTCCGTCAATAAGGTGGAACCACTAGCTTCAAATTCAAGTACCATATGGAAAGAAAGA

TGAAACACATTCTAACGATGGAGCTTAACCACCGCATAGAAATAATGGACAGCATTGGTC  
TCCTATCGAACTGGATCAAACGTATTGCCATTGACGAAAGGACACCACGGAGCGCCACGG  
AGGTAGCGATTGTCCCACAAATTAAGCTCTAAGCGTATCACGCATCATCGAAGGCCGTCT  
TGACAATATCAATTACTGGATGATGTGCGGCCAACGGAGCACATGGCCTACCATATCTCT  
AATCAAGACGCGATGCGCAGTTGAATTCACGCTAGACGACATTATCAACGGATACAGGTC  
CAATGCACCACAGCAAATTACGCATATTTAG

#### LIPASA PUTATIVA YJR107W

>gi|574143501:904944-906113 *Kluyveromyces marxianus* DMKU3-1042 DNA, complete genome, chromosome 6

TCAGAAGCCAGAACAATTGTTTATCATAATGAAATACTTCCGATGCTCATCCATATGGAAT  
AAATTACTCATAACGTTTCTTAAAGCACTTCTTGTC AATTCATTAGTTGGAAGCTGATTCC  
ATGTTGCACCACTTCCAATAGCTCGATATTCTAGATCTTCTTTCTCATGTGGTAGTTCTGGC  
TTTGAAATAAAAAATTTCCAAACCAGCAGCTTTATAGCCAGGGGGGACCATTGGAATATAG  
TCTTGTAGATGTATAACCCTGAAATAACCATGAAACATATCTAGTTCACCATTCTTTACAC  
TCTTGTCATGTATCTTTTTCGTCTTAAATAAGCTATCAACCCAATCCCTCATCTCATCGTTG  
AACATTTTTGGTGTAGCATATGTCAAGATTAATGGATTAAACCCTCTGAGCTTCAACTCAA  
TCCCACATATGCTAGCCAATGCTGCCCCGAGAGAGTGTCTGTTACAACCATTTTATAACC  
AGGATATCTTTTGAATATTCTTTCAACTCTGTTAAGAAGTCTTTACTCAAGGTCTCGATAA  
AGCGATTGAAACCTTTGTGAATCATACAGTTCTCACATATTTCAATCTTCCCACTCTCCACT  
AGCTTATCATAGTGTTTTTCCGATACAGGCCTGTATTCTGTTGGGTATATTTCAAAGTCACT  
GAACCAATCCTGTCTTGTGCTGGATCCTCTAAATGCCAACATAACAACCTTCTCTCTCGTGG  
TCCACTGCCACAAATCCAGTACCCAACCTCCTTTTCAGCAACCAACACTAACTCAACCC  
TTGTTCTGTTGATGGATGGATTTTTCTTCTACATTAGAGCAAAAATCTAGCTCTTCAGGGCA  
TCCACCATCTAAGAATGTTTTATTAGCTTCCAACCTGACCAGTAGAAATGCAGTAGGTTAAA  
GCACAGATCTTACTGAAATAAAGCATTTTCTCATAAGAGTCTTGACTGATTTCAACATCAG  
AATTTCTAACTTTCCACATCAGCGGCTAATTGCTGACCTAAATGAATTACCGTATTTGA  
TTCTAACGACGCAACAAGTACTATCCAAATCGCAGATATCCATGCAAAAAGCTGAATTAA  
TACCATTATAGCTGTTAAGGAAATCAAGTGAGGTTGTTGGGATACTTGTGCTGTTTAAAA  
AGTTTCAT

SECUENCIAS DE LAS LIPASAS PUTATIVAS EXTRACELULARES DE *K. marxianus* L-2029

### LIPASA 3 (LIP3)

ATGATGTGGCTCAAACAGATGTTTATACTCTTTTTTTACGCGATTTTGAACCATGTGCCGA  
AGCCCGTATGGGACATTATGCATGTAATATCGGACATTTACATGTTCTGGTGGAGACGGTT  
TATGAACAAAGTACGGCCGAGATCGAGGACAGTGTACCGGGAAGCTGTTTCTGGGCTTGA  
TGGGTGTGAGGACTACGAAGAATGGTACGAAAAGGCGAGTCTAGTGGACGAATTGACCG  
GGGTGCGATCTTTGGCGTCGCAATTTCTTTTCTAAACGGTACGACTTTGAGTCGGTATTGGA  
GCAGTATGGGGCGCTGTTGGAGGCTCTTGAGAATGAGGATATCGATGCAGTGGTATCGAG  
GTTTATAAATACAGGGCCGACCATGCTTCGGAATTTTGCTGGGATTGTGGATAAACGTCTT  
TTCACAAAGTCGTTTGTGGGACGAAGTTGCTCATCGAGCAGTATCTCGATAAGGTGGTG  
GAGACGTTGTACATGTTGGCTGAGAGACGGACGCAGCAGGTGCAGCGGCCGTTTTTCCAG  
CGGTGCAAGTTGTCTCTTGGAGCCACGGCGCTCGCTCTTCAAGGTGGGTGCGTTTTTCGGAC  
TATTTTCATCTTGGCGTGTTGAAAGGGTTGTTGGATAGGAATCTCCTGCCAATATCATCAA  
CGGGACGTCTATGGGTGCGTGTGTTGCTAGTATGGCGTGCTGTCTCAGCGATGTCGAGTTG  
GAGGACCTTTTGACGGCAAATAGGCTCGTATCCACGATAAAAAGAGACACGGTGTTGCTA  
CTGGAATGTGGCTACGGTGCCATCGATGAGCACTTCAGCATAGGAACTTTGGTTCAGAAC  
GTGGTTCACAACGGTTACTCCAAGGACGTGTATCTGTTTATCAAGTTTGTTCAGCGGTCTA  
TCATTGGCGACCTGACTTTCGAAGAAGCGTTTCGTTCGCACGGGCAAAGTGTTGAGCATAG  
TGGTGCACCCAACAACAAGAACATCTGTCCCACGTTGTTGAATTACGTAACCACGCCAA  
ACGTGCTCATCTCGAGTGCGATAAACTGCAGCTTTGGCTCGAACACAATCTCGAAGGACA  
CTTGGCTCTTGGCCAAAACATCCATAACGAGGTCGTGGACTTCTTGGACAGAAATGAGC  
CATGCTACCAAACTTAAAGTTTTTATCCCCTCAAAGCGTACAGGATTCTAGCGAACTAGA  
GGCCCCCTACACACGTTTAACCGAGCTCTTCAACGTAAACAACCTTTATCGTATCCTTAGCC  
AGGCCGTA CTGGCCCCATTGGCACTAAACGATTTGAAACACGATATCAGAACTTCAGAG  
TACTACTACTACAAGAGATACCCTACATCGATCCAGGAACTTTCACCTCTGGTCAACTCT  
CTTCCGTCAATAAGGTGGAACCACTAGCTTCCAAATTCAAGTACCATATGGAAAGAAAGA  
TGAAACACATTCTAACGATGGAGCTTAACCACCGCATAGAAATAATGGACAGCATTGGTC  
TCCTATCGAACTGGATCAAACGTATTGCCATTGACGAAAGGACACCACGGAGCGCCACGG  
AGGTAGCGATTGTCCCACAAATTAACCTCTCTAAGCGTATCACGCATCATCGAAGGCCGTCT  
TGACAATATCAATTACTGGATGATGTGCGGCCAACGGAGCACATGGCCTACCATATCTCT  
AATCAAGACGCGATGCGCAGTTGAATTCACGCTAGACGACATTATCAACGGATACAGGTC  
CAATGCACCACAGCAAATTACGCATATTTAG

### LIPASA YJR107W

TCAGAAGCCAGAACAATTGTTTATCATAATGAAATACTTCCGATGCTCATCCATATGGAAT  
AAATTAATCATAACCGTTTCTTAAAGCACTTCTTGTCAATTCATTAGTTGGAAGCTGATTCC  
ATGTTGCACCACTTCCAATAGCTCGATATTCTAGATCTTCTTTCTCATGTGGTAGTTCTGGC  
TTTGAAATAAAAAATTTCCAAACCAGCAGCTTTATAGCCAGGGGGGACCATTGGAATATAG  
TCTTGTAGATGTATAACCCTGAAATAACCATGAATCATATCTAGTTCACCATTCTTTACAC  
TCTTGTGCATGTATCTTTTTTCGTCTTAAATAAGCTATCAACCCAATCCCTCATCTCATCGTTG  
AACATTTTTGGTGTAGCATATGTCAAGATTAATGGATTAACCCTCTGAGCTTCAACTCAA  
TCCCACATATGCTAGCCAATGCTGCCCGAGAGAGTGTCTGTTACAACCATTTTATAACC  
AGGATATCTTTTGAATATTCTTTCAACTCTGTTTAAGAAGTCTTTACTCAAGGTCTCGATAA  
AGCGATTGAAACCTTTGTGAATCATAACAGTTCTCACATATTTCAATCTTCCCACTCTCCACT  
AGCTTATCATAGTGTTTTTCCGATACAGGCCTGTATTCTGTTGGGTATATTTCAAAGTCACT  
GAACCAATCCTGTCTTGTGCTGGATCCTCTAAATGCCAACATAACAACCTTCTCTCTCGTGG  
TCCACTGCCACAAATCCAGTACCCAACCTCCTTTTTTCAGCAACCAACACTAACTCAACCC  
TTGTTCTGTTGATGGATGGATTTTTCTTCTACATTAGAGCAAAAATCTAGCTCTTCAGGGCA  
TCCACCATCTAAGAATGTTTTATTAGCTTCCAACCTGACCAGTAGAAATGCAGTAGGTAA  
GCACAGATCTTACTGAAATAAAGCATTCTTCTCATAAGAGTCTTGACTGATTTCAACCTCAG  
AATTTCCCTAACTTTCCACATCAGCGGCTAATTGCTGACCTAAATGAATTACCGTATTTGA  
TTCTAACGACGCAACAAGTACTATCCAAATCGCAGATATCCATGCAAAAAGCTGAATTAA  
TACCATTATAGCTGTAAAGGAAATCAAGTGAGGTTGTTGGGATACTTGTGCTGTTTAAAA  
AGTTTCAT

### 10.3 ARTÍCULOS DE INVESTIGACIÓN PUBLICADOS

A continuación, se muestran los artículos de investigaciones publicados o aceptados, derivados del trabajo experimental de este proyecto:

- 1) Artículo de revisión: “Hongos y levaduras: fábricas de lipasas”.
- 2) Artículo de investigación: “Avocado oil as an inducer of the extracellular lipase activity of *Kluyveromyces marxianus* L-2029”.
- 3) Artículo de investigación: “Bioinformatic characterization of the extracellular lipases from *Kluyveromyces marxianus*”. Se muestra carta de aceptación a continuación:

**De:** Andrea Lewis <[onbehalf@manuscriptcentral.com](mailto:onbehalf@manuscriptcentral.com)>

**Fecha:** 15 de noviembre de 2019, 1:36:16 GMT-6

**Para:** [jcgonzal@itmorelia.edu.mx](mailto:jcgonzal@itmorelia.edu.mx), [jcgh1974@gmail.com](mailto:jcgh1974@gmail.com)

**Cc:** [Gianni.Liti@unice.fr](mailto:Gianni.Liti@unice.fr), [uros.petrovic@bf.uni-lj.si](mailto:uros.petrovic@bf.uni-lj.si)

**Asunto:** Yeast - Decision - YEA-Jul-19-0068.R1

**Responder a:** [yeast@wiley.co.uk](mailto:yeast@wiley.co.uk)

15-Nov-2019

Dear Prof. González-Hernández

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "CHARACTERIZATION OF THE EXTRACELLULAR LIPASES FROM *Kluyveromyces marxianus*" in its current form for publication in Yeast.

If you have included in your manuscript any previously published material, please send a Permission Request Form. Your article cannot be published until you have signed the appropriate license agreement. Within the next few days you will receive an email from Wiley's Author Services system which will ask you to log in and will present you with the appropriate license for completion.

By submitting your files for publication, you confirm that you have adhered to the relevant recommended standards.

Thank you for your fine contribution.

Sincerely,

Dr. Uros Petrovic

Yeast

[yeast@wiley.co.uk](mailto:yeast@wiley.co.uk)

---

# HONGOS Y LEVADURAS: FÁBRICAS DE LIPASAS

RICARDO MARTÍNEZ-CORONA, CARLOS CORTES-PENAGOS,  
LUIS ALBERTO MADRIGAL-PÉREZ Y JUAN CARLOS  
GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ

---

## RESUMEN

Las lipasas son enzimas capaces de catalizar reacciones de hidrólisis de triglicéridos; son usadas en numerosos procesos dentro de la industria alimenticia, energética, farmacéutica, etc. Ante la necesidad de cumplir con la demanda comercial e industrial actual de este tipo de enzimas en diversos procesos, se han desarrollado diferentes estrategias de estudio de las mismas y sus aplicaciones. Debido a que la mayoría de las especies bacterianas usadas para la producción de lipasas son patógenas, se han realizado esfuerzos para encontrar

sistemas alternativos que sean seguros para los diversos procesos en los que se ven envueltas este tipo de enzimas. Así, las lipasas provenientes de hongos y levaduras han adquirido un alto foco de atención. En este trabajo se pretende mencionar las características generales y de producción de lipasas de diversos microorganismos fúngicos que han sido estudiados últimamente, a fin de determinar dichas alternativas para los procesos biotecnológicos industriales que demandan este tipo de enzimas.

---

## Introducción

Las lipasas son hidrolasas de serina definidas como triacilglicerol acilhidrolasas (E.C. 3.1.1.3), capaces de hidrolizar ésteres carboxílicos de acilglicerol de cadena larga, con cadenas mayores a 10 átomos de carbono, lo que las distingue de las estereasas (Casas-Godoy *et al.*, 2012). La variedad de reacciones que catalizan las ha hecho candidatas ideales para diversas aplicaciones industriales. Después de las proteasas y las amilasas, las lipasas son

consideradas como el tercer grupo en volumen de ventas, con un valor de billones de dólares anuales (Kempka *et al.*, 2008). A pesar de que las lipasas son producidas por la mayoría de los organismos vivos, cobra relevancia el uso de microorganismos para su síntesis por las ventajas que presentan sus enzimas: catalizan una gran variedad de reacciones, tienen altos rendimientos, relativa facilidad de manipulación genética, son estructuralmente estables en solventes orgánicos, son independientes de cofactores, catalizan reacciones utilizando una amplia variedad de sustratos y tienen una alta enantioselectividad

(Tan *et al.*, 2015). En esta revisión se mencionarán los avances que se han tenido en los últimos años, así como las tendencias en el estudio de las lipasas fúngicas, las que se posicionan por encima del uso de lipasas bacterianas por ser reconocidas como seguras. En primera instancia se describirán las características generales de las lipasas y se mencionará la importancia de las mismas en diversas áreas industriales. Posteriormente, se mencionarán las lipasas conocidas y estudiadas de origen fúngico, a fin de conocer sus propiedades y características generales. Finalmente, se discutirán las últimas

---

## PALABRAS CLAVE / Hongos / Levaduras / Lipasas /

Recibido: 01/03/2019. Modificado: 12/07/2019. Aceptado:15/07/2019.

**Ricardo Martínez-Corona.** Estudiante de doctorado en Ciencias Biológicas en Biotecnología de Alimentos, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (Umich), México. Profesor, Instituto Tecnológico de Morelia, México.

**Carlos Cortés-Penagos.** Doctor en Ciencias en Biología Celular, CINVESTAV-IPN, México. Profesor Investigador, Umich, México.

**Luis Alberto Madrigal-Pérez.** Doctor en Ciencias de los Alimentos, Universidad Autónoma de Querétaro, México. Profesor Investigador, Instituto Tecnológico Superior Ciudad Hidalgo, México.

**Juan Carlos González-Hernández** (Autor de correspondencia). Doctor en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. Profesor Investigador, Tecnológico Nacional de México, Instituto Tecnológico de Morelia, México. Dirección: Ingeniería Bioquímica, Tecnológico Nacional de México / I.T. Morelia. Av. Tecnológico 1500, Col. Lomas de Santiaguito, Morelia, Michoacán. C.P. 58120. México. e-mail: jcgonzal@itmorelia.edu.mx

---

tendencias del estudio y aprovechamiento de las lipasas de origen fúngico.

## Lipasas: Panorama General

La característica diferencial de las lipasas con respecto a otras enzimas que también pueden hidrolizar ésteres, como las esterases, es la necesidad de una interfase orgánico-acuosa para dicha función catalítica (Hasan *et al.*, 2009). Las lipasas catalizan una amplia variedad de reacciones, como la hidrólisis parcial o total de triacilglicéridos y reacciones de síntesis que se clasifican en dos grandes grupos: reacciones de esterificación y reacciones de transesterificación. Las lipasas tienen diferentes tipos de selectividad: a) quimioselectividad, b) regioselectividad y c) enantioselectividad (Colla *et al.*, 2010).

Las lipasas tienen un plegamiento  $\alpha/\beta$  característico de las enzimas hidrolíticas (Jaeger *et al.*, 1999). La triada catalítica se encuentra altamente conservada, conformada por tres aminoácidos: serina, aspartato o glutamato e histidina (Brady *et al.*, 1990). La serina forma parte del motivo consenso GX<sub>1</sub>SX<sub>2</sub>G. Otra característica importante en la estructura de la lipasa es la presencia de una brecha oxianiónica, encargada de estabilizar el intermediario de la reacción mediante puentes de hidrógeno (Pleiss *et al.*, 2000). Actualmente la base de datos LED (*Lipase Engineering Database*; <http://www.led.uni-stuttgart.de>; Fischer y Pleiss, 2003) clasifica a las lipasas en base a la conformación de su oxianión en tres grandes grupos: GGGX, GX y Y; además, se agrupan en 15 superfamilias y 32 familias homólogas.

### Importancia de las lipasas

Las lipasas realizan diferentes funciones fisiológicas. En eucariotas, son componentes clave del metabolismo de lípidos y lipoproteínas, por lo que son producidas en el sistema digestivo (Reis *et al.*, 2009). Los campos de aplicación de las lipasas han sido en la industria oleoquímica, manufactura de detergentes y en la industria alimenticia, principalmente. Son usadas como aditivos alimentarios en la modificación del sabor, síntesis de ésteres con actividad antioxidante, hidrólisis de grasas para la fabricación de detergentes, tratamiento de aguas residuales para la degradación y remoción de sustratos grasos, eliminación de lípidos y aceites en la industria cosmética y farmacéutica (Burkert *et al.*, 2004). Su propiedad de enantioselectividad ha permitido aumentar su demanda para métodos eficientes para la síntesis industrial de

enantiómeros puros de antiinflamatorios como el ibuprofeno (Sharma *et al.*, 2001). Siendo usados como biosensores, permiten la liberación de glicerol que puede ser medido para diagnosticar algunos padecimientos de pacientes con problemas cardiovasculares y para determinar los niveles de triglicéridos a partir de la hidrólisis de los mismos (Verma *et al.*, 2012). Las lipasas han sido utilizadas como primer paso en la descomposición de lípidos de desperdicios de comida, para la producción de biometano (Meng *et al.*, 2015). Además, se ha propuesto su uso como biocatalizadores en la producción de biodiesel, cuya síntesis catalítica actual por transesterificación genera altos niveles de agua alcalinizada (Aguieiras *et al.*, 2015).

### Lipasas de origen fúngico

Los microorganismos con una alta capacidad para producir lipasas pueden ser encontrados en diferentes hábitats, principalmente en desechos o residuos de aceites vegetales empleados en la elaboración de frituras, industrias de productos lácteos, suelos contaminados con aceites y alimentos deteriorados. La producción de lipasas depende de factores ambientales, como temperatura o pH, así como de la composición del medio de fermentación: fuente de carbono mixta (compuesta por un carbohidrato y un lípido), nitrógeno y concentración de sales inorgánicas, pudiendo estos factores alterar la reactividad de la enzima. Además, la síntesis de lipasas se ve favorecida en condiciones aerobias (Alarcón, 2008).

### Lipasas de levaduras

*Lipasas de Candida rugosa*: *C. rugosa* es una levadura no esporogénica, unicelular y no patógena, reconocida como GRAS. Se han detectado más de siete genes que codifican para lipasas en *C. rugosa*, denominadas LIP1 a LIP7 (Ferrer *et al.*, 2009). Cada gen de las lipasas de esta levadura codifica para una cadena de aminoácidos de 534 residuos, con masas moleculares de ~60kDa. LIP2 tiene una identidad de secuencia con LIP1 del 79,4%, y de 82,2% con LIP3. Las estructuras de las lipasas LIP1 y LIP3 son muy similares entre sí, con el sitio activo en las posiciones Ser209, His449 y Glu341 (Ferrer *et al.*, 2001). En el caso específico de la enzima LIP2 purificada, el sitio activo está conformado por la triada Ser209, Glu341 e His449 (Mancheño *et al.*, 2003). Las proteínas tienen hasta tres puntos de glicosilación, temperatura óptima entre 30 y 40°C y pH óptimo cercano a la neutralidad (Brocca *et al.*, 1998; Akoh *et al.*, 2004).

*Lipasas de Candida antarctica*. *C. antarctica* sintetiza dos lipasas, denominadas CALA y CALB, de masas moleculares 45 y 33kDa, respectivamente. CALA tiene una triada catalítica compuesta por Ser184, Asp334 e His366 (Ericsson *et al.*, 2008); esta lipasa es capaz de catalizar la hidrólisis en la posición sn2 (Solymer *et al.*, 2002; Ericsson *et al.*, 2008). CALB, por su parte, tiene una triada catalítica de Ser105, Asp187 e His224, en conformación abierta con entrada restringida al sitio activo (Uppenberg *et al.*, 1994).

*Lipasas de Yarrowia lipolytica*. *Y. lipolytica* es una levadura no-convencional ascomiceta que posee 16 genes parálogos codificantes para lipasas, pero solo tres isoenzimas han sido caracterizadas: Lip2p, Lip7p y Lip8p. La expresión de los genes que codifican para lipasas en *Y. lipolytica* depende del ácido graso usado como fuente de carbono (Fickers *et al.*, 2011). La lipasa Lip2p es una proteína madura de 301 aminoácidos, ligada a la pared celular que contiene dos puntos diferentes glucosilados de manosa (Jolivet *et al.*, 2007); su sitio catalítico se caracteriza por una serina en la posición Ser162 de la secuencia GHSLG, y completan la triada catalítica los residuos Asp230 e His289. El pH óptimo de Lip2p se encuentra entre 6 y 7,5, mientras su temperatura óptima está entre 37 y 40°C. Las lipasas Lip7p y Lip8p se encuentran principalmente asociadas a pared celular y tienen un motivo del tipo GHSLG, con la serina catalítica en la posición Ser220 (Fickers *et al.*, 2011).

