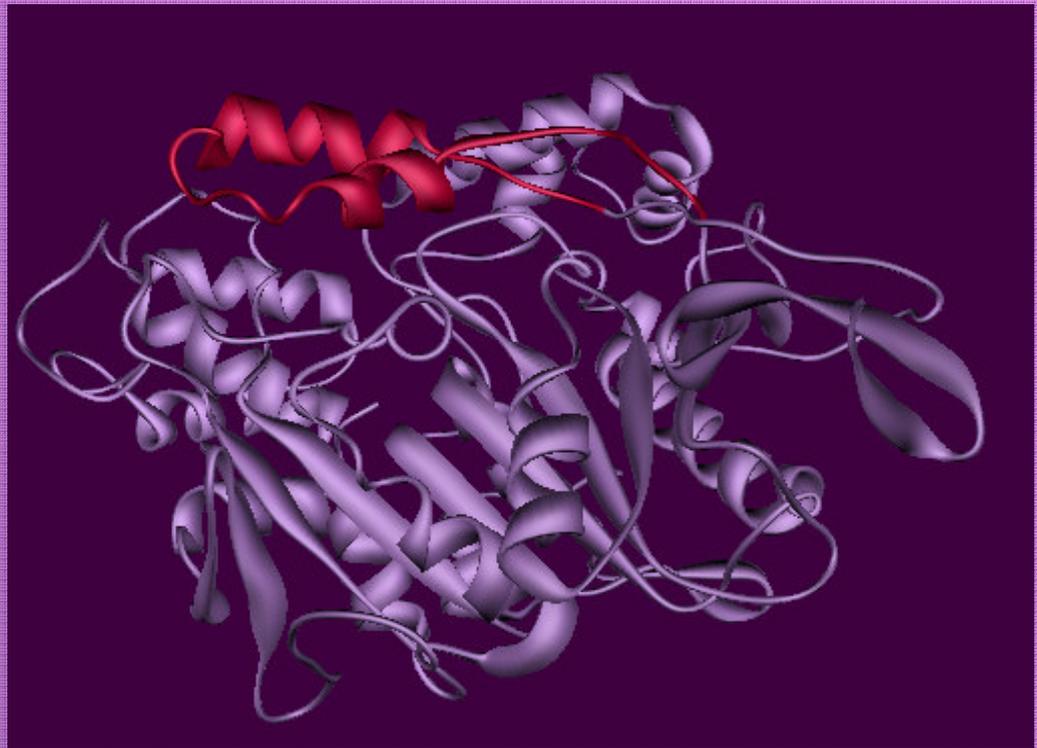


CLONACIÓN, EXPRESIÓN Y EVOLUCIÓN MOLECULAR DE LA LIPASA I DE *Galactomyces geotrichum*



Layla Fernández Torres, Granada 2005

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Granada

Departamento de Biotecnología, Puleva Biotech, S.A



Ami Familia

*“Ante las tinieblas de la ignorancia y la mala voluntad oforgamos las
luces del conocimiento y de la serenidad”.*

Antonio Pastre Perelló

Agradecimientos

En primer lugar, quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a la directiva de Puleva Biotech S.A., Dr. Jesús Jiménez y Dr. Julio Boza, por brindarme la oportunidad de realizar esta tesis doctoral en su centro de investigación y concederme una beca, así como a la Fundación Universidad-Empresa por mediar en dicha beca.

A mis directores de tesis Dr. José Luis Adrio Fondevila y Dr. Javier Velasco Álvarez, por dirigirme la tesis con tanta profesionalidad, por su ayuda y ánimos en los momentos más difíciles. Gracias José por haber confiado en mí y haberme permitido trabajar con vosotros.

A mi tutora de tesis M^a Dolores Suárez Ortega por su ayuda y supervisión.

Al Dr. Miguel Alcalde y su grupo de investigación del departamento de Biocatálisis (Instituto de Catálisis y Petroleoquímica, CSIC, Madrid) por haberme permitido realizar una pequeña estancia en su laboratorio. Gracias por tu acogida y compartir conmigo un poquito de evolución dirigida.

A Pedro Luís Benítez por su inestimable ayuda en el conocimiento de las grasas. Gracias por hacerme todo un poco más sencillo.

A Ignacio Pérez-Victoria por tu ayuda con la síntesis química y por compartir conmigo tus conocimientos.

Al departamento de Análisis de Puleva Biotech, S.A., especialmente a Alberto Zafra y Juan Carlos Morales por su dedicación a este proyecto.

A todos mis compañeros del departamento de Biotecnología. A la Dra. Carmen Ronchel, con quien empecé en el "apasionante mundo de las lipasas"...gracias por tu ayuda y tus consejos.

Al Dr. Oskar Bañuelos por todas las cosas que me has enseñado desde el primer hasta el último día. Gracias.

A Malena Valdivieso y José M^a Corral mis queridísimos compañeros de batalla y amigos extraordinarios. Voy a echar mucho de menos el día de la marmota con vosotros, a Perry, a Mason y aquellas conversaciones sin sentido que no llevan a ninguna parte.

A Ana De Martín por estar conmigo cuando lo he necesitado, por tus palabras siempre amables y, sobretodo, por tu amistad.

A M^a Paz Díaz-Ropero, Alberto Garach, Laura Diego, Inés Sánchez, Juan Antonio Malo, Manolo Merino, David Cara y M^a Carmen Membrilla por ser unas personas excelentes. Gracias por vuestra amistad.

En general, a todos los compañeros de Puleva Biotech. Gracias por este tiempo que he disfrutado trabajando a vuestro lado, lleno de buenos momentos.

Al Dr. Luís García del Moral del Departamento de Biotecnología Vegetal (Universidad de Granada) por haberme permitido obtener una beca de colaboración.

A la Dra. Josefa Liboria Segovia y Dra. M^a José Alejandre por todo lo que me enseñaron y por saber que siempre puedo contar con ellas.

A José Luís y Adoración, por ser un ejemplo de generosidad y amor. Gracias por vuestro cariño, comprensión y ayuda cuando la he necesitado.

A Juan Antonio Fernández o Antonio Sastre Perelló, por esas conversaciones sobre lo divino y lo humano, por tus pinceladas históricas, por tus poemas, por hacerme reír con tus cosas. Eres el padre más pintoresco que uno pueda tener.

A Ari y Juan por haberme soportado durante muchos años y, a pesar de eso, sentir lo mucho que me queréis. Ojalá mi pequeño