### Lipasas de hongos filamentosos

La primera estructura obtenida de una lipasa fúngica fue la de *Rhizomucor miehei* (antes *Mucor miehei*), expresada en *Aspergillus oryzae*, un polipéptido sencillo de 269 residuos de aminoácidos, con un sitio catalítico conformado por Ser144, His257 y Asp203, y la presencia de tres puentes disulfuro (Brady *et al.*, 1990). A continuación se mencionan algunas características importantes de las lipasas y los organismos implicados en su síntesis de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*.

*Lipasas de Aspergillus y Penicillium*. Los hongos filamentosos pertenecientes al género *Aspergillus* han sido reportados como los mejores productores de lipasas. Yadav *et al.* (1998) hicieron un screening de 40 cepas fúngicas para la producción extracelular de lipasas usando como sustrato aceite de oliva. Las 11 mejores productoras del género *Aspergillus* fueron *A. alliaceus*, *A. candidus*, *A. cameus*, *A. fischeri*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *A.*



*parasiticus*, *A. sundarbanii*, *A. terreus* y *A. versicolor*; por otro lado, las 9 mejores de *Penicillium* fueron *P. aurantiogriseum*, *P. brevicompactum*, *P. camembert*, *P. chrysogenum*, *P. corymbiferum*, *P. crustosum*, *P. egyptiacum*, *P. expansum* y *P. spiculisporum*. Coca *et al.* (2001) reportaron como buenos productores de lipasas a *Aspergillus niger*, con una actividad de 0,26 U/ml (pH 6 y 40°C) y *A. fumigatus*, con actividad lipásica de 0,21 U/ml (pH 7 y 80°C). Se ha reportado, además, que la lipasa de *A. carneus* tiene una alta tolerancia y estabilidad de pH y temperatura, regioespecificidad 1, 3, estabilidad en medios acuosos y no acuosos, y habilidad de esterificación y transesterificación, con una actividad lipásica de 12,7 U/ml (Kaushik *et al.*, 2006). Una alta actividad lipásica (40 U/g) se ha reportado por el hongo *P. verrucosum*, cuya enzima tiene temperatura óptima fue de 27,5°C y pH 7, cuando se usó salvado seco como inductor (Kempka *et al.*, 2008).

### Discusión: Tendencias Actuales

El continuo desarrollo de nuevos productos y las nacientes necesidades han provocado un amplio estudio de las lipasas provenientes de diferentes organismos. Se pueden mencionar varios ejes en los que se ha enfocado el estudio de las lipasas últimamente: 1) el aprovechamiento de diversos residuos agroindustriales para la inducción de la síntesis de lipasas por hongos y levaduras; 2) la búsqueda de nuevos organismos que sintetizen este tipo de enzimas; 3) la modificación y optimización de los genes implicados en la síntesis de lipasas, así como su expresión heteróloga en organismos competentes, que pueda traer una mayor producción que el organismo natural y que, además, la enzima presente características específicas y mejoradas; y 4) implicación de las lipasas ya conocidas en la obtención de compuestos específicos a través de reacciones de transesterificación e interesterificación.

#### Sustratos inductores para la síntesis de lipasas

Las lipasas son sintetizadas en presencia de inductores lipídicos; estas moléculas están presentes en los residuos agroindustriales, cuyos efectos contaminantes se prevé reducir (Treichel *et al.*, 2010). El agente inductor usado en la síntesis de lipasas ha sido por excelencia el aceite de oliva. La máxima actividad lipásica detectada usando este agente inductor se ha alcanzado usando *A. niger* y *A. fumigatus* (Coca *et al.*, 1999). El hongo *Y. lipolytica* ha sido usado para la producción de lipasas inducidas por

desechos agroindustriales, tales como salvado de cebada, nuez triturada y aceite de girasol, (Domínguez *et al.*, 2003) y, recientemente, semilla y cáscara de mango (Pereira *et al.*, 2019). Kempka *et al.* (2008) reportaron como mejor sustrato a la harina de soya entre diversos sustratos, incluyendo melaza de caña de azúcar, levadura hidrolizada, licor de maíz fermentado, extracto de levadura, aceite de soya, aceite de ricino, aceite de maíz, aceite de oliva y peptona. Otros sustratos reportados para la producción de lipasas son bagazo de caña de azúcar, salvado de trigo y salvado de arroz, además de aceites residuales de mostaza, maní y coco, aguas residuales, licor de maíz, banana, melón, sandía, cáscara de lenteja, aceite de sésamo, peptona, tributirina, ácido cítrico, glucosa, etc. (Treichel *et al.*, 2010; Bhosale *et al.*, 2012). Ilmi *et al.* (2017) propusieron el uso del aceite obtenido por presión mecánica de la planta tropical *Jatropha curcas* L, logrando la inducción de lipasas en *A. niger* 6516 y *R. miehei* CBS 260,62. Oliveira *et al.* (2017), por su parte, utilizaron varios residuos agroindustriales: torta de aceite de andiroba, de cupuasu, aceite de canola, de macauba y de semilla de palma, harina de soja, torta de aceite de café verde y de sésamo. El aceite de palma también se ha utilizado para optimizar la producción de la lipasa halófila de *F. solani* NFFCCL 4084, alcanzando un incremento de 3,2 veces su actividad, siendo de 7,8 U/ml (Geoffry y Achur, 2018). Xiaoyan *et al.* (2017) propusieron el uso de aceite de cocina residual para evaluar la coproducción de eritrol y lipasas utilizando a *Y. lipolytica* M53, obteniendo la mayor actividad lipásica de 12,7 U/ml.

Además de la búsqueda del aprovechamiento de residuos agroindustriales para la producción sustentable de lipasas, otros estudios se han centrado en reconocer otros hongos y levaduras productores de lipasas. Para ser usada en la producción de biodiesel, se aisló una levadura de lodos provenientes de petróleo, *Cryptococcus diffluens* D44, cuya lipasa es alcalina y termoestable, con pH y temperatura óptimos de 9 y 45°C, respectivamente (Yilmaz y Sayar, 2015). Alhelli *et al.*, (2016) obtuvieron una lipasa alcalina extracelular de *Penicillium candidum* (PCA 1/TT031) en medio sólido. Una cepa de *Aspergillus westerdijkiae*, aislada de aceite de cocina residual, ha sido usada para la producción de lipasas: la enzima obtenida tiene una actividad de 52 U/g de micelio, con una temperatura óptima de 40°C y pH óptimo entre 7 y 8 (Castro *et al.*, 2017). La lipasa del hongo termófilo *Malbranchea cinnamomea* ha sido expresada en *P. pastoris* con el fin

de determinar sus propiedades; la actividad lipásica obtenida fue de 4304 U/ml, a pH de 7,5 y temperatura de 40°C (Duan *et al.*, 2019). La síntesis de lipasas a partir de *Penicillium* spp. sección *Gracilenta* CBMAI 1583 fue inducida con aceite de olvida, y estas mostraron una actividad de 1,62 U/ml, a un pH de 4 y 70°C, siendo estable en presencia de cationes metálicos y de solventes orgánicos como el hexano, trimetilpentano, acetona, entre otros (Turati *et al.*, 2019).

Ha adquirido relevancia el uso de microorganismos que son capaces de sintetizar enzimas con propiedades únicas, ya que les puede conferir su uso en procesos más diversos. En este sentido, Vyas y Chhabra (2016) aislaron una levadura oleoginosa identificada como *Cystobasidium oligophagum* (JRC1) de desperdicio celulósico; además de su actividad lipásica (2,88 U/mg), la levadura demostró tener actividad endoglucanasa, exoglucanasa y  $\beta$ -glucosidasa. En otro estudio, Sahay y Chouhan (2018) reportaron dos lipasas con actividades a baja temperatura y con actividad metaloenzimática, provenientes de los hongos *Penicillium canesense* y *Pseudogymnoascus roseus*.

#### Expresión heteróloga de lipasas.

La expresión heteróloga ha sido una herramienta muy utilizada que ha permitido vencer algunos de los obstáculos que representa la síntesis natural de las lipasas, como lo son la no reproducibilidad, los bajos rendimientos de producción y la dificultad de purificación de las mismas (Borrelli y Trono, 2015). *Pichia pastoris* ha sido el sistema más usado para la expresión heteróloga de diversas proteínas comercialmente relevantes de organismos eucariotes. La principal característica de esta levadura es que puede utilizar el metanol como única fuente de carbono y energía, basado en la regulación de la enzima alcohol oxidasa (AOX), bajo acción del promotor  $P_{AOX1}$  (Alarcón, 2008). Las lipasas LIP1 (Brocca *et al.*, 1998), LIP2 (Ferrer *et al.*, 2009) y LIP3 (Chang *et al.*, 2006) de *C. rugosa*, y las lipasas de *C. antarctica* (Kwon *et al.*, 2011), han sido expresadas bajo regulación de este promotor. Por otro lado, la lipasa de *F. solani* ha sido expresada en *P. pastoris*, manifestando una alta actividad de 100 U/mL (Jalouli *et al.*, 2016). A su vez, una lipasa termoalcalina proveniente de *Talaromyces thermophilus* fue expresada en el mismo sistema heterólogo, detectándose una enzima de 39kDa, con un pico de máxima actividad de pH 9,5 y temperatura de 60°C (Zhang *et al.*, 2015). En ocasiones se ha hecho uso de organismos reconocidos como productores

de lipasas para expresar enzimas de este tipo. Tal es el caso de la lipasa de *Rhizopus oryzae* (ROL), que fue expresada en *Y. lipolytica* bajo acción del promotor inducible P<sub>XP<sub>R</sub>2</sub>; la enzima recombinante tuvo una actividad de 7,6 U/ml y pH óptimo de 7,5 pero la característica sobresaliente fue su alta termoestabilidad a 55°C (Yuzbashev *et al.*, 2012). Recientemente, la lipasa Lip8p de *Y. lipolytica* fue clonada y expresada en células de insecto Sf9, mediante un sistema de expresión de baculovirus; la enzima mostró una actividad específica de 1102,9 U/mg en ácido oleico, a pH 7,5 y 17°C (Li *et al.*, 2019b). El mismo sistema ha sido utilizado para la expresión de la lipasa regioselectiva sn-1(3) de *Cordyceps militaris* (Park *et al.*, 2018).

Otras estrategias sobresalientes se han seguido para aprovechar al máximo las características y propiedades de las lipasas. Ejemplo de ello ha sido el expresar heterológicamente la lipasa ligada a la superficie celular del sistema de expresión, importante en el desarrollo de biosensores, vacunas y anticuerpos; por ejemplo, Yamada *et al.* (2016) expresaron la lipasa BTL2 de *Geobacillus thermocatenulatus* en la superficie de la levadura *P. pastoris*. Algunos otros estudios se han enfocado en la modificación molecular de la estructura de las lipasas para mejorar sus propiedades. En el estudio realizado por Skjold-Jørgensen *et al.* (2016) se obtuvo una lipasa mutante de *Thermomyces lanuginosus* con la capacidad de controlar la cubierta sobre el sitio activo. Zheng *et al.* (2016) modificaron la lipasa proveniente de la misma especie de hongo por mutación de sitio, obteniendo dos mutantes con alta capacidad de la resolución del ácido 2-carboxietil-3-ciano-5-metilhexanoico etil éster. Zhou *et al.* (2017) introdujeron la presencia de un tag de poliamina a la lipasa B de *C. antarctica* (CALB), con el fin de facilitar su expresión en *E. coli* y dirigirlo en un solo paso para su inmovilización. La lipasa ácida de *A. niger* fue expresada heterológicamente en *P. pastoris* con la fusión de tres modificadores, ayudando a alcanzar una actividad de 40 U/ml a un pH óptimo de 2.5 (Zhang *et al.*, 2019). Por otro lado, se han creado mutantes de la lipasa Lip2 de *Y. lipolytica* con una mayor cantidad de puentes disulfuro (específicamente 4, 5 y 6), lo que ha permitido mejorar la termoestabilidad de la enzima (Li *et al.* 2019a).

*Uso de lipasas fúngicas para la producción de compuestos de interés comercial*

Una de las características más relevante de las lipasas es la de su

capacidad para catalizar reacciones de interesterificación y transesterificación, principalmente en presencia de solventes orgánicos y baja actividad de agua. Esta propiedad ha sido explotada a nivel industrial para la producción de diversos compuestos en diferentes áreas. En estudios recientes se ha propuesto el uso de las lipasas para la síntesis de otros compuestos que pueden resultar ser interesantes a nivel industrial. Un recuento de los avances de ejemplos representativos en el último par de años, se muestra en la Tabla I. Son varias las conclusiones que se pueden obtener a partir de dicha información: 1) Las lipasas que se utilizan con fines de síntesis de productos o compuestos de interés en la actualidad, corresponden a aquellas que son más conocidas, provenientes de microorganismos de los géneros *Aspergillus*, *Candida*, *Penicillium*, *Rhizomucor*, *Rizophus*, *Thermomyces* y *Yarrowia*. Sería interesante ver en próximos años el uso de lipasas aisladas recientemente o provenientes de otros hongos y levaduras que puedan tener la capacidad de catalizar la obtención de otro tipo de compuestos, siendo pocos autores los que lo proponen de esta manera. 2) Muchos de los compuestos reportados últimamente, obtenidos a partir de reacciones que implican el uso de las lipasas fúngicas, corresponden a ésteres de cadena corta que son usados normalmente en la industria alimenticia, ya que proporcionan ciertos aromas y/o sabores. Asimismo, se ha hecho una búsqueda de lipasas que son específicas y capaces de actuar sobre ácidos grasos poliinsaturados del tipo DHA y EPA, vitales para la obtención de productos más nutritivos, debido a los grandes beneficios que estos conllevan en la dieta diaria. En otros casos, se ha hecho uso de la facultad de algunas lipasas para la resolución de mezclas racémicas, de vital importancia en la industria farmacéutica. Además, el uso de las lipasas para la obtención de biodiesel ha continuado a través de la optimización de los procesos y reacciones implicadas, a fin de mejorar rendimientos. 3) La mayoría de los estudios realizados últimamente respecto a las lipasas utilizan algún sistema de inmovilización de las mismas. Los sistemas utilizados y los métodos de inmovilización reportados son muy variados, pero en la mayoría de los casos se logra mejorar los rendimientos de conversión y la eficiencia de las enzimas. Mayor información de los avances de la inmovilización de lipasas se puede revisar en Pereira *et al.* (2017).

## Conclusiones

Las interesantes características y variadas propiedades que

presentan las lipasas de origen fúngico les han conferido una amplia importancia industrial y comercial, siendo uno de los grupos de enzimas más utilizados actualmente. Las lipasas no solo son herramientas biotecnológicas prometedoras, sino también son ya una realidad. Este hecho se manifiesta en la gran cantidad de estudios reportados en los diferentes ámbitos mencionados en este escrito. Nuevas alternativas de uso de las lipasas irán surgiendo poco a poco y probablemente desplazarán a las usadas comercialmente en la actualidad.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen los donativos parciales de la Convocatoria de Apoyo a Proyectos de Investigación Científica, Aplicada, Desarrollo Tecnológico e Innovación 2016, 2017, 2018 del Tecnológico Nacional de México, proyectos Nos. 5781.16-P, 6131.17-P y 6525.18-P; los donativos parciales al Laboratorio Nacional SEDEAM del Instituto Tecnológico de Morelia por el apoyo académico de los investigadores y estudiantes en tesis aplicadas a la empresa; así como la participación del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través del soporte financiero otorgado por la Beca 253782.

## REFERENCIAS

- Abed SM, Zou X, Ali AH, Jin Q (2017) Synthesis of 1,3-dioleoyl-2-arachidonoyl-glycerol-rich structured lipids by lipase-catalyzed acidolysis of microbial oil from *Mortierella alpina*. *Bioresour. Technol.* 243: 448-453.
- Aguieiras ECG, Cavalcanti-Oliveira ED, Freire DMG (2015) Current status and new developments of biodiesel production using fungal lipases. *Fuel* 159: 52-67.
- Aguieiras ECG, Papadaki A, Mallouchos A, Mandala I, Sousa H, Freire DMG, Koutinas AA (2019) Enzymatic synthesis of bio-based wax esters from palm and soybean fatty acids using crude lipases produced on agricultural residues. *Indust. Crops Prod.* 119: 11419.
- Akoh CC, Lee GC, Shaw JF (2004) Protein engineering and applications of *Candida rugosa* lipase isoforms. *Lipids* 39: 513-526.
- Alarcón VMR (2008) *Producción de la Lipasa LIP2 de Candida rugosa en el Sistema Pichia pastoris: Caracterización y Aplicación en Reacciones de Síntesis*. Tesis. Universidad Autónoma de Barcelona, España. 201 pp.
- Alhelli AM, Yazid M, Manap A, Mohammed AS, Mirhosseini SH, Suliman E, Shad Z, Mohammed NK, Hussin ASM (2016) Use of response surface methodology for partitioning, one-step purification of alkaline extracellular lipase from *Penicillium candidum* (PCA 1/ TT031). *J. Chromatogr. B* 1039: 66-73.
- Arcens D, Grau E, Grelier S, Cramail H, Peruch F (2018) 6-O-glucose palmitate synthesis

USO DE LIPASAS FÚNGICAS PARA LA OBTENCIÓN DE COMPUESTOS DE INTERÉS EN LOS ÚLTIMOS AÑOS

Origen de la lipasa	Aplicación propuesta	Rendimiento	Referencia
<i>Aspergillus ibericus</i>	Síntesis de butil decanoato a partir de ácido decanoico y butanol.	100% <sup>2</sup>	Oliveira <i>et al.</i> (2017)
<i>A. nomius</i> ST57	Inmovilización de la célula completa para la síntesis de ésteres metílicos de ácidos grasos a partir de aceite de palma en dos pasos.	94,77% <sup>2</sup>	Rakchai <i>et al.</i> (2016)
<i>A. westerdijkiae</i>	Síntesis de etil oleato a partir ácido oleico y etanol.	35% <sup>1</sup>	Castro <i>et al.</i> (2017)
<i>Candida antarctica</i> (CALA)	Concentración de grasos poliinsaturados n-3 por etanolisis en aceites de baja calidad.	92% <sup>2</sup>	He <i>et al.</i> (2017)
<i>C. antarctica</i> (CALB)	Inmovilización covalente de la enzima en nanopartículas magnéticas de óxido férrico para la síntesis de biodiesel.	100% <sup>2</sup>	Reza <i>et al.</i> (2017)
	Transesterificación entre bixina y sorbitol para la síntesis de ésteres de sorbitol de norbixina.	50% <sup>1</sup>	Jahangiri <i>et al.</i> (2018)
	Síntesis de pentaeritritol monoricinoleato a partir de ácido ricinoleico y pentaeritritol, con enzima inmovilizada en adsorbente hidrofóbico.	93% <sup>2</sup>	Yadav <i>et al.</i> (2019)
	Síntesis de 6-O-glucosa palmitato en acetonitrilo.	100% <sup>2</sup>	Arcens <i>et al.</i> (2018)
	Obtención de dietilhexil adipato, a partir de ácido adípico y etilhexano.	100% <sup>2</sup>	Kim <i>et al.</i> (2019)
	Síntesis de ésteres de ácidos grasos de lactosa usando solventes orgánicos (hexano y acetonitrilo los más efectivos).	77 y 93% <sup>2</sup>	Enayati <i>et al.</i> (2018)
<i>C. antarctica</i> (CALB) y <i>R. miehei</i> (RML)	Resolución de mezcla racémica para la síntesis de la forma activa del 1-metil-3-fenilpropilamina, (precursor del antihipertensivo labetalol).	-	Sanfilippo <i>et al.</i> (2018)
	Uso de nanopartículas de ambas lipasas compuestas por fitantrioil y polisorbato 80, como sistema bioresponsivo para tratar infecciones fúngicas.	-	Poletto <i>et al.</i> (2016)
	Transesterificación de aceite de palma con metanol para la producción de metil ésteres de ácidos grasos, usando las lipasas simultáneamente inmovilizadas en gel de sílica epoxi.	78,3% <sup>2</sup>	Shahedi <i>et al.</i> (2019)
<i>C. parapsilosis</i> (CPLIP2)	Síntesis de metil ésteres de ácidos grasos por a partir de aceite de jatrofa usando enzima inmovilizada en las resinas Accurel MP1000 y Lewatit VP OC 1600.	80,5% <sup>2</sup> y 93,8% <sup>2</sup>	Rodrigues <i>et al.</i> (2016)
<i>C. rugosa</i> (CRL)	Síntesis de oleil oleato por esterificación de ácido oleico con alcohol oleílico usando la enzima inmovilizada en una resina libre de solventes.	92,6% <sup>1</sup>	Bi <i>et al.</i> (2016)
	Síntesis de hexil octoato a partir de isoctano en solvente orgánico a partir de lipasa activada por alta presión hidrostática.	53% <sup>1</sup>	Chen <i>et al.</i> (2017)
<i>Rhizomucor miehei</i> (RML)	Síntesis de ergosterol linolenato usando la lipasa 99-125, mejorando las propiedades fisicoquímicas del ergosterol.	92% <sup>2</sup>	He <i>et al.</i> (2019)
	Síntesis de 1,3-dioleil-2-araquidonilglicerol lípidos a partir de aceites microbianos de <i>Mortierella alpina</i> y ácido oleico.	84% <sup>2</sup>	Abed <i>et al.</i> (2017)
<i>R. oryzae</i>	Síntesis de ésteres de cera utilizando ácidos grasos destilados del aceite de palma y de soja.	80% <sup>1</sup>	Aguieiras <i>et al.</i> (2019)
	Síntesis de etil butirato por una lipasa recombinante inmovilizada en Octadecil-Sepabeads.	0,118mmol/h	Guillén <i>et al.</i> (2017)
<i>R. variabilis</i>	Síntesis de quercetina ferulato a partir de quercetina y ácido ferúlico.	93,2% <sup>2</sup>	Kumar <i>et al.</i> (2016)
	Síntesis de ester butil caprilato y 1-butil oleato, usados como aditivos del diésel.	58,2 y 59,3% <sup>2</sup>	Bancerz <i>et al.</i> (2018)
<i>Schizochytrium</i> S31	Determinar una lipasa con alta selectividad para hidrolizar DHA y EPA, a fin de concentrar los mismos en aceites nutritivos.	39 U/g	Byreddy <i>et al.</i> (2016)
<i>Thermomyces lanuginosus</i> (TLL)	Síntesis de butil butirato a partir de butanol y ácido butírico con enzima inmovilizada en Immo bead 150.	84% <sup>2</sup>	Matte <i>et al.</i> (2016)
	Obtención de una doble mutante tolerante a metanol para la síntesis de biodiesel.	81% <sup>1</sup>	Tian <i>et al.</i> (2017)
	Síntesis de etil ésteres de ácidos grasos ricos en omega-3 de aceite de chía con lipasa inmovilizada en Sepabeads C-18 modificada con polietilenglicol.	100% <sup>2</sup>	Castejón <i>et al.</i> (2019)
<i>Penicillium notatum</i>	Inmovilización de la lipasa en polímeros de silicón y recubiertos por fibras.	1,19 U/g	Rehman <i>et al.</i> (2017)
<i>Yarrowia lipolytica</i> (Lip2p)	Producción de ésteres de fitoesterol a partir de la lipasa inmovilizada en diferentes soportes inorgánicos (zelita).	253,3 U/g de soporte	Caixia <i>et al.</i> (2016)

<sup>1</sup>Porcentaje de eficiencia, <sup>2</sup> porcentaje de conversión.

with lipase: Investigation of some key parameters. *Mol. Catal.* 460: 63-68.  
Bancerz R, Osińska-Jaroszuk M, Jaszek M, Sulej J, Wiater A, Matuszewska A, Rogalski J (2018) Fungal polysaccharides as a water-adsorbing material in esters production with

the use of lipase from *Rhizomucor variabilis*. *Int. J. Biol. Macromol.* 118: 957-964.  
Bhosale HJ, Kadam TA, Sukalkar SR, Adekar SD (2012) Lipase Production from *Bacillus* sp Using Soybean Oil Cake as Substrate. *Int. J. Pharm. Biol. Res.* 3: 213-218.

Bi Y, Yu M, Zhou H, Zhou H, Wei P (2016) Biosynthesis of oleyl oleate in solvent-free system by *Candida rugosa* lipase (CRL) immobilized in macroporous resin with cross-linking of aldehyde-dextran. *J. Mol. Catal. B, Enzym* 133: 1-5.

- Borrelli GM, Trono D (2015) Recombinant lipases and phospholipases and their use as biocatalysts for industrial applications. *Int. J. Mol. Sci.* 16: 20774-20840.
- Brady L, Brzozowski AM, Derewenda ZS, Dodson E, Dodson G, Tolley S, Turkenburg JP, Christiansen L, Høge-Jensen B, Nørskov L, Thim L, Menge U (1990) A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. *Nature* 343: 767-770.
- Brocca S, Schmidt-Dannert C, Lotti M, Alberghina L, Schmid RD (1998) Design, total synthesis, and functional overexpression of the *Candida rugosa* lip1 gene coding for a major industrial lipase. *Protein Sci.* 7: 1415-1422.
- Burkert JFM, Mauger F, Rodrigues M (2004) Optimization of extracellular space lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design. *Bioresour. Technol.* 91: 77-84.
- Byreddy AR, Rao NM, Barrow CJ, Puri M (2016) Tween 80 influences the production of intracellular lipase by *Schizochytrium* S31 in a stirred tank reactor. *Proc. Biochem.* 53: 30-35.
- Caixa A, Nan C, Chen G, Biqiang X, Tan T (2016) Immobilization of *Yarrowia lipolytica* lipase Ylip 2 for the biocatalytic synthesis of phytosterol ester in a water activity controlled reactor. *Coll. Surf. B Biointerf.* 146: 490-497.
- Casas-Godoy L, Duquesne S, Bordes F, Sandoval G, Marty A (2012) Lipases: An overview. En Sandoval G (Ed.) *Lipases and Phospholipases: Methods and Protocols. Springer Protocols* 861: 3-30.
- Castejón N, Moreno-Pérez S, Abreu Silveira E, Fernández Lorente G, Guisán JM, Señoráns FJ (2019) Synthesis of omega-3 ethyl esters from chia oil catalyzed by polyethylene glycol-modified lipases with improved stability. *Food Chem.* 271: 433-439.
- Castro FF, Ponchio AB, Nassur CB, Parra I (2017) Mycelium-bound lipase from a locally isolated strain of *Aspergillus westerdijkiae*. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 10: 321-328.
- Chang SW, Lee GC, Shaw JF (2006) Efficient production of active recombinant *Candida rugosa* LIP3 lipase in *Pichia pastoris* and biochemical characterization of the purified enzyme. *J. Agric. Food Chem.* 54: 5831-5838.
- Chen G, Du H, Jiang B, Miao M, Feng B (2017) Activity of *Candida rugosa* lipase for synthesis of hexyl octoate under high hydrostatic pressure and the mechanism of this reaction. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 133: S439-S444.
- Coca J, Hernández O, Berrio R, Martínez S, Díaz E, Dustet JC (2001) Producción y caracterización de *Aspergillus niger* y *A. fumigatus*. *Biotechnol. Aplic.* 18: 216-220.
- Colla LM, Rizzardi J, Pinto MH, Reinehr CO, Bertolin TE, Vieira CJA (2010) Simultaneous production of lipases and biosurfactants by submerged and solid-state bioprocesses. *Bioresour. Technol.* 101: 8308-8314.
- Dominguez A, Costas M, Longo MA, Sanromán A (2003) A novel application of solid state culture: Production of lipases by *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol. Lett.* 25: 1225-1229.
- Duan X, Xiang M, Wang L, Yan Q, Yang S, Jiang Z (2019) Biochemical characterization of a novel lipase from *Malbranchea cinnamomea* suitable for production of lipolyzed milkfat flavor and biodegradation of phthalate esters. *Food Chem.* 297: 124925.
- Enayati M, Gong Y, Goddard JM, Abbaspourad A (2018) Synthesis and characterization of lactose fatty acid ester biosurfactants using free and immobilized lipases in organic solvents. *Food Chem.* 266: 508-513.
- Ericsson DJ, Kasrayan A, Johansson P, Bergfors T, Sandström AG, Bäckvall J, Mowbray SL (2008) X-ray structure of *Candida antarctica* lipase a shows a novel lid structure and a likely mode of interfacial activation. *J. Mol. Biol.* 376: 109-119.
- Ferrer P, Alarcón M, Ramón R, Dolores BM, Valero F (2009) Recombinant *Candida rugosa* LIP2 expression in *Pichia pastoris* under the control of the AOX1 promoter. *Biochem. Eng. J.* 46: 271-277.
- Ferrer P, Montesinos JL, Valero F, Solà C (2001) Production of native and recombinant lipases by *Candida rugosa*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 95: 221-255.
- Fickers P, Marty A, Nicaud JM (2011) The lipases from *Yarrowia lipolytica*: Genetics, production, regulation, biochemical characterization and biotechnological applications. *Biotechnol. Adv.* 29: 632-644.
- Fischer M, Pleiss J (2003) The Lipase Engineering Database: a navigation and analysis tool for protein families. *Nucl. Ac. Res.* 31: 319-321.
- Geoffroy K, Achur RN (2018) Optimization of novel halophilic lipase production by *Fusarium solani* strain NFCCCL 4084 using palm oil mill effluent. *J. Genet. Eng. Biotechnol.* 16: 327-334.
- Guillén M, Benaiges MD, Valero F (2017) Improved ethyl butyrate synthesis catalyzed by an immobilized recombinant *Rhizopus oryzae* lipase: A comprehensive statistical study by production, reaction rate and yield analysis. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 133: S371-S376.
- Hasan F, Shah AA, Hameed A (2009) Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. *Biotechnol. Adv.* 27: 782-798.
- He WS, Li L, Zhao J, Xu H, Rui J, Cui D, Li H, Zhang H, Liu X (2018) *Candida* sp. 99-125 lipase-catalyzed synthesis of ergosterol linolenate and its characterization. *Food Chem.* 280: 286-293.
- He Y, Li J, Kodali S, Chen B, Guo Z (2017) Rationale behind the near-ideal catalysis of *Candida antarctica* lipase A ( CAL-A ) for highly concentrating x-3 polyunsaturated fatty acids into monoacylglycerols. *Food Chem.* 219: 230-239.
- Ilmi M, Hidayat C, Hastuti P, Heeres HJ, Maarel MJEC Van Der (2017) Utilisation of *Jatropha* press cake as substrate in biomass and lipase production from *Aspergillus niger* 6516 and *Rhizomucor miehei* CBS. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 9: 103-107.
- Jaeger KE, Reetz MT (1998) Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnol.* 16: 396-403.
- Jahangiri A, Møller AH, Danielsen M, Madsen B, Joernsgaard B, Vaerbak S, Adlercreutz P, Dalsgaard TK (2018) Hydrophilization of bi-xin by lipase-catalyzed transesterification with sorbitol. *Food Chem.* 268: 203-209.
- Jalouli R, Parsiegla G, Carrière F, Gargouri Y, Bezzine S (2016) Efficient heterologous expression of *Fusarium solani* lipase, FSL2, in *Pichia pastoris*, functional characterization of the recombinant enzyme and molecular modeling. *Int. J. Biol. Macromol.* 94: 61-71.
- Jolivet P, Bordes F, Fudalej F, Cancino M, Vignaud C, Dossat V, Burghoffer C, Marty A, Chardot T, Nicaud JM (2007) Analysis of *Yarrowia lipolytica* extracellular lipase Lip2p glycosylation. *FEMS Yeast Res.* 7: 1317-1327.
- Kaushik R, Saran S, Isar J, Saxena RK (2006) Statistical optimization of medium components and growth conditions by response surface methodology to enhance lipase production by *Aspergillus carneus*. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 40: 121-126.
- Kempka AP, Lipke NL, Da Luz FPT, Menoncin S, Treichel H, Freire DMG, Di Luccio M, de Oliveira D (2008) Response surface method to optimize the production and characterization of lipase from *Penicillium verrucosum* in solid-state fermentation. *Bioproc. Biosyst. Eng.* 31: 119-125.
- Kim H, Kim T, Choi N, Kim BH, Oh SW, Kim IH (2019) Synthesis of diethylhexyl adipate by *Candida antarctica* lipase-catalyzed esterification. *Proc. Biochem.* 78: 58-62.
- Kumar V, Jahan F, Mahajan R V, Saxena RK (2016) Efficient regioselective acylation of quercetin using *Rhizopus oryzae* lipase and its potential as antioxidant. *Bioresour. Technol.* 218: 12461248.
- Kwon MA, Kim HS, Hahm DH, Song JK (2011) Synthesis activity-based zymography for detection of lipases and esterases. *Biotechnol. Lett.* 33: 741-746.
- Li L, Zhang S, Wu W, Guan W, Deng Z, Qiao H (2019a) Enhancing thermostability of *Yarrowia lipolytica* lipase 2 through engineering multiple disulfide bonds and mitigating reduced lipase production associated with disulfide bonds. *Enz. Microb. Technol.* 126: 41-49.
- Li T, Zhang W, Hao J, Sun M, Lin SX (2019b) Cold-active extracellular lipase: Expression in Sf9 insect cells, purification, and catalysis. *Biotechnol. Rep.* 21: e00295.
- Mancheño JM, Pernas MA, Martínez MJ, Ochoa B, Rúa ML, Hermoso J (2003) Structural insights into the lipase/esterase behavior in the *Candida rugosa* lipases family: Crystal structure of the lipase 2 isoenzyme at 1.97 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 332: 1059-1069.
- Matte CR, Bordinhão C, Poppe JK, Rodrigues RC, Hertz PF, Ayub MAZ (2016) Synthesis of butyl butyrate in batch and continuous enzymatic reactors using *Thermomyces lanuginosus* lipase immobilized in Immobead 150. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 127: 67-75.
- Meng Y, Li S, Yuan H, Zou D, Liu Y, Zhu B, Li X (2015) Effect of lipase addition on hydrolysis and biomethane production of Chinese food waste. *Bioresour. Technol.* 179:452-459.
- Oliveira F, Souza CE, Peclat VROL, Salgado JM, Ribeiro BD, Coelho MAZ, Venancio A, Belo I (2017) Optimization of lipase production by *Aspergillus ibericus* from oil cakes and its application in esterification reactions. *Food Bioprod. Proc.* 102: 268-277.
- Park JH, Park KM, Chang Y, Park JY, Han J, Chang PS (2017) Cloning and protein expression of the sn-1(3) regioselective lipase from *Cordyceps militaris*. *Enz. Microb. Technol.* 119: 30-36.
- Pereira A da S, Fontes-Sant'Ana GC, Amaral PFF (2019) Mango agro-industrial wastes for lipase production from *Yarrowia lipolytica*

- and the potential of the fermented solid as a biocatalyst. *Food Bioprod. Proc.* 115: 68-77.
- Pereira E, Andrade E, Fernandez-lafuente R, Maria D, Freire G (2017) Support engineering: relation between development of new supports for immobilization of lipases and their applications. *Biotechnol. Res. Innov.* 1: 26-34.
- Plüss J, Fischer M, Peiker M, Thiele C, Schmid RD (2000) Lipase engineering database: Understanding and exploiting sequence-structure-function relationships. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 10: 491-508.
- Poletto FS, Lima FS, Lundberg D, Nylander T, Loh W (2016) Tailoring the internal structure of liquid crystalline nanoparticles responsive to fungal lipases: A potential platform for sustained drug release. *Coll. Surf. B Biointerf.* 147: 210-216.
- Rakchai N, H-kittikun A, Zimmermann W (2016) The production of immobilized whole-cell lipase from *Aspergillus nomius* ST57 and the enhancement of the synthesis of fatty acid methyl esters using a two-step reaction. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 133: S128-S136.
- Rehman S, Wang P, Bhatti HN, Bilal M, Asgher M (2017) Improved catalytic properties of *Penicillium notatum* lipase immobilized in nanoscale silicone polymeric films. *Int. J. Biol. Macromol.* 97: 279-286.
- Reis P, Holmberg K, Watzke H, Leser ME, Miller R (2009) Lipases at interfaces: A review. *Adv. Coll. Interf. Sci.* 147: 237-250.
- Reza M, Mohammadi J, Peyda M (2017) Covalent immobilization of *Candida antarctica* lipase on core-shell magnetic nanoparticles for production of biodiesel from waste cooking oil. *Renew. Energy* 101: 593-602.
- Rodrigues S, Perrier V, Lecomte J, Dubreucq E, Ferreira-Dias S (2016) Biodiesel production from crude jatropha oil catalyzed by immobilized lipase/acyltransferase from *Candida parapsilosis* in aqueous medium. *Bioresour. Technol.* 218: 1224-1229.
- Sahay S, Chouhan D (2018) Study on the potential of cold-active lipases from psychrotrophic fungi for detergent formulation. *J. Genet. Eng. Biotechnol.* 16: 319-325.
- Sanfilippo C, Paternò AA, Patti A (2017) Resolution of racemic amines via lipase-catalyzed benzylation: Chemoenzymatic synthesis of the pharmacologically active isomers of labetalol. *Mol. Catal.* 449: 79-84.
- Shahedi M, Yousefi M, Habibi Z, Mohammadi M, As'habi MA (2019) Co-immobilization of *Rhizomucor miehei* lipase and *Candida antarctica* lipase B and optimization of biocatalytic biodiesel production from palm oil using response surface methodology. *Renew. Energy* 141: 847-857.
- Sharma R, Chisti Y, Banerjee UC, Chand U (2001) Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnol. Adv.* 19: 627-662.
- Skjold-Jørgensen J, Vind J, Moroz O V, Blagova E, Bhatia VK, Svendsen A, Wilson KS, Bjerrum MJ (2016) Controlled lid-opening in *Thermomyces lanuginosus* lipase- an engineered switch for studying lipase function. *BBA-Prot. Proteom.* 1865: 20-27.
- Solymar M, Fulop F, Kanerva LT (2002) *Candida antarctica* lipase A -a powerful catalyst for the resolution of heteroaromatic b-amino esters. *Tetrahedron: Asymm.* 13: 2383-2388.
- Tan CH, Show PL, Ooi CW, Ng EP, Lan JCW, Ling TC (2015) Novel lipase purification methods -a review of the latest developments. *Biotechnol. J.* 10: 3144.
- Tian K, Tai K, Jian B, Chua W, Li Z (2017) Directed evolution of *Thermomyces lanuginosus* lipase to enhance methanol tolerance for efficient production of biodiesel from waste grease. *Bioresour. Technol.* 245: 1491-1497.
- Treichel H, de Oliveira D, Mazutti M a., Di Luccio M, Oliveira JV (2010) A review on microbial lipases production. *Food Bioproc. Technol.* 3: 182-196.
- Turati DFM, Almeida AF, Terrone CC, Nascimento JMF, Terrasan CRF, Fernandez-Lorente G, Benevides CP, Guisan JM, Carmona EC (2019) Thermotolerant lipase from *Penicillium sp.* section *Gracilentia* CBMAI 1583: Effect of carbon sources on enzyme production, biochemical properties of crude and purified enzyme and substrate specificity. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 17: 15-24.
- Uppenberg J, Hansen MT, Patkar S, Jones T (1994) The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. *Structure* 2: 293-308.
- Verma N, Thakur S, Bhatt AK (2012) Microbial lipases: Industrial applications and properties (A review). *Int. Res. J. Biol. Sci.* 1: 88-92.
- Vyas S, Chhabra M (2016) Isolation, identification and characterization of *Cystobasidium oligophagum* JRC1: A cellulase and lipase producing oleaginous yeast. *Bioresour. Technol.* 223: 250-258.
- Xiaoan L, Xinjun Y, Jinshun L, Jiaxing X, Jun X, Zhen W, Tong Z, Yuanfang D (2017) A cost-effective process for the coproduction of erythritol and lipase with *Yarrowia lipolytica* M53 from waste cooking oil. *Food Bioprod. Proc.* 103: 86-94.
- Yadav MG, Vadgama RN, Kavadia MR, Odaneth AA, Lali AM (2019) Production of Pentaerythritol Monoricinoleate (PEMR) by immobilized *Candida antarctica* lipase B. *Biotechnol. Rep.* 23: e00353.
- Yadav RP, Saxena RK, Gupta R, Davidson S (1998) Lipase production by *Aspergillus* and *Penicillium* species. *Folia Microbiol.* 43: 373-378.
- Yamada R, Kimoto Y, Ogino H (2016) Combinatorial library strategy for strong overexpression of the lipase from *Geobacillus thermocatenulatus* on the cell surface of yeast *Pichia pastoris*. *Biochem. Eng. J.* 113: 7-11.
- Yilmaz DE, Sayar NA (2015) Organic solvent stable lipase from *Cryptococcus diffluens* D44 isolated from petroleum sludge. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 122: 72-79.
- Yuzbashev TV, Yuzbasheva EY, Vibornaya TV, Sobolevskaya TI, Laptev IA, Gavrikov AV, Sineoky SP (2012) Production of recombinant *Rhizopus oryzae* lipase by the yeast *Yarrowia lipolytica* results in increased enzymatic thermostability. *Prot. Expres. Purif.* 82: 83-89.
- Zhang X, Li X, Xia L (2015) Expression of a thermo-alkaline lipase gene from *Talaromyces thermophilus* in recombinant *Pichia pastoris*. *Biochem. Eng. J.* 103: 263-269.
- Zhang XF, Ai YH, Xu Y, Yu XW (2019) High-level expression of *Aspergillus niger* lipase in *Pichia pastoris*: Characterization and gastric digestion in vitro. *Food Chem.* 274: 305-313.
- Zheng R, Ruan L, Ma H, Tang X, Zheng Y (2016) Enhanced activity of *Thermomyces lanuginosus* lipase by site-saturation mutagenesis for efficient biosynthesis of chiral intermediate of pregabalin. *Biochem. Eng. J.* 113: 12-18.
- Zhou X, Han Y, Lv Z, Tian X, Li H, Xie P, Zheng L (2017) Simultaneously achieve soluble expression and biomimetic immobilization of *Candida antarctica* lipase B by introducing polyamine tags. *J. Biotechnol.* 249: 1-9.

---

## FUNGI AND YEASTS: LIPASE FACTORIES

Ricardo Martínez-Corona, Carlos Cortes-Penagos, Luis Alberto Madrigal-Pérez and Juan Carlos González-Hernández

### SUMMARY

*Lipases are enzymes with the capacity of catalyzing triglyceride hydrolysis reactions; they are used in many processes in the food industry, energy production, pharmaceutical catalysis, etc. Given the need to satisfy the current commercial and industrial demand of lipases, different strategies have been developed to study them and their applications. Because most of the bacterial species used for the production of lipases are pathogenic, efforts have been*

*made to find safe alternative systems that could be used the different processes in which lipases are involved. Thus, lipases from fungi and yeasts have won high attention. In this review we intend to cover the general and production characteristics of currently utilized lipases from various fungal microorganisms, in order to determine the existing alternatives for the industrial biotechnological processes that demand this type of enzymes.*

## FUNGOS E LEVEDURAS: FÁBRICAS DE LIPASES

Ricardo Martínez-Corona, Carlos Cortes-Penagos, Luis Alberto Madrigal-Pérez e Juan Carlos González-Hernández

### RESUMO

*As lipases são enzimas capazes de catalisar reações de hidrólise de triglicérides; são usadas em numerosos processos dentro da indústria alimentícia, energética, farmacêutica, etc. Diante da necessidade de cumprir com a demanda comercial e industrial atual de este tipo de enzimas em diversos processos, têm sido desenvolvidas diferentes estratégias de estudo de estas e de suas aplicações. Devido à maioria das espécies bacterianas, usadas para a produção de lipase, serem patogênicas, têm sido realizados esforços para encontrar sistemas*

*alternativos seguros para os diversos processos em que estão envolvidas este tipo de enzimas. Assim, as lipases provenientes de fungos e leveduras têm adquirido alto foco de atenção. Em este trabalho pretende-se mencionar as características gerais e de produção de lipases, provenientes de diversos microrganismos fúngicos, que foram estudados atualmente, com a finalidade de determinar estas alternativas para os processos biotecnológicos industriais que demandam este tipo de enzimas.*



## Avocado oil as an inducer of the extracellular lipase activity of *Kluyveromyces marxianus* L-2029

Ricardo MARTÍNEZ-CORONA<sup>1</sup>, Francisco Javier BANDERAS-MARTÍNEZ<sup>2</sup>, Jessica Nyx PÉREZ-CASTILLO<sup>2</sup>, Carlos CORTÉS-PENAGOS<sup>3</sup>, Juan Carlos GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ<sup>2\*</sup> 

### Abstract

Avocado represents one of the most nutritious and consumed foods in Mexico, and its export generates significant profits; because of its fatty acids content, the avocado oil was used as an inducer for the synthesis of extracellular lipases from the non-conventional yeast *Kluyveromyces marxianus* L-2029. Lipases are able to catalyze acyl glycerides, hydrolyzing them into fatty acids and glycerol; they have several applications in various industries. In order to determine the ideal initial avocado oil concentration in the culture medium for the yeast, the induction was carried out at different concentrations in incubation for 24 h. The yeast presented the greater extracellular lipase productivity at 3.5% v/v avocado oil concentration, with a 3.47  $\mu\text{mol PNF/mg prot} \cdot \text{min (U/mL)}$  maximum activity. The enzymatic extract obtained at this condition had an optimum lipase activity temperature of 36 °C and pH 6. The *pYJR10W* lipase was detected in the enzymatic extract from avocado oil induction, and is therefore responsible for the extracellular lipase activity of *K. marxianus*.

**Keywords:** avocado oil; extracellular lipases; *Kluyveromyces marxianus*; lipase activity.

**Practical Application:** Avocado oil can be used to induce the synthesis of extracellular lipases from *K. marxianus* L-2029, being an alternative for the production of these enzymes. In addition, said strain presents a good lipase activity; the lipase properties of this yeast are attractive to be proposed in several applications in the future.

## 1 Introduction

Lipases are enzymes that catalyze a wide variety of reactions, such as the partial or total hydrolysis of triacylglycerides, and synthesis reactions, which are classified into two main types of reactions: esterification and transesterification (Colla et al., 2010). The lipases are serine enzymes defined as triacylglycerol acyl hydrolases (EC 3.1.1.3), capable of hydrolyzing long chain acylglycerol carboxylic esters, with chains greater than 10 carbon atoms, which distinguishes them from esterases (Casas-Godoy et al., 2009).

This type of enzymes has a high importance in the industry thanks to its multiple applications in the degradation of substrates with high fat content, as well as in esterification reactions carried out in the food, paper, pharmaceutical, energy and cosmetic industries (Diez & Sandoval, 2012; Sharma et al., 2001). In the food industry, lipases are used in the production of dairy products or with specific properties, such as cheese, cocoa butter, milk substitutes, among others. Another common application of lipases is the modification of the content of fats and oils in some foods, which allows improving the nutritional content of some of them, or improve the organoleptic characteristics of others, through the modification of compounds that provide specific flavors or fragrances (Andualema & Gessesse, 2012; Casas-Godoy et al., 2009; Hasan et al., 2006).

Microorganisms with a high capacity to produce lipases can be found in different habitats, mainly in the waste or the residues of vegetable oils used in the preparation of fried foods, in dairy products industries, in contaminated soils with oils and in deteriorated foods. The lipase production for industrial purposes has focused on those obtained only by some species, which in many cases present a lack of certain desirable characteristics for specific processes (Vakhlu & Kour, 2006). Lipase production alternatives have been continuously searched, in order to identify enzymes with potential characteristics for various biotechnological applications.

*K. marxianus* is a non-conventional homothallic and hemiascomycete yeast, phylogenetically related to *Saccharomyces cerevisiae* (Lane & Morrissey, 2010; Lane et al., 2011). *K. marxianus* has shown lipase activity (Deive et al., 2003; Stergiou et al., 2012) and possess desirable characteristics for its application in various biotechnological processes. For instance, it assimilates a variety of sugars, it has a rapid growth rate (with a doubling time of approximately 70 min), it is thermotolerant (with the ability to grow up to 52 °C), and it has an extraordinary secretory capacity (Jeong et al., 2012; Lee et al., 2013; Lertwattanasakul et al., 2015). The strain *Kluyveromyces marxianus* L-2029, used in the present study, was isolated from spontaneous fermentations involved in the production of Mezcal, during fermentation of *Agave cupreata*

Received 25 Feb., 2019

Accepted 17 June, 2019

<sup>1</sup>Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas – PIDCB, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, México

<sup>2</sup>Tecnológico Nacional de México, Instituto Tecnológico de Morelia, Morelia, Michoacán, México

<sup>3</sup>Facultad de Química Farmacobiología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, México

\*Corresponding author: [jgonzal@itmorelia.edu.mx](mailto:jgonzal@itmorelia.edu.mx)

juice, which is elaborated in the state of Michoacán, México, (González-Hernández et al., 2012); said strain has shown a high growth capacity and ethanol production (Pérez et al., 2013), and could possess a high capacity for the production of lipases under a suitable inducer.

The synthesis of extracellular lipases is strongly induced by the presence of triglycerides in the growth medium of the microorganism (Hsu et al., 2008). Avocado is one of the most important products in agriculture and in the Mexican diet; the amount of lipids in the avocado pulp is very high (21 to 33%) (Moreno et al., 2003). For instance, the amount of saturated fatty acids in avocado oil is similar to sunflower, soybean, peanut and olive oils. Regarding the presence of monounsaturated fatty acids, the nutritional properties are similar to those of olive oil, and the main one is oleic acid, reaching concentrations of up to 60%. Concerning the polyunsaturated fatty acids ratio, the linoleic acid has a lower proportion in avocado oil (approximately 14%) than in canola oil (Ortiz et al., 2004). The high-quality requirements for the avocado exportation cause that a large part of the production is not commercialized; a fraction is used for the production of avocado oil currently by some regional companies. Avocado oil could therefore become a good substrate for the induction of lipase synthesis.

The main objective of this work was to determine the best concentration of avocado oil for the induction of the synthesis of the extracellular lipase from *K. marxianus* L-2029, as well as their subsequent identification and partial characterization.

## 2 Materials and methods

### 2.1 Strain

The strain used in the study, *K. marxianus* L-2029, was obtained from the Biochemistry Laboratory of the Instituto Tecnológico de Morelia (Morelia, Michoacán, México). The *K. marxianus* strain was previously isolated from spontaneous fermentations in the production of Mezcal (González-Hernández et al., 2012) and it was deposited in the National Collection of Microbial Strains and Cultures (CDBB) from CINVESTAV with registration number L-2029. For the maintenance and growth of the strain, YPD agar (20 g/L glucose, 10 g/L peptone, 10 g/L yeast extract, 20 g/L agar) culture medium was used.

### 2.2 Statistical design and culture conditions

In order to determine the initial concentration of avocado oil that promoted the greater lipase activity, a comparative analysis was carried out at the flask level, in a randomized single-factor statistical design. The factor, the initial concentration of avocado oil, was varied in 7 levels: 1, 2, 3, 3.5, 4 and 4.5% v/v; as a control, the culture medium without oil was used. Each of the treatments was carried out in triplicate. For the preparation of the different treatments, commercial avocado oil Avocare® (*Persea gratissima*) was used.

The base of the culture medium was YPD liquid medium added with avocado oil at different concentrations. Culture media was inoculated with an initial concentration of  $3 \times 10^6$  cel/mL and then was incubated at 200 rpm, 30 °C and 6.5 initial pH.

Samples were taken every 2 h for the determination of the kinetic parameters described below.

The evaluated response variables were the doubling time and the lipase activity (U/mL), which were compared by analysis of variance (ANOVA) at a level of significance  $\alpha$  of 0.01 in the JMP® Software. The treatments were completely randomized performed, in triplicate.

### 2.3 Inoculum preparation

Flasks with a capacity of 250 mL and working volume of 100 mL of liquid YPD culture medium (20 g/L glucose, 10 g/L yeast extract, 10 g/L peptone), supplemented with avocado oil at each concentration, were prepared for the preadaptation of the yeast. Five volumes of the yeast were transferred, from the Petri dish where it was stored, to the inoculum flask and incubated for 12 h, at 30 °C and 200 rpm.

The microbial load of the inoculum was determined after 12 h by direct counting in the Neubauer chamber; the pertinent calculations were made to begin with an initial concentration of  $3 \times 10^6$  cel/mL.

### 2.4 Determination of kinetic parameters

During the fermentation kinetics, the following factors were monitored:

- Cell growth: It was determined by viable cell counting in Neubauer chamber, staining with methylene blue. The count was performed in a microscope, by an average of the sum of five quadrants, considering the relevant dilution. The result was expressed in cel/mL and the generated data allow the calculation of the doubling time response variable.
- Glucose consumption: It was measured with the DNS oxide-reduction technique; reducing sugars, such as glucose, have the capacity to reduce 3,5 dinitro salicylic acid, causing a color change, which can be quantified in a spectrophotometer, at a wavelength of 540 nm. For the technique, 100  $\mu$ L (or its dilution with distilled water) was added to 100  $\mu$ L of DNS reagent; to promote the reaction, heating was carried out at 90 °C for 5 min, after which it was stopped by cooling in an ice bath for 5 min. A 1 mL of distilled water was added and quantified at the wavelength mentioned above. To calculate the concentration, a calibration curve was previously prepared at known concentrations with a glucose stock at a concentration of 10 g/L.

### 2.5 Total protein

For the quantification of total protein in the extracellular extracts, the Bradford method (Bradford, 1976) was used, which is based on the color change of Coomassie blue at different protein concentrations. Coomassie blue interacts with basic and aromatic amino acids, causing the color change from red to blue, at a wavelength of 595 nm. To a solution with 2.3 mL of distilled water and 100  $\mu$ L of enzyme extracellular extract, 600  $\mu$ L of Bradford reagent (5 mL of Coomassie blue G-250, 2.5 mL



of ethanol and 5 mL of phosphoric acid, for a total volume of 50 mL) were added. The mixture was stirred and measured in a spectrophotometer at the mentioned wavelength. To calculate the protein concentration in the extracts, a calibration curve was previously prepared at known concentrations using a stock of bovine serum albumin with a concentration of 1 mg/mL.

## 2.6 Esterase activity

In order to compare the activity of the enzymatic extract on short chain acids with respect to long chain acids, the colorimetric technique of the hydrolysis of p-nitrophenyl butyrate (colorless) to butyric acid and p-nitrophenol (yellowish color, measured at 400 nm) was used. A volume of 5 mL of phosphate buffer (100 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.25) was incubated with 100  $\mu\text{L}$  of enzymatic extract in a water bath at 30 °C for 10 min; subsequently, 50  $\mu\text{L}$  of a 100 mM p-nitrophenyl butyrate solution was added and reacted for 10 min at the same temperature. The solutions were placed in an ice bath for 10 min and were centrifuged at 2000 rpm for 5 min. The supernatant was used to determine its absorption at the aforementioned wavelength. A standard curve was made using a stock of p-nitrophenyl 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . A unit of esterase activity is defined as the amount of enzyme released per 1 mmol of fatty acid per minute (Casas-Godoy et al., 2009).

## 2.7 Lipase activity

To determine the lipase activity the hydrolysis method of p-nitrophenyl palmitate, which is converted into a quantifiable long-chain fatty acid substrate, was used (Pencreac'h & Baratti, 1996). The technique allows determining the amount of p-nitrophenyl (p-NF) released, which causes a change in the absorbance of a sample at a wavelength of 410 nm. 50  $\mu\text{L}$  of 16.5 mM p-nitrophenyl palmitate solution (diluted in isopropanol), 3 mL of 50 mM Tris HCl buffer solution (Triton X100 0.4%, gum arabic 0.1%, pH 8) and 50  $\mu\text{L}$  of Triton X100 were mixed and pre-incubated at 37 °C in a water bath for 5 min; after that time, 55  $\mu\text{L}$  of enzyme extract was added and then was incubated for 5 min. Finally, the absorbance was determined in a spectrophotometer at the aforementioned wavelength. To calculate the amount of hydrolyzed p-nitrophenyl, a standard curve was made at known concentrations, from a p-nitrophenyl 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  standard. One unit of lipase activity is defined as the amount of enzyme released per 1 mmol of fatty acid per minute (Casas-Godoy et al., 2009).

## 2.8 Ideal pH and temperature of the enzyme extract

The ideal conditions of the enzymatic extract obtained from each treatment was deduced using the hydrolysis technique of p-nitrophenyl palmitate, described above. In order to determine the optimum pH, the pH of the solution buffer was varied from 4.5 to 9. The reaction temperature in this case was maintained at 37 °C and the absorbance of the reaction was measured every 5 min at 410 nm in a spectrophotometer. On the other hand, to determine the optimal temperature of the enzymatic extract, the pH was kept constant at 8 while the incubation temperature was varying from 30° to 50 °C. The absorbance of the reaction was measured every 5 min at 410 nm in a spectrophotometer.

In both cases the results were expressed in terms of units of lipase activity.

## 2.9 Enzymatic stability at ideal conditions

The stability of the enzymatic extract was analyzed at the previously determined pH and temperature conditions, using the p-nitrophenyl palmitate hydrolysis technique, and monitoring the lipase activity every 5 min, for an approximate time of 1.5 h.

## Identification of lipases in the enzymatic extract

The protein content of the extracellular extract from the fermentation of the treatment that showed to have a greater lipase activity was first concentrated: 200  $\mu\text{L}$  of the extract were added to 800  $\mu\text{L}$  of cold acetone. The mixed was then incubated at -20 °C for 1 h. Later, the sample was centrifuged at 13,000 rpm for 10 min, and the pellet was recovered as the total concentrated protein. The excess of acetone was allowed to evaporate before preparing the sample for electrophoresis.

Denaturing electrophoresis in polyacrylamide gel (SDS-PAGE) was carried out, using a 4% stacking gel and a 12.5% resolution gel (Singh et al., 2006). 5  $\mu\text{L}$  of lysis buffer (0.5 M Tris HCl, 10% SDS, 0.5% bromophenol blue, 0.005% 2-mercaptoethanol and 25% glycerol), 20  $\mu\text{L}$  of distilled water and 3  $\mu\text{L}$  of a blue Coomassie solution were added to the concentrated protein from the extracellular extract. These preparation samples were incubated in a water bath at 90 °C for 10 mins to hydrolyze all the proteins. After that, 15  $\mu\text{L}$  of the stained samples were and loaded into the previously prepared acrylamide gel; electrophoresis was run at 90 V for 1.75 h on charged 1X buffer (25 mM tris base, 192 mM glycine and 3.46 mM SDS). Once the electrophoresis was complete, the gel was separated and stained with a Coomassie blue staining solution for 30 min; the gel was then decolorized using a 5% methanol, 85% distilled water and 10% glacial acetic acid solution, 24 h. Finally, the gel was washed twice with distilled water and was revealed.

## 3 Results

### 3.1 Yeast growth in medium added with avocado oil

To determine the best initial concentration of the avocado oil inducer, fermentation kinetics were performed at different concentrations, from 1 to 4.5% v/v (6 total treatments), plus the control treatment at 0% inductor concentration. Each of the experiments was carried out in triplicate, and each kinetic had a total time of 24 h.

The presence of the inducer in the culture medium did not affect the *K. marxianus* L-2029 cell growth in any of the treatments (Figure 1A). In all cases, an exponential phase time of 8 h and a cellular concentration during the stationary phase of approximately  $3 \times 10^8$  cel/mL was observed. Despite the stress conditions generated by the absence of sugar as an energy source (which was totally consumed after the exponential phase), and the presence of the inducing agent, no phase of death was observed in any of the treatments, after 24 h of incubation.

From the cell concentration data, the response doubling time variable was calculated, which can offer more information about the influence of the inducer on the *K. marxianus* L-2029 growth on the different treatments and its adaptation to them (Table 1).

### 3.2 Lipase activity of the extracellular extract

In order to determine the influence of the avocado oil added to the culture medium, the extracellular protein was determined in for each treatment. In general, a slight increment in the extracellular protein was observed from the 8th hour of fermentation, at which point most of the glucose was consumed. The increase was approximately 10 mg/mL in the best case though (Figure 1C). The protein concentration in the control treatment and in the treatments with a lower concentration of

avocado oil (up to 3% v/v), was approximately 20 mg/mL lower than that detected for the treatments with a higher avocado oil concentration. Indeed, the highest concentration of extracellular protein detected was in the treatment with a 4.5% v/v of avocado oil concentration, being approximately 100 mg/mL at the end of the fermentation time, significantly greater than the 60 mg/mL detected in the control treatment.

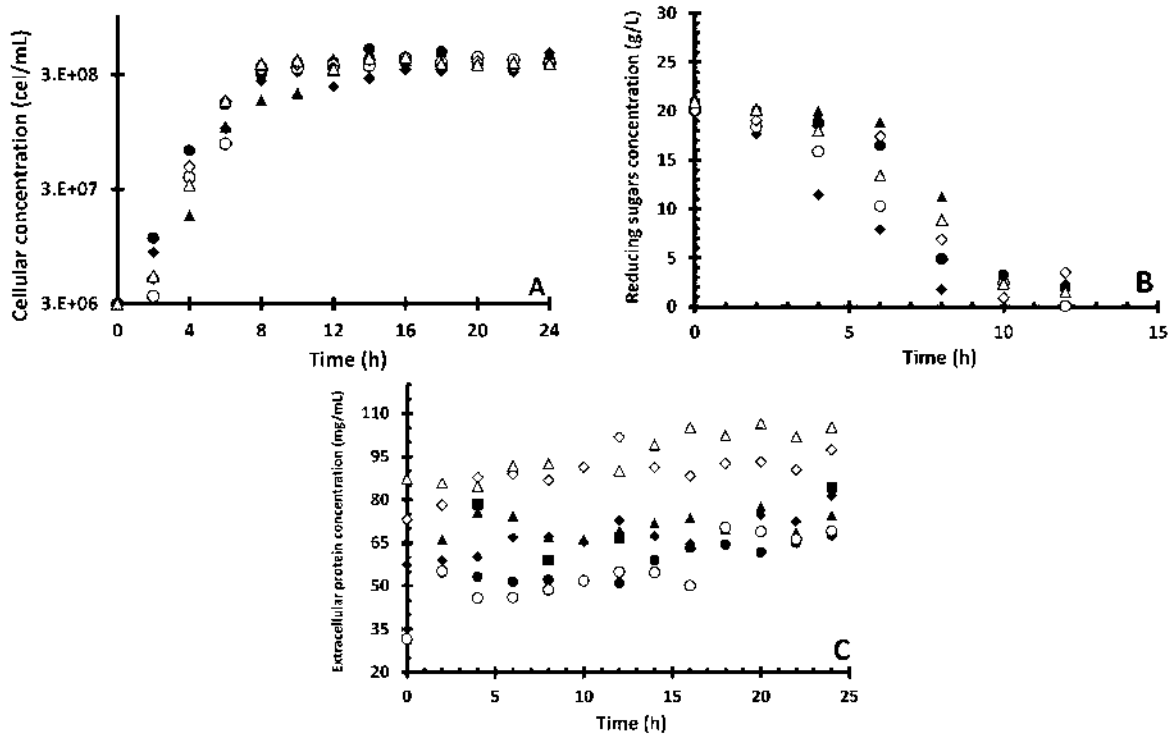
Considering the concentration of protein obtained in the different treatments, the esterase and lipase activities were calculated. Esterase activity, expressed in micrograms of p-nitrophenyl released per milligram of extracellular protein per minute (U/mL), was only detected in the treatment with the lowest avocado oil concentration, as well as in the control treatment; from a concentration up to 2% v/v avocado oil, the esterase activity was imperceptible (data not shown). Avocado oil is mainly composed of long chain fatty acids, which would promote the synthesis of lipases instead of esterases (Casas-Godoy et al., 2009).

The maximum lipase activity was detected at 8 h of fermentation in all the treatments with added avocado oil. This response variable was statistically compared using a Tukey-Kramer test at a significance level of 0.01 (Table 1). The treatments with the lowest avocado oil concentration (1 to 3% v/v) did not differ statistically from the control treatment, having a lipase activity close to 1 U/mL. In contrast, the treatments with a higher avocado oil concentration (4 and 4.5% v/v) presented a higher activity in reference to the control and the other three treatments mentioned above, practically doubling the values of the same.

**Table 1.** Statistical comparison by Tukey-Kramer test for doubling time and lipase activity.

Treatment	Avocado oil concentration (% v/v)	Doubling time (h)	Lipase activity (U/mL)
1	0	1.25 ± 0.23 <sup>A</sup>	0.75 ± 0.05 <sup>D</sup>
2	1	1.23 ± 0.27 <sup>A</sup>	1.17 ± 0.37 <sup>CD</sup>
3	2	1.03 ± 0.01 <sup>A</sup>	0.94 ± 0.22 <sup>CD</sup>
4	3	1.00 ± 0.04 <sup>A</sup>	1.16 ± 0.08 <sup>CD</sup>
5	3.5	1.27 ± 0.02 <sup>A</sup>	4.69 ± 0.23 <sup>A</sup>
6	4	0.97 ± 0.02 <sup>A</sup>	2.22 ± 0.45 <sup>B</sup>
7	4.5	0.97 ± 0.10 <sup>A</sup>	1.90 ± 0.15 <sup>BC</sup>

Different letters mean statistical difference for  $\alpha = 0.01$ ,  $n = 3$ .



**Figure 1.** Parameters determined during induction with avocado oil for the synthesis of extracellular *K. marxianus* L-2029 lipases: (A) Cell growth; (B) Reducing sugar uptake and; (C) Extracellular protein concentration. Concentration of avocado oil for the different treatments: (●) 0%, (◆) 1%, (▲) 2%, (■) 3%, (○) 3.5%, (◇) 4% and (Δ) 4.5%.

The influence of avocado oil promoting the lipase synthesis in *K. marxianus* L-2029 and their activity is evident. The treatment that showed greater activity, at a confidence level of 90%, was the treatment with an avocado oil concentration of 3.5% v/v, and an activity of 4.69 U/mL.

### 3.3 Optimum temperature and pH, and extracellular extract stability

The extracellular extract from the treatment with an avocado oil concentration of 3.5% v/v, was used to determine the optimum temperature and pH of the same.

The temperature profile was evaluated from 30° to 50 °C, at pH 8 (Figure 2A). The maximum activity detected in this range was at 36 °C. The lipase activity of the extract decreased considerably at temperatures above 38 °C, and it was practically nullified at 46 °C.

The enzymatic activity profile to evaluate the optimum pH of the enzymatic extract of the treatment at 3.5% v/v avocado oil, was determined in a range from 4 to 9, using a temperature of 37 °C (Figure 2B). The maximum activity point was detected at a pH 6 for the extract obtained from *K. marxianus* L-2029; in addition, a slight increase in activity was observed at pH 8.

In order to determine the stability of the enzymatic extract, the lipase activity was evaluated over time at a temperature of

36 °C was used, as well as the two pH values at which a high activity was obtained, 6 and 8 (Figure 3). At a pH 6, the activity of the enzyme remained constant for approximately 60 min, after which there was an abrupt increase in the activity detected. This increase is attributed to the stability of the reagent used in the technique and not properly to an increase in the activity of the enzyme. Using a pH of 8, the trend was similar, maintaining activity close to 2 U/mL for a total time of 90 min.

### 3.4 Identification of lipases in the extracellular extract

For the identification of the probable extracellular lipases from *K. marxianus* L-2029, an enzyme extract sample was obtained at the best conditions of temperature, pH, time and avocado oil concentration previously determined. Due to the low concentration in the extracellular extract, the total protein was concentrated by treatment with acetone. This was applied to four different samples obtained under the conditions already described.

After the acetone treatment, the protein concentration increased from 137.68 mg/mL, obtained directly from the fermentation extracts, to 256.45 mg/mL. In the gel obtained from the SDS-PAGE, a band was detected in each of the extracts from the induction of lipase synthesis from *K. marxianus* L-2029 using avocado oil (lanes 2 to 5, Figure 4); this band had an approximate molecular size of 40 KDa, if it is compared with

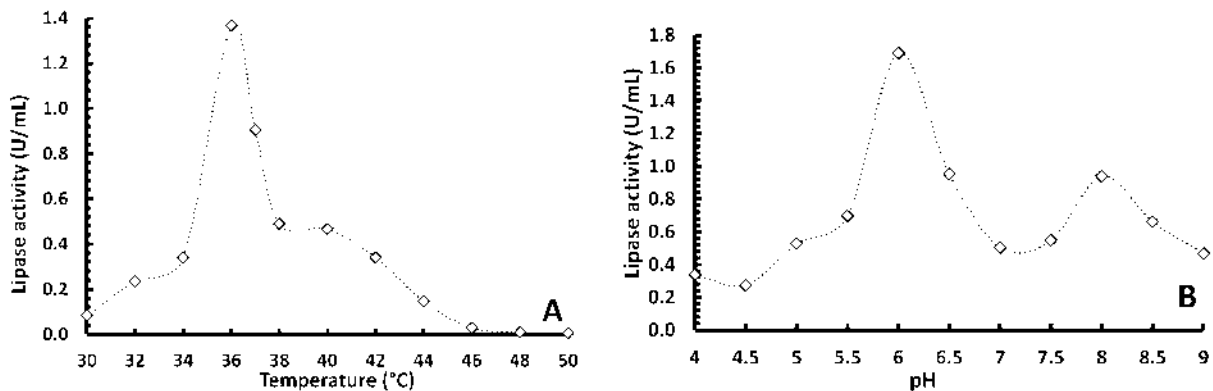


Figure 2. Influence of temperature and pH on the lipase activity of the extracellular extract obtained from *K. marxianus* L-2029 with 3.5% avocado oil: (A) Lipase activity at different temperatures and; (B) Activity lipase at different pH.

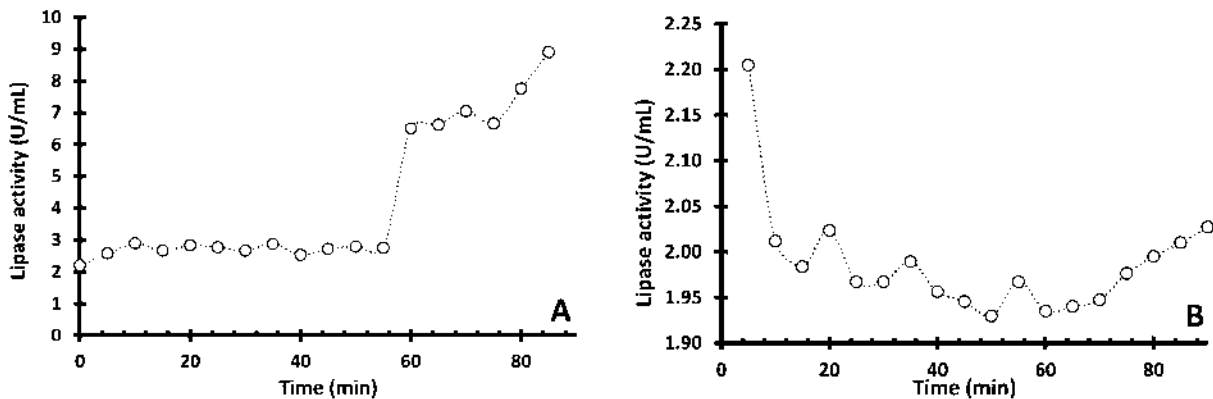
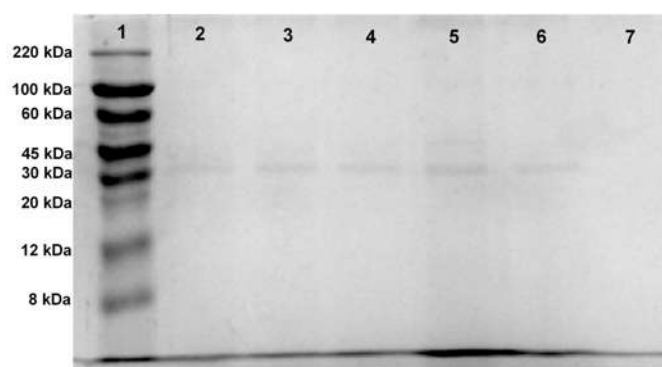


Figure 3. Stability of the extracellular extract obtained from *K. marxianus* L-2029 induced with 3.5% avocado oil at 36 °C: (A) pH 6 and; (B) pH 8.



**Figure 4.** Identification of extracellular *K. marxianus* L-2029 lipases by SDS-PAGE electrophoresis. Lane 1: Molecular size marker; Lane 2 to 5: Samples of lipase extract obtained at ideal 3.5% oil concentration; Lane 6: Positive control: Purified lipase from *C. rugosa*; Lane 7: Negative control.

the standard used (lane 1). In addition, the LIP2 lipase from *C. rugosa*, whose molecular size is approximately 40 kDa, was used as a positive control (lane 6, Figure 4).

#### 4 Discussion

*K. marxianus* shows an accelerated growth when glucose is its only carbon source, with an average doubling time of 70 min (Groeneveld et al., 2009). In spite of slight variations observed in the values of doubling time at different concentrations of avocado oil (Table 1), it remained between 0.97 and 1.25 h; in addition, no significant statistical difference was detected in any of the cases. Therefore, the avocado oil did not have a negative effect on the adaptation and growth of the yeast to the culture medium, which took advantage of the available sugar to multiply.

Reports indicate that lipases are inducible enzymes, and in the case of the LIP3, LIP4 and LIP5 lipase promoters from *Candida rugosa*, the presence of ORE (elements of response to oleate) and UAS1 motifs has been detected, which regulate their synthesis (Hsu et al., 2008). In *S. cerevisiae*, highly related to *K. marxianus*, most of the genes whose transcription is activated in the presence of oleic acid are under ORE regulation; the ORE motif consists of two CGG triplets spaced by 15 to 18 nucleotides (5'-CGGN3'TNAN9-12CCG-3'), which is regulated by the Pip2p-Oaf1 factor, also subjected to catabolic repression (Gurvitz & Rottensteiner, 2006). In addition, it was reported that oleic acid is a strong inducer of lipase activity in *K. marxianus* (Deive et al., 2003; Stergiou et al., 2012) and is one of the main components of avocado oil (Pacetti et al., 2007).

Thus, the glucose present in the culture medium could have promoted the growth of *K. marxianus* L-2029, without affecting the doubling time of the yeast, despite the presence of avocado oil. In fact, the initial glucose concentration (20 g/L) was strongly diminished after 8 h of fermentation and practically consumed after 12 h (Figure 1B), the same time that lasted the exponential phase in all the treatments used in this study.

Few studies report the production of lipases by *K. marxianus*. Deive et al. (2003) informed the lipase activity of *K. marxianus* induced with different substrates: oleic acid, palmitic acid, olive

oil, corn oil and glycerol. The synthesis of lipases was principally benefited by induction with oleic acid, and the enzyme extract showed stability at acidic pH and elevated temperatures. Very low activities were detected for all inducers used in this study, except for the culture media supplemented with 10 g/L of tributyrin, in which the maximum activity detected was 40 U/mL, after 9 days of incubation. The highest activity determined when olive oil was used as the inducing agent, was 4.5 U/mL, after 7 days of incubation. The higher lipase activity obtained in this study is greater than the maximum obtained using avocado oil as inducer; however, the total time in which both values were obtained, and the technique used for the determination of said parameter, must be taken into account.

On the other hand, Stergiou et al. (2012) reported the optimization of some parameters involved in the production of lipases using *K. marxianus*: initial pH, temperature and incubation time; in addition, different lipase-inducing agents were tested, such as olive oil, corn oil, meat fat and cooking oil. The optimization proposed an initial pH of 6.4 and a temperature of 32.5 °C, as suitable conditions for the production of lipases (with olive oil as inducer), which showed a lipase activity of 0.175 U/mL. In this case, the yield obtained for the induction with avocado oil (4.69 U/mL) was higher.

Several studies have recently focused on the use of vegetable oils or residues with a high fat content for the induction of lipase synthesis. The most used inducer for the synthesis of lipases has been olive oil; the maximum lipase activity detected using this inducing agent has been achieved with *Aspergillus niger* and *Aspergillus fumigatus*, that exceeds values of 60 U/mL (Coca et al., 2001).

The *Yarrowia lipolytica* yeast has been used for the production of lipases induced by agro-industrial waste, such as barley bran, crushed walnut and sunflower oil (Domínguez et al., 2003). Sunflower oil has also been used for the production of extracellular lipases from *Aspergillus carneus* (Kaushik et al., 2006). Kempka et al. (2008) reported soybean meal as the best inducer among diverse substrates, including sugarcane molasses, hydrolyzed yeast, fermented corn liquor, yeast extract, sodium chloride, soybean oil, castor oil, corn oil, olive oil and peptone. Other reported inducers used for the production of lipases are bagasse from sugarcane, olive oil, wheat bran and rice bran, as well as residual mustard, peanut and coconut oils, wastewater, corn liquor, banana residues, melon, watermelon, lentil peel, sesame oil, peptone, tributyrin, citric acid and glucose (Bhosale et al., 2012; Treichel et al., 2010). Pabline et al. (2014) optimized the lipase production in submerged fermentation under different nutrient substrates, such as corn liquor, yeast extract, peptone and soybean oil, as well as different sources of sodium, magnesium, potassium and nitrate; the authors identified four strains with high lipase activity, including *Penicillium lanosum* and three bacterial strains. The use of walnut cake for the synthesis of lipases from *A. niger* AS-02 (Salihu et al., 2016) and soy molasses, from *C. rugosa* and *Geotrichum candidum* has also been proposed (Morais et al., 2016).

Recently, Ilmi et al. (2017) proposed the use of the oil obtained by mechanical pressure of the tropical plant *Jatropha curcas* L.; they achieved the induction of lipases from *A. niger*

6516 and *Rhizomucor miehei* CBS 260.62. Oliveira et al. (2017), on the other hand, used several agro-industrial residues as lipase inducer from *Aspergillus ibericus* MUM03.49: andiroba oil cake, cupuasú oil cake, canola oil cake, macauba oil cake, palm kernel oil cake, soybean meal, cake of green coffee oil and sesame oil cake. Xiaoyan et al. (2017) proposed the use of residual cooking oil to evaluate the co-production of erythrol and lipases using *Y. lipolytica* M53, obtaining a highest 12.7 U/mL lipase activity.

In the case of *K. marxianus*, the use of olive oil, corn oil, meat fat and cooking oil has been reported (Stergiou et al., 2012). Thus, avocado oil is proposed as a good lipase-inducing agent, showing a good action on the synthesis of lipases from the non-conventional yeast *K. marxianus* L-2029.

The maximum activity detected in this range was at 36 °C, despite the fact that *K. marxianus* is a thermotolerant yeast (Lane & Morrissey, 2010; Lane et al., 2011). The optimal temperatures, reported for fungal microorganisms, are commonly between 30 and 40 °C, such as *Y. lipolytica* (30 °C) and *P. verrucosum* (37 °C) (Menoncin et al., 2010; Sathish-Yadav et al., 2011), although some of them (for example those from *Candida antarctica* ZJB09193) have reached maximum activity above 50 °C (Liu et al., 2012). However, Deive et al. (2003) detected a maximum activity of 80 U/mL at a temperature of 50 °C, for the extracellular lipases from *K. marxianus* CECT 1018 produced in medium added with tributyrin, for which there is a variation between the strains used in each study.

Despite the extracellular enzymatic extract showed a higher lipase activity at pH 6 and 8, it has been reported that the *K. marxianus* CECT 1018 extracellular lipase is sensitive to pH values close to neutrality and alkalinity; on the other hand, a high stability of said enzyme has been reported at acidic pH 4 (Deive et al., 2003).

To determine the identity of the protein detected in the extracellular extract by SDS-PAGE, a screening was done in the NCBI database (National Center for Biotechnology Information), since the *K. marxianus* DMKU3-1042 genome was recently sequenced (Lertwattanasakul et al., 2015). The BlastP analysis allowed us to recognize 8 nucleotide sequences with probable coding for lipases in the genome of the yeast; these genes are distributed in 8 of the chromosomes that structure the *K. marxianus* genome. Thus, the genes encoding the LIP2, LIP3 and LIP5 lipases are located on chromosome 1; the genes of the ATG15 and YOR059C lipases are located on chromosome 3, while the YDR444W gene is situated on chromosome 4; finally, the YJR107W and ROG1 genes of the putative lipases of *K. marxianus* are located on chromosome 6.

The two putative lipases with molecular sizes approximating those detected in the SDS-PAGE gel of the extracellular extracts from *K. marxianus* L-2029, are the *pYJR107W* and *pLIP2* lipases (44,526 and 44,682 kDa, respectively). The general objective of our working group is to study each of the putative lipases from L-2029 strain, and we have determined that the only lipases with peptide signal are the *pLIP3* and *pYJR107W* putative lipases (data to be published). Thus, we deduced that the lipase responsible for the enzymatic activity detected from avocado oil induction was the protein encoded by the *YJR107W* gene.

There is little reported information related to the characteristics of the *pYJR107W* lipase, although homologous proteins to the putative lipases found in the database from *K. marxianus* have been described in other yeasts. There is evidence of the existence of the *pYJR107W* lipase in *S. cerevisiae*, named *Lih1* (Galibert et al., 1996); this lipase has a 26% identity and a 44% similarity with the *Lip2* enzyme from *Y. lipolytica*, which suggests that all three lipases could be derived from a common ancestor (Meunchan et al., 2015).

## 5 Conclusion

In this work, we confirmed that avocado oil is a good inducer for the synthesis of lipases, derived from its high content of long chain fatty acids, mainly oleic acid, which promoted the synthesis of the *pYJR107W* lipase from *K. marxianus* L-2029, which in turn is the responsible enzyme for the extracellular lipase activity for this yeast. We will be focusing our studies on the potential applications of this lipase in the future.

## Acknowledgements

We appreciate the participation of the “Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología” (CONACyT) through the financial support of the scholarship 253782. This study was partial funded by “Tecnológico Nacional de México” (grant numbers 5781.6-P, 6131.17-P, and 6525.18-P) from 2016, 2017 and 2018 “Convocatoria de Apoyo a Proyectos de Investigación Científica, Aplicada, Desarrollo Tecnológico e Innovación”.

## References

- Andualema, B., & Gessesse, A. (2012). Microbial lipases and their industrial applications. *Biotechnology*, 11(3), 100-118. <http://dx.doi.org/10.3923/biotech.2012.100.118>.
- Bhosale, H. J., Kadam, T. A., Sukalkar, S. R., & Adekar, S. D. (2012). Lipase production from *Bacillus* sp using soybean oil cake as substrate. *International Journal of Pharmaceutical and Biological Research*, 3(5), 213-218.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3). PMID:942051.
- Casas-Godoy, L., Duquesne, S., Bordes, F., Sandoval, G., & Marty, A. (2009). Lipases: an overview. In G. Sandoval (Ed.), *Lipases and phospholipases: methods and protocols* (Vol. 531). México: Life Sciences.
- Coca, J., Hernández, O., Berrio, R., Martínez, S., Díaz, E., & Dustet, J. C. (2001). Producción y caracterización de *Aspergillus niger* y *A. fumigatus*. *Biología Aplicada*, 18(4), 216-220.
- Colla, L. M., Rizzardi, J., Pinto, M. H., Reinehr, C. O., Bertolin, T. E., & Costa, J. A. (2010). Simultaneous production of lipases and biosurfactants by submerged and solid-state bioprocesses. *Bioresource Technology*, 101(21), 8308-8314. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.05.086>. PMID:20580228.
- Deive, F. J., Costas, M., & Longo, M. A. (2003). Production of a thermostable extracellular lipase by *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnology Letters*, 25(17), 1403-1406. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1025049825720>. PMID:14514040.

- Diez, A. E. A., & Sandoval, L. M. C. (2012). Producción biotecnológica de lipasas microbianas, una alternativa sostenible para la utilización de residuos agroindustriales. *Vitae*, 19(3), 244-247.
- Domínguez, A., Costas, M., Longo, M. A., & Sanromán, A. (2003). A novel application of solid state culture: production of lipases by *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnology Letters*, 25(15), 1225-1229. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1025068205961>. PMID:14514071.
- Galibert, F., Alexandraki, D., Baur, A., Boles, E., Chalwatzis, N., Chuat, J. C., Coster, F., Cziepluch, C., De Haan, M., Domdey, H., Durand, P., Entian, K. D., Gatiús, M., Goffeau, A., Grivell, L. A., Hennemann, A., Herbert, C. J., Heumann, K., Hilger, F., Hollenberg, C. P., Huang, M. E., Jacq, C., Jauniaux, J. C., Katsoulou, C., & Karpfinger-Hartl, L. (1996). Complete nucleotide sequence of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome X. *The EMBO Journal*, 15(9), 2031-2049. <http://dx.doi.org/10.1002/j.1460-2075.1996.tb00557.x>. PMID:8641269.
- González-Hernández, J. C., Pérez, E., Damián, R. M., & Chávez-Parga, M. C. (2012). Isolation, molecular and fermentative characterization of a yeast used in ethanol production during Mezcal elaboration. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 11(3), 389-400.
- Groeneveld, P., Stouthamer, A. H., & Westerhoff, H. V. (2009). Super life: how and why "cell selection" leads to the fastest-growing eukaryote. *The FEBS Journal*, 276(1), 254-270. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06778.x>. PMID:19087200.
- Gurvitz, A., & Rottensteiner, H. (2006). The biochemistry of oleate induction: transcriptional upregulation and peroxisome proliferation. *Biochimica et Biophysica Acta: Molecular Cell Research*, 1763(12), 1392-1402. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.07.011>. PMID:16949166.
- Hasan, F., Shah, A. A., & Hameed, A. (2006). Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(2), 235-251. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.10.016>.
- Hsu, K.-H., Lee, G.-C., & Shaw, J.-F. (2008). Promoter analysis and differential expression of the *Candida rugosa* lipase gene family in response to culture conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(6), 1992-1998. <http://dx.doi.org/10.1021/jf073076o>. PMID:18290622.
- Ilmi, M., Hidayat, C., Hastuti, P., Heeres, H. J., & Van Der Maarel, M. J. E. C. (2017). Utilisation of *Jatropha* press cake as substrate in biomass and lipase production from *Aspergillus niger* 65I6 and *Rhizomucor miehei* CBS. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 9, 103-107. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbab.2016.12.004>.
- Jeong, H., Lee, D. H., Kim, S. H., Kim, H. J., Lee, K., Song, J. Y., Kim, B. K., Sung, B. H., Park, J. C., Sohn, J. H., Koo, H. M., & Kim, J. F. (2012). Genome sequence of the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* KCTC 17555. *Eukaryotic Cell*, 11(12), 1584-1585. <http://dx.doi.org/10.1128/EC.00260-12>.
- Kaushik, R., Saran, S., Isar, J., & Saxena, R. K. (2006). Statistical optimization of medium components and growth conditions by response surface methodology to enhance lipase production by *Aspergillus carneus*. *Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic*, 40(3-4), 121-126. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2006.02.019>.
- Kempka, A. P., Lipke, N. L., Pinheiro, T. L. F., Menoncin, S., Treichel, H., Freire, D. M. G., Di Luccio, M., & Oliveira, D. (2008). Response surface method to optimize the production and characterization of lipase from *Penicillium verrucosum* in solid-state fermentation. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 31(2), 119-125. <http://dx.doi.org/10.1007/s00449-007-0154-8>. PMID:17694331.
- Lane, M. M., & Morrissey, J. P. (2010). *Kluyveromyces marxianus*: a yeast emerging from its sister's shadow. *Fungal Biology Reviews*, 24(1-2), 17-26. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbr.2010.01.001>.
- Lane, M. M., Burke, N., Karreman, R., Wolfe, K. H., O'Byrne, C. P., & Morrissey, J. P. (2011). Physiological and metabolic diversity in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 100(4), 507-519. <http://dx.doi.org/10.1007/s10482-011-9606-x>. PMID:21674230.
- Lee, K. S., Kim, J. S., Heo, P., Yang, T. J., Sung, Y. J., Cheon, Y., Koo, H. M., Yu, B. J., Seo, J. H., Jin, Y. S., Park, J. C., & Kweon, D. H. (2013). Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* promoters for heterologous gene expression in *Kluyveromyces marxianus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(5), 2029-2041. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-012-4306-7>. PMID:22911091.
- Lertwattanasakul, N., Kosaka, T., Hosoyama, A., Suzuki, Y., Rodrussamee, N., Matsutani, M., Murata, M., Fujimoto, N., Suprayogi, Tsuchikane, K., Limtong, S., Fujita, N., & Yamada, M. (2015). Genetic basis of the highly efficient yeast *Kluyveromyces marxianus*: complete genome sequence and transcriptome analyses. *Biotechnology for Biofuels*, 8(1), 47. <http://dx.doi.org/10.1186/s13068-015-0227-x>. PMID:25834639.
- Liu, Z. Q., Zheng, X. B., Zhang, S. P., & Zheng, Y. G. (2012). Cloning, expression and characterization of a lipase gene from the *Candida antarctica* ZJB09193 and its application in biosynthesis of vitamin A esters. *Microbiological Research*, 167(8), 452-460. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2011.12.004>. PMID:22281522.
- Menoncin, S., Domingues, N. M., Freire, D. M. G., Toniazzi, G., Cansian, R. L., Oliveira, J. V., Di Luccio, M., de Oliveira, D., & Treichel, H. (2010). Study of the extraction, concentration, and partial characterization of lipases obtained from *Penicillium verrucosum* using solid-state fermentation of soybean bran. *Food and Bioprocess Technology*, 3(4), 537-544. <http://dx.doi.org/10.1007/s11947-008-0104-8>.
- Meunchan, M., Michely, S., Devillers, H., Nicaud, J. M., Marty, A., & Neuvéglise, C. (2015). Comprehensive analysis of a yeast lipase family in the *Yarrowia* clade. *PLoS One*, 10(11), 1-22. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0143096>. PMID:26580812.
- Morais, W. G., Kamimura, E. S., Ribeiro, E. J., Pessela, B. C., Cardoso, V. L., & Resende, M. M. (2016). Optimization of the production and characterization of lipase from *Candida rugosa* and *Geotrichum candidum* in soybean molasses by submerged fermentation. *Protein Expression and Purification*, 123, 26-34. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pep.2016.04.001>. PMID:27057641.
- Moreno, A. O., Dorantes, L., Galíndez, J., & Guzmán, R. I. (2003). Effect of different extraction methods on fatty acids, volatile compounds, and physical and chemical properties of avocado (*Persea americana* Mill.) oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(8), 2216-2221. <http://dx.doi.org/10.1021/jf0207934>. PMID:12670159.
- Oliveira, F., Souza, C. E., Peclat, V. R. O. L., Salgado, J. M., Ribeiro, B. D., Coelho, M. A. Z., Venâncio, A., & Belo, I. (2017). Optimization of lipase production by *Aspergillus ibericus* from oil cakes and its application in esterification reactions. *Food and Bioprocess Technology*, 102, 268-277. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2017.01.007>.
- Ortiz, M. A., Dorantes, A. L., Gallndez, M. J., & Cardenas, S. E. (2004). Effect of a novel oil extraction method on avocado (*Persea americana* Mill) pulp microstructure. *Plant Foods for Human Nutrition*, 59(1), 11-14. <http://dx.doi.org/10.1007/s11130-004-0032-3>. PMID:15675146.
- Pabline, R. M. B., Tatianne, F. D. O., Mrcio, C. G. L. C., & Manoel, S. S. J. (2014). Selection and optimization of extracellular lipase production using agro-industrial waste. *African Journal of Biotechnology*, 13(4), 566-573. <http://dx.doi.org/10.5897/AJB2013.13453>.
- Pacetti, D., Boselli, E., Lucci, P., & Frega, N. G. (2007). Simultaneous analysis of glycolipids and phospholipids molecular species in avocado (*Persea americana* Mill) fruit. *Journal of Chromatography. A*, 1150(1-2), 241-251. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2006.10.022>. PMID:17074356.

- Pencreac'h, G., & Baratti, J. (1996). Hydrolysis of p-nitrophenyl palmitate in n-heptane by the *Pseudomonas cepacia* lipase: a simple test for the determination of lipase activity in organic media. *Enzyme and Microbial Technology*, 18(6), 417-422. [http://dx.doi.org/10.1016/0141-0229\(95\)00120-4](http://dx.doi.org/10.1016/0141-0229(95)00120-4).
- Pérez, E., González-Hernández, J. C., Chávez-Parga, M. C., & Cortés-Penagos, C. (2013). Fermentative characterization of producers ethanol yeast from *Agave cupreata* juice in mezcals elaboration. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 12(3), 451-461.
- Salihu, A., Bala, M., & Alam, M. Z. (2016). Lipase production by *Aspergillus niger* using sheanut cake: an optimization study. *Journal of Taibah University for Science*, 10(6), 850-859. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtusci.2015.02.011>.
- Sathish-Yadav, K. N., Adsul, M. G., Bastawde, K. B., Jadhav, D. D., Thulasiram, H. V., & Gokhale, D. V. (2011). Differential induction, purification and characterization of cold active lipase from *Yarrowia lipolytica* NCIM 3639. *Bioresource Technology*, 102(22), 10663-10670. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.09.013>. PMID:21967715.
- Sharma, R., Chisti, Y., & Banerjee, U. C. (2001). Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances*, 19(8), 627-662. [http://dx.doi.org/10.1016/S0734-9750\(01\)00086-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0734-9750(01)00086-6). PMID:14550014.
- Singh, R., Gupta, N., Goswami, V. K., & Gupta, R. (2006). A simple activity staining protocol for lipases and esterases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 70(6), 679-682. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-005-0138-z>. PMID:16170531.
- Stergiou, P.-Y., Foukis, A., Sklivaniti, H., Zacharaki, P., Papagianni, M., & Papamichael, E. M. (2012). Experimental investigation and optimization of process variables affecting the production of extracellular lipase by *Kluyveromyces marxianus* IFO 0288. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 168(3), 672-680. <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-012-9808-3>. PMID:22843062.
- Treichel, H., de Oliveira, D., Mazutti, M., Di Luccio, M., & Oliveira, J. V. (2010). A review on microbial lipases production. *Food and Bioprocess Technology*, 3(2), 182-196. <http://dx.doi.org/10.1007/s11947-009-0202-2>.
- Vakhlu, J., & Kour, A. (2006). Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. *Electronic Journal of Biotechnology*, 9(1), 69-85. <http://dx.doi.org/10.2225/vol9-issue1-fulltext-9>.
- Xiaoyan, L., Yu, X., Lv, J., Xu, J., Xia, J., Wu, Z., Zhang, T., & Deng, Y. (2017). A cost-effective process for the coproduction of erythritol and lipase with *Yarrowia lipolytica* M53 from waste cooking oil. *Food and Bioprocess Technology*, 103, 86-94. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2017.03.002>.

# BIOINFORMATIC CHARACTERIZATION OF THE EXTRACELLULAR LIPASES FROM *Kluyveromyces marxianus*

**Running title: Bioinformatic characterization of the *Kluyveromyces marxianus* lipases**

Martínez-Corona Ricardo<sup>1,4</sup>, Vázquez Marrufo Gerardo<sup>2</sup>, Cortés Penagos Carlos<sup>1</sup>, Madrigal-Pérez Luis Alberto<sup>3</sup>, González-Hernández Juan Carlos<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup> Facultad de Químico Farmacobiología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Av. Lázaro Cárdenas 2707 Chapultepec Norte, Morelia, Michoacán, 58240, MEXICO. <sup>2</sup> Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Km 9.5 Carretera Morelia-Zinapécuaro, La Palma, Tarímbaro, Michoacán, 58262, MEXICO. <sup>3</sup> Laboratorio de Biotecnología Microbiana, Instituto Tecnológico Superior de Ciudad Hidalgo, Av. Ing. Carlos Rojas Gutiérrez #2120, Ciudad Hidalgo, Michoacán 61100, MÉXICO. <sup>4</sup> Laboratorio de Bioquímica, Instituto Tecnológico de Morelia, Av. Tecnológico 1500 Lomas de Santiaguito, Morelia, Michoacán, 58120, MÉXICO.

## \* Corresponding autor

Laboratorio de Bioquímica del Departamento de Ing. Química y Bioquímica del Instituto Tecnológico de Morelia, Av. Tecnológico # 1500, Colonia Lomas de Santiaguito, 58120, Morelia, Michoacán, México. Tel. (+52-433) 3121570. Ext. 231; Fax (+52-433) 3121570. Ext. 211; E-mail: [jcgonzal@itmorelia.edu.mx](mailto:jcgonzal@itmorelia.edu.mx)

**Keywords:** Bioinformatic tools, phylogeny, lipases, *Kluyveromyces marxianus*.

## Acknowledgments

Both **Martínez-Corona Ricardo** and **Vázquez Marrufo Gerardo** can be considered as the first author of this work. We also appreciate the participation of the “Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología” (CONACyT) through the financial support of the **scholarship 253782**. This study was partial funded by “**Tecnológico Nacional de México**” (grant numbers **5781.6-P**, **6131.17-P**, and **6525.18-P**) from **2016**, **2017** and **2018** “Convocatoria de Apoyo a Proyectos de Investigación Científica, Aplicada, Desarrollo Tecnológico e Innovación”.



## Abstract

Lipases are hydrolytic enzymes that break the ester bonds of triglycerides, generating free fatty acids and glycerol, or other intermediary molecules. Extracellular lipase activity has been reported for the non-conventional yeast *Kluyveromyces marxianus*, grown in olive oil as a substrate, and the presence of at least eight putative lipases has been detected in its genome. However, to date, there is no experimental evidence on the physiological role of the putative lipases, nor their structural and catalytic properties. In this study, a bioinformatic analysis of the genes of the putative lipases from *K. marxianus* L-2029 was performed, particularly identifying and characterizing the extracellular expected enzymes, due to their biotechnological relevance. The amino acid sequence of ten putative lipases, obtained by *in silico* translation, ranged between 389 and 773 amino acids. Two of the analyzed putative proteins showed a signal peptide, 25 and 33 amino acids long for *KmYJR107Wp* and *KmLIP3p*, and a molecular weight of 44.53 and 58.23 KDa, respectively. The amino acid alignment of *KmLIP3p* and *KmYJR107Wp* with the crystallized lipases from a patatin and the *YLLip2* lipase from *Yarrowia lipolytica*, respectively, revealed the presence of the hydrolase characteristic motifs. From the 3D models of putative extracellular *K. marxianus* L-2029 lipases, the conserved pentapeptide of each was determined, being GTSMG for *KmLIP3p*, and GHSLG for *KmYJR107Wp*; besides, the genes of these two enzymes (LIP3 and YJR107W) are apparently regulated by oleate response elements (ORE). The phylogenetic analysis of all *K. marxianus* lipases revealed evolutionary affinities with lipases from abH15.03, abH23.01, and abH23.02 families.

## 1. Introduction

Lipases are triacylglycerol ester hydrolases (E. C. 3.1.1.3) that are capable of hydrolyzing long chain acyl glycerol carboxylic esters, which distinguishes them from esterases [Casas-Godoy, Duquesne, Bordes, Sandoval, and Marty 2009]. Lipases are hydrolytic enzymes that catalyze a wide variety of reactions with high yields and using several substrates; in addition, they are structurally stable in organic solvents, no cofactor dependents and some of them show high enantioselectivity [Tan et al 2015]. Lipases have been used in several industrial and commercial applications, and they are considered the third most important group in sales volume, after proteases and amylases [Borrelli and Trono 2015].

Although the production and application of lipases by a great variety of microorganisms have been reported, their synthesis by yeasts is considered safe in comparison with the majority of bacterial origin.

*K. marxianus* is a homothallic, hemiascomycetous yeast, related to *Saccharomyces cerevisiae* [Lane et al. 2011], that have showed extracellular lipase activity. *K. marxianus* can assimilate lactose and metabolize it as a carbon source, so that it has been isolated from dairy products, such as fermented milk, yogurt or cheese. In addition, *K. marxianus* has desirable characteristics for several biotechnological applications: it can generate energy via either oxidative phosphorylation or alcoholic fermentation [Lane and Morrissey 2010], it has a rapid growth rate, with a low doubling time of approximately 70 minutes, it is thermotolerant (it grows up to 52° C), and has a high enzyme secretory capacity [Jeong et al. 2012; Lee et al. 2013; Lertwattanasakul et al. 2015].

The lipase activity of *K. marxianus* was first reported by Deive, Costas, and Longo [2003], which induced the lipase synthesis from the yeast using several substrates; oleic acid and tributyrin were detected as the best inducers in this study. Indeed, the extracellular enzymatic extract from *K. marxianus* showed stability at a temperature of 50° C and acidic pH, plus high stability in the presence of organic solvents. In this regard, Stergiou et al. [2012] studied the influence of temperature and pH on the synthesis of extracellular lipases, determining an initial optimum pH of 6.5, and optimal temperature of 35° C, using olive oil as a substrate.

Despite knowing lipase activity by the non-conventional *K. marxianus* from the characterization of the extracellular extract in the aforementioned studies, there is a lack of information about the lipases that this yeast synthesizes and their biochemical characteristics. Moreover, it is relevant to determine the features of the putative extracellular lipases produced by *K. marxianus*, due to the advantages that its production maintains over intracellular enzymes. Lertwattanasakul et al. [2015] sequenced the genome of the strain *K. marxianus* DMKU3-1042 and carried out the transcriptional analysis by initiation site seq (TSS); this search allowed them to recognize some characteristics of the yeast related to its thermotolerance, large capacity of bioconversion and production of recombinant proteins.

Taking as reference the information obtained from the transcriptome of the strain *K. marxianus* DMKU3-1042, the objective of the present work was to analyze the sequence of the genes that code for putative lipases, in order to determine their characteristics, properties, and phylogeny. For this purpose, different bioinformatic tools were used, and the analysis was then focused in the putative extracellular enzymes of the strain *K. marxianus* L-2029, which were used for the recognition of regulatory elements and the prediction of their probable 3D models.

## **2. Materials and methods**

### **2.1 Strain**

The strain used in the study, *K. marxianus* L-2029, was obtained from the Biochemistry Laboratory of the Instituto Tecnológico de Morelia (Morelia, Michoacán, México). The strain *K. marxianus* was deposited in the National Collection of Microbial Strains and Cultures (CDBB) from CINVESTAV with registration number L-2029. For the maintenance, growth of the strain, and their DNA isolation, YPD (20 g/L glucose, 10 g/L peptone, 10 g/L yeast extract, 20 g/L agar) culture medium was used.

## 2.2 Identification of the putative lipases on reference strain

The amino acid sequences from ten putative *K. marxianus* DMKU3-1042 lipases, were obtained from the National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) GenBank database. Well studied lipases, most of them crystallized, were used as a query for the recognition of lipase sequences in *K. marxianus*: *Lip2* (1GZ7) from *Candida rugosa*, *LIPA* (KEY81886) from *Aspergillus fumigatus*, *YLip1* (Q99156) and *YLip2* (3O0DD) from *Yarrowia lipolytica*, *LipB* (ABG73614) from *Aspergillus niger*, *RML* (3TGL) from *Rhizomucor miehei* and, *Tgl2p* (AJU99864), *Tgl3p* (AJS99689), *Tgl4p* (AJS53282) and *Yju3p* (4ZWN\_D) from *S. cerevisiae*. From each putative enzyme detected, a Conserved Domain (CD) search was made for the recognition of Abhydrolase superfamily; enzymes with no esterase or lipase domains and redundant sequences were discarded. Additionally, a search was carried out using the Protein database for the *K. marxianus* DMKU3-1042; since the transcriptome from this strain was reported [Lertwattanasakul et al. 2015], RefSeq as a database source was used, filtering for fungi species and specifying the enzyme type: hydrolase. A total of 10 putative lipases encoded in the genome of *K. marxianus* DMKU-1042 were identified, which accession numbers are: BAO41717 (*KmYJR107Wp*), BAO39800 (*KmATG15p*), BAO41305 (*KmROG1p*), BAO40608 (*KmYDR444Wp*), BAO39555 (*KmYOR059Cp*), BAO37746 (*KmLIP2p*), BAO38130 (*KmLIP3p*), BAO38024 (*KmLIP5p*), XP\_022677485 (*KLMA\_60413p*) and XP\_022677487 (*KLMA\_60415p*).

## 2.3 Characterization of the deduced amino acid sequences

Molecular weights and isoelectric points (pI) were calculated in ExPASy [Gasteiger et al. 2005] Compute pI/Mw Tool ([http://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/)). The putative N-glycosylation sites (Asn-Xxx-Ser-Thr) were established with the NetNGlyc V1.0 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>). The presence of signal peptide was detected with the bioinformatic tools: Signal P [Petersen, Brunak, von Heijne, and Nielsen 2011] and PrediSi (<http://www.predisi.de/home.html>). To predict structural characteristics such as feasible active site, oxyanion hole, substrate binding site, as well as class, superfamily, and homologous family, of the *K.*

*marxianus* lipases, a comparative Blast analysis was performed on the LED platform (Lipase Engineering Database: <http://www.led.uni-stuttgart.de>, [Widmann, Juhl, and Pleiss 2010]).

## 2.4 Phylogenetic analysis

The lipase selection for the construction of the phylogenetic tree was made based on three criteria: (1) lipases used as a query for the recognition of putative lipases in *K. marxianus*; (2) lipases with the highest identity determined by NCBI Standard Protein Blast (BlastP) analysis of each putative lipase from *K. marxianus*; (3) other representative lipases from the three classes and different families, according to the LED database. The accession numbers of the selected lipases are shown in Table 1. Using the selected sequences and the putative lipases from *K. marxianus* DMKU3-1042, a multiple sequence alignment was performed using MAFFT [Katoh and Standley 2013]; the iterative refinement method with local pairwise alignment information (L-INS-i) was used, which is recommended for <200 sequences with one conserved domain and long gaps, since it combines the WPS score and the COFFEE-like score to evaluate the consistency between a multiple alignment and pairwise alignments [Katoh, Kuma, Toh and Miyata 2005].

To determine the model most appropriate for amino acid substitution, Prottest 3.0 was used [Darriba, Taboada, Doallo and Posada, 2011]. The best model according to Akaike information criterion (AIC) was WAG+G+F [Whelan and Goldman, 2001] at a confidence interval of 100.0.

The multiple sequence alignment was used for maximum parsimony (MP) analysis to infer phylogenetic relationships and, separately, for Bayesian inference (BI) with the same purpose. The model most appropriate for amino acid substitution was used for each analysis.

Parsimony analyses were performed in PAUP 4.0a150 [Swofford 2002] using a heuristic search with a TBR exchange branch option excluding gaps and non-informative characters. Node support was determined for bootstrap values with 1000 replicates.

Bayesian inference (BI), on the other side, was conducted in MrBayes 3.2 [Ronquist et al. 2012]. Four MCMC chains were run simultaneously starting from random trees for 10,000,000 generations. Trees were sampled every 1,000th generation for a total of 10,000 trees. The first 2,500 trees were discarded as the burn-in phase of each analysis. Posterior probabilities were determined from a majority-rule consensus tree generated with the remaining 7,500 trees.

Because no incongruences were observed between the MP and BI resulting trees, the different matrices were combined for the final phylogenetic tree. The resulting tree was rooted using the midpoint method. The phylogenetic tree was edited and visualized with FigTree.

## 2.5 Primers design and PCR amplification

To sequence both the nucleotide sequence from the genes coding for extracellular putative lipases and their 1 kb upstream promoter region from *K. marxianus* L-2029, primers were designed using the nucleotide sequences extracted from *K. marxianus* DMKU3-1042 reference genome. The nucleotide sequences of the LIP3 and YJR107W genes were divided into 4 and 3 fragments, respectively. The oligonucleotide pair from each amplicon for the LIP3 gene were (1) L31: CTCATAGGTATGGCTGTACGTC and AAACATCACAGTCATGTGAC-ATAC (1087 bp/regulatory region), (2) L32: TATTTCTGAACATGTTTCCCACAC and TCTCCACCACCTTATCGAGA (997 bp/regulatory region and gene), (3) L33: AAAAGGCGAGTCTAGTGGAC and TACGATAAAGTTGTTTACGTTGAAGAG (1049 bp/gene), and (4) L34: AACAAGAACATCTGTCCCACG and TAAGGCCTCTCGACAC-TGGTAA (1001 bp/gene). The primers designed for the amplification of the YJR107W gene were (1) LYJ1: GTTAAAGCTAAAATCTAATCATATGGAATG and CAAGGGTTGAGTTAGT-GTTGGTT (1010 bp/gene), (2) LYJ2: CCACTCTCCACTAGCTTATCATAG and GGTA-TTGGACTAAGTTCTTTAATAGCAA (1084 bp/regulatory region and gene), and (3) LYJ3: ACTTGATCCAACTACTAGATGAAAT and GAATAATGAACAGTATATTC-TATCTGCTC (988 bp/regulatory region).

The *K. marxianus* L-2029 genomic DNA, used as a template for the PCR amplification reactions, was obtained by mechanical lysis using glass beads [Sambrook and Russell 2001]. For this purpose, 50 mL of YPD medium was inoculated and then incubated under agitation for 6 h, at 30 °C. Later, the biomass was recovered from the culture medium, washed and mixed with 200 µL of TSNTE solution (Triton X-100 2 %, SDS 10 %, NaCl 500 mM, Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM), 200 µL of phenol:chloroform:isoamyl alcohol mixture and sterile glass beads. The mix was vortexed for 1 min and allowed to stand in ice 1 min, 3 cycles; 200 µL of TAE 1X (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM) was then added and the solution was centrifuged for 5 min at 13,000 rpm. The supernatant, containing the genomic DNA, was transferred to new sterile tubes, and then 1 mL of absolute alcohol (at -20 C) was added and mixed thoroughly by inversion. After centrifugation, the pellet was washed 3 times with 70 % ethanol. Finally, 3 µL of RNAase A was added and the DNA genomic solution was incubated at 37 °C for 5 min.

The PCR amplification reactions were performed in a total volume of 50 µL, using the following reaction mixture: 10 mM buffer Tris-HCl pH 8.0, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM of each dNTP, 1 µM of each oligonucleotide, 0.05 U of recombinant *Taq* polymerase (Invitrogen, USA) and 20 ng/µL DNA; the final volume was adjusted with sterile deionized distilled water. For the amplification of the

fragments listed below, the PCR reactions were performed in a temperature gradient (from 50° to 60° C), in order to determine the optimum alignment temperature of each pair of primers. The PCR reactions were carried out in a BIORAD T100™ thermocycler using the following amplification protocol: initial denaturalization at 95 °C for 3 min, 40 cycles of denaturation at 95° C for 30 s, alignment for 30 s, polymerase extension at 72 °C (1 kb/min), and a final extension of 10 min at 72 °C. The PCR products were analyzed by electrophoresis on 2 % agarose gels, stained with ethidium bromide.

## **2.6 Sequencing of the LIP3 and YJR107W genes**

Elim Biopharm (Hayward, CA, USA) sequenced the amplified fragments. The nucleotide sequences of the promoter region and gene from both putative extracellular lipases of *K. marxianus* L-2029 were constructed from the sequenced PCR fragments and deposited in the NCBI database, which accession numbers are: MH512931 for the LIP3 gene and, MH512932 for the YJR107W gene.

## **2.7 Characterization of the regulatory region of the genes coding for putative extracellular lipases**

The 1 kb upstream sequence of the putative extracellular lipases from *K. marxianus* L-2029 were analyzed with the PROMO package [Messeguer et al. 2002; Farré et al. 2003] to identify the presence of regulatory *cis* elements. The Gene Promoter Miner (<http://gpminer.mbc.nctu.edu.tw>) platform was used to determine probable promoter element localization sites.

## **2.8 3D modeling of extracellular lipases**

The modeling of the three-dimensional structure of the putative extracellular lipases from *K. marxianus* reference strain (DMKU3-1042) and wild-type strain (L-2029) was carried out using the SwissModel [Biasini et al. 2014; Bertoni, Kiefer, Biasini, Bordoli, and Schwede 2017; Bienert et al. 2017], RaptorX [Peng and Xu 2012; Källberg et al. 2012; Ma, Wang, Zhao, and Xu 2013] and Phyre2 [Kelley, Mezulis, Yates, Wass, and Sternberg 2015] tools. The template identification was performed using the Template Identification tool ([http://swissmodel.expasy.org/workspace/index.php?func=tools\\_targetidentification1](http://swissmodel.expasy.org/workspace/index.php?func=tools_targetidentification1)) from Swiss Model. The generated models were evaluated with the quality parameters of each tool and then the best 3D structures were validated by superposition with the template used for their construction, using the SuperPose 1.0 [Maiti, Van Domselaar, Zhang, and Wishart 2004] server. For the evaluation of

the conformation of the amino acids in the 3D models and the creation of the images presented in this work, the DeepView Swiss-PDB viewer V4.1 (<http://spdbv.vital-it.ch/>) was used.

ENDscript 2.0 and ESPript 3.0 [Robert and Gouet 2014] were used for the alignment of the secondary structure of the best models obtained for both extracellular lipases with the lipases used as templates for their generation. The domains present in the putative *KmLIP3p* and *KmYJR107Wp* lipases were detected using the ProDom [Servant et al. 2002] tool by Blastp and multiple alignments in the NCBI database; in addition, the PSIPRED v3.3 and DomPred (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk>) tools were used for the comparison and detection of domains of the mentioned lipases with respect to those selected as templates for the construction of their models.

### 3. RESULTS

#### 3.1 General characteristics of the putative lipases

From the screening made in the NCBI database using relevant lipases as a query, ten putative lipases were detected in the genome of the yeast *K. marxianus* DMKU3-1042 [Lertwattanasakul et al. 2015]; the Conserved Domain (CD) analysis for each putative lipase corroborated the presence of the ten potentially amino acid sequences reported as lipases (and some cases esterases) in said yeast. The amino acids sequences length of the putative lipases ranged from 389 to 773 amino acids. The genes coding for the lipases from *K. marxianus* are distributed in four of the eight chromosomes of the yeast. In this way, the coding genes of the *KmLIP2p*, *KmLIP3p*, and *KmLIP5p* lipases are located on chromosome 1; the ATG15 and YOR059C genes are positioned in chromosome 3, while the YDR444W gene is located on chromosome 4. Finally, the genetic information for the putative *KmYJR107Wp* and *KmROG1p* lipases is situated on chromosome 6; the *KLMA\_60413p* and *KLMA\_60415p* putative hydrolases are also located on the same chromosome.

The amino acid sequences of the ten putative lipases from *K. marxianus* DMKU3-1042 were used to predict some characteristics of the enzymes. Employing a Blast analysis, performed on the LED platform, it was possible to determine the class of each putative lipase, and in some cases, the superfamily and homologous family to which they belong, as can be seen in Table II. The Blast analysis predicted that the putative *KmYJR107Wp* and *KmATG15p* lipases belong to abH23 superfamily; this family includes enzymes, mainly filamentous fungal lipases of the *Saccharomyces* and *Rhizomucor miehei* type, respectively; the putative *KmYDR444Wp* hydrolase, on the other hand, was located in the abH20 superfamily, referring to lipoprotein lipases, while *KmLIP2p* was located in the *Burkholderia* lipases, *Saccharomyces* type.

In order to recognize the existence of extracellular enzymes from the *K. marxianus* lipases, PrediSi and SignalP tools were used, which helped to identify only two lipases with a high probability of being extracellular: *KmLIP3p* and *KmYJR107Wp*. Therefore, these putative extracellular lipases from *K. marxianus* were selected for subsequent regulation analysis and prediction of their three-dimensional structure.

### 3.2 Phylogeny of the *K. marxianus* lipases

Relevant lipases from different fungi and yeasts, representing different families of the GX, GXXX and Y classes, according to the LED classification, were selected for the construction of the phylogenetic tree (Fig. 1), including the ten putative lipases from *K. marxianus* DMKU3-1042. We included crystallized lipases and proteins with a high percentage of identity to the lipases of *K. marxianus* (Table I), from the Blastp analysis on the GenBank database.

It is evident the low evolutionary relationship between fungal lipases of the GGGX and Y class, as well as the wide abundance of lipases of the GX class, since the generated phylogenetic tree is divided into two clades: in the first one (upper part, Fig. 1), the lipases of the GGGX class are located, whose main representative is the lipase *Lip2* of *C. rugosa* (code name *CRLip2*), which has been extensively studied and whose structure has been obtained by crystallization [Grochulski, Li, Schrag and Cygler, 1994]. Three orthologs of this lipase were found in *K. marxianus*: *KLMA\_60413p*, *KLMA\_60415p* and *KmATG15p*. Apparently, the enzymes *KLMA\_60413p* and *KLMA\_60415p* belong to the GGGX class, which should be tested experimentally on the structure of said hydrolases.

In the second group within this clade, extracellular lipases from different fungi and yeasts were grouped, where the structure, function and applications of the *YLip2* lipase of *Y. lipolytica* has been extensively studied [Fickers, Marty and Nicaud, 2011]; RML extracellular lipase, from *R. miehei*, was the first crystallized lipase and in which the conserved pentapeptide GX<sub>1</sub>SX<sub>2</sub>G found in all enzymes of this type was first recognized [Brady et al., 1990]. Interestingly, two of the orthologs found in *K. marxianus* from these lipases were those where the presence of signal peptide was predicted, corresponding therefore to extracellular putative lipases: *KmYJR107Wp* and *KmLIP3p*. In addition, a direct relationship of the putative lipase *KmLIP3* with the putative enzyme *KmLIP5* is observed.

In the second clade observed in the phylogenetic tree, lipases of class GX and a grouping of lipases of class Y are positioned. Four putative lipases from *K. marxianus* are situated in this clade; the *KmLip2p*, *KmROG1p*, *KmYDR444Wp* and *KmYOR059Cp* putative lipases are positioned with their respective homologs from *S. cerevisiae*.



### 3.3 Transcriptional regulation motifs of the extracellular lipases from *K. marxianus* L-2029

It was of our interest to recognize the differences between the sequences of the extracellular lipases of the *K. marxianus* L-2029 strain and the reference *K. marxianus* DMKU3-1042 strain; in turn, it was important to determine the presence of probable regulatory elements in the promoter of the genes coding for the putative lipases. Thus, both genes and their promoter region were amplified by PCR and sequenced.

Comparing the nucleotide sequence deduced for the LIP3 lipase gene from *K. marxianus* L-2029 and the nucleotide sequence from the reference strain, an identity percentage of 99 % was obtained with no deletions. Also, the translated amino acid sequence compared to the reference, showed again an identity of 99 %, with only a difference on the second amino acid residue. This would not affect the structure and conformation of the protein since this modification is located on the peptide signal of the putative extracellular enzyme. An identity of 99% was also determined for the YJR107W lipase gene in respect to the reference sequence. A difference in the amino acid sequence of the translated sequence was found in residue 185, where a glutamine is changed for an asparagine residue (Figure 2).

Many motifs related to the regulation of genes in yeasts, such as TAF, FACB, RC2, ABF1, MAC1, SUT1, TBP, were found (and even some related to metabolism, as GAL4) in the LIP3 gene promoter, resulting from the PROMO software analysis. Most of these motifs were also found in the promoter region of YJR107W, and some other prominent ones, such as ADR1. Among the response elements of the ADR1 type, two of them have been reported to play an essential role in the degradation of fatty acids and in the peroxisome proliferation in *S. cerevisiae* [Gurvitz and Rottensteiner 2006], so they could have an important role during the induction of lipase synthesis in the presence of triacylglycerols as sole carbon source in some yeasts. The two elements that act synergistically on transcriptional activation are the upstream activation sequence (UAS1) and the oleate response element (ORE).

Several TATA box sequences were detected in the promoter region of the LIP3 gene from *K. marxianus* L-2029, and two of them were really close to the start codon (Fig. 2A); in addition, two CAAT boxes and a GC box sequence were located upstream from such elements. On the other hand, in the promoter of the YJR107W gene, up to four probable TATA boxes and two CAAT boxes were identified within the first 200 pb upstream from the start codon. In both cases, binding sequences for TBP's were predicted.

### 3.4 Modeling of the extracellular lipases from *K. marxianus* L-2029

The putative lipases from *K. marxianus* that presented a signal peptide were chosen for their modeling. Therefore, for the tridimensional structure prediction of the *KmLIP3p* and *KmYJR107Wp* lipases, three bioinformatic tools were used: SwissModel, RaptorX and Phyre2.

In the model generated for the *KmLIP3p* lipase with the Phyre2 tool (Fig. 3A), a patatin-type protein, derived from the *P. aeruginosa* ExoU transport protein, was used as a template. The software performed a complete evaluation of the generated structure, determining the overall quality of the model, with the ProQ2 tool [Ray, Lindahl, and Orn Wallner 2012], the clashes between the generated structure residues, the ideally not rotated rotamers, the confidence of alignment (Hhsearch), the disorder in the structure (Disopred) and a Ramachandran analysis of the phi/psi angles of the structure. Good parameters were obtained for the generated model in each of the aforementioned factors. The best model obtain for the *KmYJR107Wp* lipase was the one generated with the Phyre2 tool (Fig. 4A); the template used for the modeling of *KmYJR107Wp* was the *YLip2p* lipase from *Y. lipolytica*.

To verify the stability of the generated models in the Phyre2 software for both putative extracellular lipases, they were superposed with the templates used for the construction of the same, using the SuperPose software [Maiti, Van Domselaar, Zhang, and Wishart 2004]. To evaluate the similarity between the tridimensional models from *K. marxianus* and their templates, we used the mean square deviation (RMSD) between pairs of  $\alpha$  carbon atom, calculated after the optimal superposition of the two structures [Carugo 2007]. For the *KmLIP3p* model, the RMSD value obtained was 4.97, so there is no apparent similarity between the model and the reference template [Maiorov and Crippen 1994]. On the other hand, the RMSD obtained for the *KmYJR107Wp* lipase value was 0.96, which supposes a high similarity between the generated model and the crystallized lipase used as a template.

To obtain more information about the properties of the putative extracellular lipase models from *K. marxianus*, the secondary structures were aligned with the templates used for their construction (Fig. 5) and the identification of amino acid residues important for the structure of the models was made (Fig. 3B and 4B).

The *KmLIP3p* amino acid sequence analysis with the bioinformatic ProDom tool, allowed the recognition of 15 domains, all of them belonging to hydrolase enzymes from patatin phospholipase type. In the secondary structure alignment of the model generated for *KmLIP3p* with the hydrolase patatin enzyme (Fig. 5A), 9 domains were recognized using PSIPRED, all of them also belong to hydrolytic enzymes (data not shown). The structure of the *KmLIP3p* lipase model maintains the conventional  $\alpha/\beta$  fold of this type of enzymes [Jaeger, Dijkstra, and Reetz 1999]. The conserved pentapeptide detected for the *KmLIP3p* sequence, where the catalytic serine (S207) is located, has the

GTSMG sequence, which does not match with any family of fungal and yeast lipases reported in the LED database, but it is phylogenetically close to that of the abH23 family (filamentous fungal lipases), GX class (Gupta et al. 2015). The little information on the structure of the reference patatin lipase did not allow us to determine the location of the other two catalytic triad residues, and it was only possible to deduce one of the residues of the oxyanion hole and part of the conserved pentapeptide, which is a methionine residue (M208).

The PyMOL software allowed us to recognize the amino acid residues around the catalytic serine of the predicted model for the *KmLIP3p* lipase. However, no interaction of this amino acid was observed with any histidine residue in the structure (Fig. 3B), which would be part of the catalytic triad; it is likely that the putative protein encoded by the *LIP3* gene is not actually a lipase and may have some other activity. As mentioned above, we have recognized that the only enzyme responsible for the lipase activity of *K. marxianus* L-2029 is the *KmYJR107Wp* lipase [Martínez-Corona et al., Unpublished results].

As expected, the *KmLIP3p* secondary structure is highly hydrophobic, which can be related to the phenomenon of interfacial activation [Casas-Godoy, Duquesne, Bordes, Sandoval, and Marty 2009]. The position of potential disulfide bridge sites was not recognized in this structure.

Hydrolase domains were also recognized in the amino acid sequence of the *KmYJR107Wp* lipase; DomPred predicted 13 domain sequences, while the alignment of the secondary structure (Fig. 5B) of the predicted *KmYJR107Wp* model, with the *YLip2p* lipase from *Y. lipolytica* determined the presence of 9 hydrolase domains (data not shown). The folding of the *KmYJR107Wp* lipase is  $\alpha/\beta$ , composed of approximately 7  $\alpha$ -helices and 12  $\beta$ -sheets. The conserved pentapeptide is located from residue 202 to 206, of the GHSLG sequence, so the nucleophilic serine is at position 204. The aspartate residue, at position 276, and the histidine residue, at position 339, complete the catalytic triad. The pentapeptide sequence is characteristic of the abH23.02 family (lipases of the *Saccharomyces* type), which agrees with the phylogenetic analysis and confirms the high relation of this enzyme with lipases belonging to said family [Gupta et al. 2015]. There is a difference between one of the residues of the oxyanion hole, which is a threonine residue in position 121 in the reference lipase, and a serine in the 133 position in the *KmYJR107Wp* model; however, the polar character of both residues is maintained. The other oxyanion hole residue, previously mentioned in the pentapeptide, is a leucine residue at position 205. As determined for the *KmLIP3p* model, the surface of *KmYJR107Wp* appears to be highly hydrophobic, and two potential positions of disulfide bridge formation were recognized, which are shown in Fig. 5B. The folding of the catalytic triad and the oxyanion hole, as well as their interaction within the catalytic site are shown in Fig. 4B.

Experimental studies currently carried out by the working group will allow us to verify the characteristics and properties described here from the bioinformatics analysis of the lipases from *K. marxianus* L-2029.

## DISCUSSION

Homologous proteins of the putative lipases found in the GenBank database for *K. marxianus* DMKU3-1042 have been previously described in other yeasts. Thus, there is evidence of the existence of the putative extracellular lipase *YJR107Wp* in *S. cerevisiae*, named *Lih1* [Galibert et al. 1996], which is homologous to the putative extracellular *KmYJR107Wp* lipase from *K. marxianus*, sharing an identity of 90 %; besides, both lipases have a 26 % identity and a 44 % similarity with its orthologue *YLip2p* enzyme from *Y. lipolytica*, which suggests that all three lipases could be derived from a common ancestor. In fact, the *YLip2p* lipase from *Y. lipolytica* belongs to the so called *LIP* family, which has been reported is constituted by 61 members of which 4 are pseudogenes in species from *Yarrowia*; in addition, *YLip2p* homologues have been identified in filamentous ascomycetes, such as *R. miehei* (RML lipase) and the mentioned above *Lih1* [Meunchan, Michely, Devillers, Nicaud, Marty, and Neuvéglise, 2015]. The *YLip2p* lipase from *Y. lipolytica*, is an extracellular enzyme whose catalytic serine is located at position 162 of the GHSLG sequence; the other catalytic residues are complemented by Asp230 and His289; post-translational modifications have been identified in the crystallized protein: 4 disulfide bridges and two glycosylation sites. The optimum temperature of this lipase is between 37 and 40 ° C, and the optimum pH range between 6 and 7.5; it catalyzes the hydrolysis of long chain fatty acids and is stereoselective [Fickers et al, 2011].

According with Meunchan et al. [2015] the *YLip2p* lipase family is highly dynamic with an evolutionary scenario with more duplications than losses. Although the identity of the lipases belonging to this family range from 20 to 60 %, their activity and properties are well conserved. It is clear the relationship that exists between the *YLip2p* lipase and the *KmYJR107Wp* putative lipase, since, in addition to its phylogenetic relationship, the three-dimensional model generated for the extracellular putative lipase from *K. marxianus* was generated using the lipase from *Y. lipolytica* as template.

It has been also recognized the synthesis of the ATG15 lipase by *S. cerevisiae* and the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* [Sun et al, 2013], homologous to putative *KmATG15p* lipase from *K. marxianus*, which belongs to the Atg group; these are a series of proteins associated to the autophagosome formation and to the autophagy process [Mizushima, Yoshimori, and Ohsumi 2011]. Another putative lipase from *K. marxianus* homologous recognized in *S. cerevisiae* is *KmROG1p*,

which has been suggested to be a monoacylglycerol lipase that participates in lipid homeostasis [Varthini, Selvaraju, Srinivasan, and Nachiappan 2015]. The UniProt database ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)) reports a high similarity in the ROG1 sequence with YDR444W, although no specific reports of the latter were found. Athenstaedt and Daum (2005) detected some polypeptides containing the lipase active site motif in the *S. cerevisiae* genome, including the YDR444W sequence. These authors detected the presence of polypeptides that contain the lipase representative motif with activity related to lipid particles in this yeast, including the YOR059C lipase; this latter enzyme has been described as a phospholipase in *S. cerevisiae*, related to the morphology of lipid particles, being renamed as LPL1 [Selvaraju, Rajakumar, and Nachiappan 2014].

The lipases identified as LIP from *K. marxianus* (*KmLIP2p*, *KmLIP3p* and *KmLIP5p*), the Blastp analysis (Table I) revealed high identity with intracellular lipases from *S. cerevisiae*, specifically with those of the TGL group, which participates in the lipid metabolism for the sphingolipids and phospholipids release, that are subsequently used for energy production [Rajakumari, Rajasekharan, and Daum 2010]. In the case of the putative *KmLIP2p* lipase, the greatest similarity was found with the *Tgl2p* lipase, which participates in the long-chain fatty acids hydrolysis in the yeast mitochondria [Ham, Rho, Shin, and Yoon 2010]. Although a peptide signal was recognized on the nucleotide sequence of the putative extracellular *KmLIP3p* lipase, it shares the highest identity percentage with the *Tgl3p* enzyme from *S. cerevisiae*, an intracellular lipase which activity is restricted to lipid particles used as an energy reserve [Schmidt, Athenstaedt, Koch, Ploier, and Daum 2013]; finally, the putative *KmLIP5p* lipase has a high similarity to the TGL4 and TGL5 proteins, with analogous activity to the aforementioned lipases.

One of the most representative structural characteristics of lipases is the presence of an oxyanion hole, responsible for stabilizing the catalytic site during the hydrolysis of acylglycerols. The oxyanion hole is composed of two residues, one related to the nucleophilic residue of the catalytic triad, while the other residue has a variable position, which determines the classification of lipases into three classes: GX, GGGX, and Y [Fischer and Pleiss 2003].

The constructed phylogenetic tree seems to be divided into two large clades: in the first of them (lower part, Fig. 1) are located lipases from the GX and Y classes. In this class, the X residue that makes up the oxyanion hole is always a tyrosine residue, in a very similar structure to the GX class [Pleiss et al., 2000]. In contrast, in the second clade, lipases from GX class related to the GGGX class (upper part) are positioned. In GGGX class, the oxyanion hole is displaced one position on C-terminal, concerning the structure of the GX class, and the conserved glycine is preceding a hydrophobic X residue [Borrelli and Trono 2015]. The division into two main clades of the constructed phylogenetic

tree for fungi and yeast lipases coincides with that observed by Gupta et al. (2015), which presented a phylogenetic tree from exclusively yeasts and filamentous fungi organisms, using the MEGA (v6) tool.

No homologous lipases were determined for the putative *KLMA\_60413p* and *KLMA\_60415p* lipases by BlastP search, nor in GenBank database neither LED database. However, we determined that they belong to GGGX, since they are related to their well-studied orthologue *CRLip2* lipase from *C. rugosa*; in fact, both of these enzymes are the only hydrolyses recognized in this analyses that belong to the GGGX class. In order to obtain more information about these two putative enzymes, we made a Conserved Domains search, which reveals that both hydrolases belong to carboxyl esterase/lipase family protein, that participates in intracellular lipid transport and metabolism. In addition, they share an identity of 94 %, so we conclude they are isoforms. The synthesis of lipase isoforms has been detected in above mentioned CRL lipase from *C. rugosa*, which in reality is a mix of *CRLip1*, *CrLip2* and *CRLip3* lipases [Lotti et al, 1998].

In the second larger clade we determined the location of the putative *KmLIP3p* lipase, apparently extracellular, and the *KmLIP5p* lipase from *K. marxianus*. There is a relationship between these two lipases, since both of them are located on chromosome 1 of the *K. marxianus* genome. They share a 26 % identity from their sequence alignment; however, the fact that these two proteins emerged from paralog genes cannot be rejected. Despite their high closeness with the TGL proteins of *S. cerevisiae*, it was not possible to recognize the probable family to which these enzymes are associated with, according to the LED classification. However, a Conserved Domains search reveals that the *KmLIP5p*, belongs to the Pat\_TGL4-5\_like protein family, which are triacyl glycerol lipases that are involved in the triacyl glycerol mobilization and degradation; in turn, the putative extracellular *KmLIP3p* lipase, belongs to the Patatin\_and\_Cpla2 super family, where the principal representants are patatins and phospholipases, which can catalyze the cleavage of fatty acids from membrane lipids. In relation to the regulatory elements in the promoter regions of the extracellular lipases from *K. marxianus* L-2029, we recognize the presence of ADR1 elements. In *S. cerevisiae* the majority of the genes whose transcription is activated in the presence of oleic acid are under the regulation of the palindromic ORE sequence, which is made-up for two CGG triplets spaced by 15 to 18 nucleotides (5'-CGGN3TNAN9-12CCG-3'); the ORE sequence is recognized by the transcription Pip2p-Oaf1 factor and is subjected to catabolic repression [Gurvitz and Rottensteiner 2006]. The ORE and UAS1 motifs have also been described in the *C. rugosa* *CRLip3*, *CRLip4* and *CRLip5* lipases, which are strongly induced in the presence of oleic acid [Hsu, Lee, and Shaw 2008]. In addition, oleic acid has

been documented as a strong inducer of lipase activity in *K. marxianus* [Deive, Costas, and Longo 2003; Stergiou et al. 2012].

The existence of such regulatory elements was detected in the promoter region of the *KmLIP3p* and *KmYJR107Wp* lipases (Fig. 2A and 2B, respectively). In the case of *KmLIP3p*, the presence of three probable regions, very similar to the canonical ORE sequence was identified, but no similar sequences to the UAS1 element were found (Fig. 2A). However, the presence of the UAS1 element is not essential for the regulation of lipases encoding genes via oleate [Hsu, Lee, and Shaw 2008]. On the other hand, in the promoter region of the YJR107W gene, the presence of 2 sequences of the ORE type and one of the UAS1 type was recognized; in particular, the ORE sequence located approximately 1060 bp upstream could be associated with the UAS1 sequence found 708 bp upstream (Fig. 2B). Therefore, both extracellular lipase genes could be regulated by these elements, in the presence of long-chain fatty acids.

As a part of the comprehensive study of the extracellular lipases of *K. marxianus* L-2029, their synthesis has been induced with avocado oil [Martínez-Corona et al., unpublished results]. Oleic acid is the main fatty acid present in avocado oil, with a concentration above 60 % [Pacetti, Boselli, Lucci, and Frega 2007]. In this work, a 3.5% v/v avocado oil concentration in the culture medium was detected to significantly promote the extracellular lipase activity of *K. marxianus* L-2029, showing a maximum activity of 4.69 U / mL, after 8 h of fermentation. In addition, in the extracellular extract derived from said induction, the presence of a protein with an approximate molecular size of 45 KDa was detected by SDS-PAGE, which is similar to that predicted for the extracellular lipase *KmYJR107Wp*. These experimental results show that oleate is a strong inductor of lipases in *K. marxianus*, and the mechanism of regulation is under the elements ORE and UAS1.

Besides, the canonical transcription TATA and CAAT sequences were also determined in the promoter region of both genes, which have been found preceding well-studied lipase genes, such as those belonging to *C. rugosa* [Benjamin and Pandey 1998]. The TATA box is one of the most used elements for the assembly of the transcription machinery in yeast promoters; about 19 % of the *S. cerevisiae* genes possess these sequences, which are approximately at a distance of 25 to 200 bp upstream from the start codon. These sequences act in conjunction with the TATA box binding proteins (TBP) and can be boosted by the CAAT and GC boxes, to start the transcription.

The major features derived from the tridimensional modeling of the extracellular lipases was the determination of structural characteristics. The conserved pentapeptide recognized in the *KmLIP3p* lipase has the GTSMG sequence, which does not match with any family of fungal and yeast lipases in the LED database. On the other hand, the pentapeptide sequence GHSLG, determined in the gene

of the *KmYJR107Wp* lipase, is characteristic of the abH23.02 family (lipases of the *Saccharomyces* type), the same the phylogenetic analysis predicted, which confirms the high relation of this enzyme with lipases belonging to the said family [Gupta et al. 2015].

#### 4. Conclusions

Although two lipases with extracellular location were detected in *K. marxianus*, only one of them (*KmYJR107Wp*) appears to be responsible for the extracellular lipase activity in L-2029 strain. According to the data obtained from the *KmYJR107Wp* lipase model, it belongs to the abH23.02 family, GX class, with a conserved pentapeptide GHSLG, catalytic triad S196, D264 and H333, and oxyanion hole composed of L197 and S121. The gene coding for said lipase seems to be regulated by oleate response elements (ORE).

In addition, all of the *K. marxianus* putative lipases belongs to the GX class, with varied molecular weights, in a range from 44 KDa to 87 KDa. The phylogenetic analysis of all the lipases from *K. marxianus* revealed evolutionary affinities with lipases from abH15.03 (*S. cerevisiae* lipase 2 like), abH23.01 (*R. miehei* lipase-like) and abH23.02 (*Saccharomyces* lipase-like) families.

In the case of the putative *KmLIP3p*, no relation was determined with the lipases families currently known in the LED database. However, it was determined that this lipase belongs to a Patatin superfamily. The conserved pentapeptide detected from the three-dimensional model of the LIP3 lipase, did not match in sequence (GTSMG) with canonical fungal lipases. A study focus on the characteristics and properties of the putative extracellular *KmLIP3p* lipase is currently carried out, to verify the characteristics, location and function that this lipase has in the yeast *K. marxianus*.

#### Ethical Statement

*Conflict of Interest:* The authors declare that there is no conflict of interest.

*Ethical approval:* This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

#### References

- Athenstaedt K, Daum G. (2005) Tgl4p and Tgl5p, two triacylglycerol lipases of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* are localized to lipid particles. *J. Biol. Chem.*, **280**: 37301–37309.
- Benjamin S, Pandey A. (1998) *Candida rugosa* Lipases : Molecular Biology and Versatility in Biotechnology. *Yeast*, **14**: 1069–1087.



- Bertoni M, Kiefer F, Biasini M, Bordoli L, Schwede T. (2017) Modeling protein quaternary structure of homo- and hetero-oligomers beyond binary interactions by homology. *Sci. Rep.*, **7**: 1–15.
- Biasini M et al. (2014) SWISS-MODEL: Modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Res.*, **42**: 252–258.
- Bienert S, Waterhouse A, De Beer TAP, Tauriello G, Studer G, Bordoli L, Schwede T. (2017) The SWISS-MODEL Repository-new features and functionality. *Nucleic Acids Res.*, **45**: D313–D319.
- Borrelli GM, Trono D. (2015) Recombinant lipases and phospholipases and their use as biocatalysts for industrial applications. *Int. J. Mol. Sci.*, **16**: 20774–20840.
- Brady L, Brzozowski AM, Derewenda ZS, Dodson E, Dodson G, Tolley S, Turkenburg JP, Christiansen L, Huge-Jensen B, Norskov L, Thim L, Menge U. A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. *Nature*, **343**: 767-770.
- Carugo O. (2007) Statistical validation of the root-mean-square-distance, a measure of protein structural proximity. *Protein Eng. Des. Sel.*, **20**: 33–37.
- Casas-Godoy L, Duquesne S, Bordes F, Sandoval G, Marty A. (2009) *Lipases and Phospholipases: Methods and Protocols*. Sandoval G. (ed).
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. (2011) ProTest 3: fast selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics*, **27**: 1164-1165.
- Deive FJ, Costas M, Longo MA. (2003) Production of a thermostable extracellular lipase by *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnol. Lett.*, **25**: 1403–1406.
- Domínguez de MP, Sánchez-Montero JM, Sinisterra J V., Alcántara AR. (2006) Understanding *Candida rugosa* lipases: An overview. *Biotechnol. Adv.*, **24**: 180–196.
- Epple UD, Eskelinen EL, Thumm M. (2003) Intravacuolar membrane lysis in *Saccharomyces cerevisiae*: Does vacuolar targeting of Cvt17/Aut5p affect its function? *J. Biol. Chem.*, **278**: 7810–7821.
- Epple UD, Suriapranata I, Eskelinen EL, Thumm M. (2001) Aut5/Cvt17p, a putative lipase essential for disintegration of autophagic bodies inside the vacuole. *J. Bacteriol.*, **183**: 5942–5955.
- Farré D, Roset R, Huerta M, Adsua JE, Roselló L, Albà MM, Messeguer X. (2003) Identification of patterns in biological sequences at the ALGGEN server: PROMO and MALGEN. *Nucleic Acids Res.*, **31**: 3651–3653.
- Fickers P, Marty A, Nicaud J. (2011) The lipases from *Yarrowia lipolytica*: Genetics, production, regulation, biochemical characterization and biotechnological applications. *Biotech. Adv.*, **29**: 632-644.

- Fischer M, Pleiss J. (2003) The Lipase Engineering Database: a navigation and analysis tool for protein families. *Nucleic Acids Res.*, **31**: 319–321.
- Fischer M, Thai QK, Grieb M, Pleiss J. DWARF – a data warehouse system for analyzing protein families. *BMC Bioinformatics*, **7**: 495.
- Galibert F et al. (1996) Complete nucleotide sequence of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome X. *EMBO J.*, **15**: 2031–2049.
- Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A. (2005) Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. *Proteomics Protoc. Handb.*, 571–607.
- Grochulski P, Li Y, Schrag JD, Cygler M. (1994) Two conformational states of *Candida rugosa* lipase. *Prot. Sci.*, **3**: 82-91.
- Gupta R, Kumari A, Syal P, Singh Y. (2015) Molecular and functional diversity of yeast and fungal lipases: Their role in biotechnology and cellular physiology. *Prog. Lipid Res.*, **57**: 40–54.
- Gurvitz A, Rottensteiner H. (2006) The biochemistry of oleate induction: Transcriptional upregulation and peroxisome proliferation. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, **1763**: 1392–1402.
- Ham HJ, Rho HJ, Shin SK, Yoon HJ. (2010) The TGL2 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes an active acylglycerol lipase located in the mitochondria. *J. Biol. Chem.*, **285**: 3005–3013.
- Hsu K-H, Lee G-C, Shaw J-F. (2008) Promoter analysis and differential expression of the *Candida rugosa* lipase gene family in response to culture conditions. *J. Agric. Food Chem.*, **56**: 1992–1998.
- Jaeger KE, Dijkstra BW, Reetz MT. (1999) Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annu. Rev. Microbiol.*, **53**: 315–351.
- Jeong H et al. (2012) Genome sequence of the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* KCTC 17555. *Eukaryot. Cell*, **11**: 1584–1585.
- Källberg M, Wang H, Wang S, Peng J, Wang Z, Lu H, Xu J. (2012) Template-based protein structure modeling using the RaptorX web server. *Nat. Protoc.*, **7**: 1511–1522.
- Katoh K, Kuma K, Toh H, Miyata T. (2005) MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. *Nucleic Acids Res.*, **33**: 511-518.
- Katoh K, Standley DM. (2013) MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.*, **30**: 772–780.
- Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJE. (2015) The Phyre2 web portal for protein modelling, prediction, and analysis. *Nat. Protoc.*, **10**: 845–858.

- Kufareva I, Abagyan R. (2012) Methods of protein structure comparison. *Methods Mol. Biol.*, **857**: 231–257.
- Lane MM, Burke N, Karreman R, Wolfe KH, O’Byrne CP, Morrissey JP. (2011) Physiological and metabolic diversity in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **100**: 507–519.
- Lane MM, Morrissey JP. (2010) *Kluyveromyces marxianus*: A yeast emerging from its sister’s shadow. *Fungal Biol. Rev.*, **24**: 17–26.
- Lee KS et al. (2013) Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* promoters for heterologous gene expression in *Kluyveromyces marxianus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **97**: 2029–2041.
- Lertwattanasakul N et al. (2015) Genetic basis of the highly efficient yeast *Kluyveromyces marxianus*: complete genome sequence and transcriptome analyses. *Biotechnol. Biofuels*, **8**: 47.
- Lotti M, Monticelli S, Montesinos JL, Brocca S, Valero F, Lafuente J. (1998) Physiological control on the expression and secretion of *Candida rugosa* lipase. *Chem. Phys. Lip.*, **93**: 143–148.
- Ma J, Wang S, Zhao F, Xu J. (2013) Protein threading using context-specific alignment potential. *Bioinformatics*, **29**: 257–265.
- Maeda Y, Oku M, Sakai Y. (2015) A defect of the vacuolar putative lipase Atg15 accelerates degradation of lipid droplets through lipolysis. *Autophagy*, **11**: 1247–1258.
- Maier VN, Crippen GM. (1994) Significance of root-mean-square deviation in comparing three-dimensional structures of globular proteins. *J. Mol. Biol.*, **235**: 625–634.
- Martínez-Corona R, Banderas-Martínez FJ, Pérez-Castillo JN, Cortés PC, González-Henández JC (2019). Avocado oil as an inducer of the extracellular lipase activity of *Kluyveromyces marxianus* L-2029. *J. Food Sci. Tech.* **IN PRESS**.
- Maiti R, Van Domselaar GH, Zhang H, Wishart DS. (2004) SuperPose: A simple server for sophisticated structural superposition. *Nucleic Acids Res.*, **32**: 590–594.
- Messeguer X, Escudero R, Farré D, Núñez O, Martínez J, Albà MM. (2002) PROMO: detection of known transcription regulatory elements using species-tailored searches. *Bioinformatics*, **18**: 333–334.
- Meunchan M, Michely S, Devillers H, Nicaud JM, Marty A, Neuvéglise C. (2015) Comprehensive analysis of a yeast lipase family in the *Yarrowia* clade. *PLoS One*, **10**: 1–22.
- Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y. (2011) The Role of Atg Proteins in Autophagosome Formation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **27**: 107–132.
- Peng J, Xu J. (2012) A multiple-template approach to protein threading. *Proteins*, **76**: 1930–1939.
- Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. (2011) SignalP 4.0: discriminating signal peptides

- from transmembrane regions. *Nat. Methods*, **8**: 785–6.
- Pleiss J, Fischer M, Peiker M, Thiele C, Schmid RD. (2000) Lipase engineering database: Understanding and exploiting sequence-structure-function relationships. *J. Mol. Catal. B Enzym.*, **10**: 491–508.
- Rajakumari S, Rajasekharan R, Daum G. (2010) Triacylglycerol lipolysis is linked to sphingolipid and phospholipid metabolism of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids*, **1801**: 1314–1322.
- Ray A, Lindahl E, Orn Wallner B. (2012) Improved model quality assessment using ProQ2. *BMC Bioinformatics*, **13**: 1–12.
- Robert X, Gouet P. (2014) Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Res.*, **42**: 320–324.
- Ronquist F et al. (2012) MrBayes 3.2: Efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst. Biol.*, **61**: 539–542.
- Salzberg SL, White O, Peterson J, Eisen JA. (2001) Microbial genes in the human genome: Lateral transfer or gene loss? *Science (80-. )*, **292**: 1903–1906.
- Sambrook J, Russell DW. (2001) *Molecular Cloning*. Third.
- Schmidt C, Athenstaedt K, Koch B, Ploier B, Daum G. (2013) Regulation of the yeast triacylglycerol lipase Tgl3p by formation of nonpolar lipids. *J. Biol. Chem.*, **288**: 19939–19948.
- Selvaraju K, Rajakumar S, Nachiappan V. (2014) Identification of a phospholipase B encoded by the LPL1 gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids*, **1841**: 1383–1392.
- Servant F, Bru C, Carrère S, Courcelle E, Gouzy J, Peyruc D, Kahn D. (2002) ProDom: automated clustering of homologous domains. *Brief. Bioinform.*, **3**: 246–251.
- Stergiou P-Y, Foukis A, Sklivaniti H, Zacharaki P, Papagianni M, Papamichael EM. (2012) Experimental Investigation and Optimization of Process Variables Affecting the Production of Extracellular Lipase by *Kluyveromyces marxianus* IFO 0288. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **168**: 672–680.
- Sun LL, Li M, Suo F, Liu XM, Shen EZ, Yang B, Dong MQ, He WZ, Du LL. (2013) Global Analysis of Fission Yeast Mating Genes Reveals New Autophagy Factors. *PLoS Genet.*, **9**.
- Swofford DL. (2002) PAUP\*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massach.
- Tan CH, Show PL, Ooi CW, Ng E-P, Lan JC-W, Ling TC. (2015) Novel lipase purification methods - a review of the latest developments. *Biotechnol. J.*, **10**: 31–44.

- Varthini LV, Selvaraju K, Srinivasan M, Nachiappan V. (2015) ROG1 encodes a monoacylglycerol lipase in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.*, **589**: 23–30.
- Whelan S, Goldman N. (2001) A general empirical model of protein evolution derived from multiple protein families using a maximum-likelihood approach. *Mol. Biol. Evol.*, **18**: 691-699.
- Widmann M, Juhl PB, Pleiss J. (2010) Structural classification by the Lipase Engineering Database: a case study of *Candida antarctica* lipase A. *BMC Genomics*, **11**: 1–8.

**Table 1. Lipases selected for phylogenetic analysis**

Key	Class	Superfamily	Homologous family	Specie / Protein name	Accession number / Database	Database
<i>KIL1</i>	GGGX	abH01	abH01.10	<i>Kluyveromyces lactis</i> / NC	XP_453565.1	GenBank
<i>CRLip1</i>	GGGX	abH03	abH03.01	<i>C. rugosa</i> / Lip1	CAA45957	GenBank
<i>CRLip2*</i>	GGGX	abH03	abH03.01	<i>C. rugosa</i> / Lip2	1GZ7	PDB
<i>CRLip3</i>	GGGX	abH03	abH03.01	<i>C. rugosa</i> / Lip3	CAA46805	GenBank
<i>AfL1</i>	GGGX	abH03	abH03.01	<i>A. fumigatus</i> / NC	EAL84915	GenBank
<i>AfLIPA</i>	GGGX	abH03	abH03.01	<i>A. fumigatus</i> / LIPA	KEY81886	GenBank
<i>DhL1</i>	GGGX	abH03	abH03.01	<i>D. hansenii</i> / NC	CAG87808	GenBank
<i>YLip1</i>	GGGX	abH02	abH02.01	<i>Y. lipolytica</i> / Lip1	Q99156	GenBank
<i>ScYju3p*</i>	GGGX	abH08	abH08.09	<i>S. cerevisiae</i> / Yju3p	4ZWN_D	PDB
<i>ScYDR44Wp</i>	GX	abH15	abH15.02	<i>S. cerevisiae</i> / NC	EGA83296	GenBank
<i>ScYOR059Cp</i>	GX	abH15	abH15.02	<i>S. cerevisiae</i> / NC	EHN00270	GenBank
<i>Tgl2p</i>	GX	abH15	abH15.03	<i>S. cerevisiae</i> / Tgl2p	AJU99864	GenBank
<i>ScRog1p</i>	GX	abH20	abH20.03	<i>S. cerevisiae</i> / Rog1p	AJS08980	GenBank
<i>ScAtg15p</i>	GX	abH23	abH23.01	<i>S. cerevisiae</i> / Atg15p	AJQ35479	GenBank
<i>AnLIPB</i>	GX	abH23	abH23.01	<i>A. niger</i> / LipB	ABG73614	GenBank
<i>AfL2</i>	GX	abH23	abH23.01	<i>A. fumigatus</i> / NC	XP_748138	GenBank
<i>AoL2</i>	GX	abH23	abH23.01	<i>Aspergillus oryzae</i> / L2	BAA12912	GenBank
<i>PcL*</i>	GX	abH23	abH23.01	<i>Penicillium camembertii</i> / ND	1TIA	PDB
<i>RML*</i>	GX	abH23	abH23.01	<i>R. miehei</i> / RML	3TGL	PDB
<i>ScYJR107Wp</i>	GX	abH23	abH23.02	<i>S. cerevisiae</i> / NC	EEU08025	GenBank
<i>CdLIP3</i>	GX	abH23	abH23.02	<i>Candida deformans</i> / CdLIP3	CAD21428	GenBank
<i>KIL2</i>	GX	abH23	abH23.02	<i>K. lactis</i> / NC	XP_453549	GenBank
<i>SCL1</i>	GX	abH23	abH23.02	<i>S. cerevisiae</i> / NC	EDN63423	GenBank
<i>YLip8</i>	GX	abH23	abH23.02	<i>Y. lipolytica</i> / Lip8	XP_500677	GenBank
<i>YLip5</i>	GX	abH23	abH23.02	<i>Y. lipolytica</i> / Lip5	XP_503467	GenBank
<i>YLip2*</i>	GX	abH23	abH23.02	<i>Y. lipolytica</i> / Lip2	3O0DD	PDB
<i>CALB*</i>	GX	abH37	abH37.01	<i>C. antarctica</i> / CALB	4ZV7A	PDB
<i>KIL3</i>	GX	abH14	abH14.02	<i>K. lactis</i> / NC	XP_455780	GenBank
<i>CALA*</i>	Y	abH38	abH38.01	<i>C. antarctica</i> / CALA	3GUU	PDB
<i>CaLip1p</i>	Y	abH38	abH38.02	<i>Candida albicans</i> / Lip1p	XP_723507	GenBank
<i>CaLIP2</i>	Y	abH38	abH38.02	<i>C. albicans</i> / LIP2	Q9P8W5	GenBank
<i>AfL3</i>	Y	abH38	abH38.03	<i>A. fumigatus</i> / NC	EDP47960	GenBank
<i>AoL1</i>	Y	abH38	abH38.03	<i>A. oryzae</i> / NC	XP_001820488	GenBank
<i>Tgl3p</i>	ND	ND	ND	<i>S. cerevisiae</i> / Tgl3p	AJS99689	GenBank
<i>Tgl4p</i>	ND	ND	ND	<i>S. cerevisiae</i> / Tgl4p	AJS53282	GenBank

\* Crystallized lipases; ND – Not Determined; NC – Not Characterized.

**Table 2. Bioinformatics characterization of the *K. marxianus* DMKU3-1042 putative lipases**

Key	Superfamily	Homologous family	MW (kDa)	Ip	Signal peptide	Active site	Oxyanion hole	Binding substrate site	Probable N-glycosylation sites
<i>KmYJR107Wp</i>	abH23	abH23.02	44.526	5.98	Yes (33)	S224D296H363	L225	P252	122 (NRTR); 97 (NKTF)
<i>KmATG15p</i>	abH23	abH23.01	60.513	4.8	No	S161D219	L162	P193	184 (NVTG); 15 (NSTG); 73 (NASL); 213 (NISG)
<i>KmROG1p</i>	ND	ND	77.694	5.81	No	ND	ND	ND	394 (NVTA); 206 (NTSL); 522 (NSTN)
<i>KmYDR444Wp</i>	abH20	abH20.03	71.998	8.36	No	S141D171H243	L142	ND	445 (NISN); 169 (NDSI); 493 (NLSD); 119 (NNSK); 575 (NYSI)
<i>KmYOR059Cp</i>	abH15	abH15.03	53.952	8.87	No	S374D497H519	M375	ND	421 (NLSK); 364 (NDSG)
<i>KmLIP2p</i>	abH15	abH15.03	44.682	8.1	No	S205D323H345	M206	ND	175 (NLSK); 104 (NHSD); 316 (NLSD)
<i>KmLIP3p</i>	ND	ND	68.227	7.55	Yes (25)	ND	ND	ND	222 (NGTS)
<i>KmLIP5p</i>	ND	ND	87.193	9.11	No	ND	ND	ND	329 (NVTG); 346 (NLTA); 314 (NLTF); 387 (NSSS); 646 (NSSL); 295 (NGTW)
<i>KLMA_60413p</i>	abH01	abH01.10	62.853	5.28	No	S217E350 H460	A217	ND	303 (NHTE)
<i>KLMA_60415p</i>	abH01	abH01.10	62.808	5.29	No	S217E350 H460	A217	ND	303 (NHTE)

ND – Not Determined.

**Fig. 1.- Phylogeny of the putative lipases from *K. marxianus*.** The class, superfamily, homologous family and accession number from each lipase in the phylogenetic tree is shown in Table 1. Bootstrap values (%) are from 1000 replications (MP inference). The scale bar indicates a distance equivalent to 0.1 amino acid substitutions per site.

**Fig. 2.- Nucleotide sequence from the promoter region of the extracellular (A) *KmLIP3p* and (B) *KmYJR107Wp* lipases from *K. marxianus* L-2029.** The 1 kb upstream sequence from the start codon is shown in each case. Blue: Probable recognition sequence for oleate response elements (ORE). Purple: Probable upstream activation sequence type 1 (UAS1). Green: Probable TATA box sequence. Red: Probable CAAT box sequence. Yellow: Probable GC box sequence. Black: Start codon. The positions where a modification was detected with respect to the reference sequences are marked with a diagonal and the interchanged nucleotide.

**Fig. 3.- Tridimensional model of the putative extracellular *KmLIP3p* lipase from *K. marxianus* L-2029 generated with the Pyre2 software.** (A) Tridimensional model. (B) Active site of the model: Amino acids of the catalytic triad (purple), amino acids of the oxyanion hole (orange) and amino acids which interact with the catalytic serine (green).

**Fig. 4.- Tridimensional model of the putative extracellular *KmYJR107Wp* lipase from *K. marxianus* L-2029 generated with the Pyre2 software.** (A) Tridimensional model. (B) Active site of the model: Amino acids of the catalytic triad (purple) and amino acids of the oxyanion hole (orange).

**Fig. 5.- Secondary structure alignment of the (A) *KmLIP3p* lipase and a patatin hydrolase and (B) *KmYJR107Wp* lipase and the *YLip2p* lipase from *Y. lipolytica*.** The  $\alpha$ - and  $\pi$ -helixes are shown above the sequences as  $\alpha$  or  $\eta$ , respectively. The  $\beta$ -sheets are represented with  $\beta$ . The strict  $-\alpha$  and  $-\beta$  turns are marked as TTT and TT, respectively. The aligned residues in black color have a low similarity; the enclosed residues in a gray box have a high similarity, while the enclosed residues in a black box and in white color are identical between the sequences. Residues in an alternative conformation are highlighted with a gray star on top of the sequence. The accessibility of the sequence is shown in a bar with a color scale from white (not accessible) to black (accessible). The hydrophathy of the sequence is shown in a bar with a color scale ranging from white (hydrophilic) to black (hydrophobic). Disulfide bridges are shown as pairs of digits below the hydrophatic bar.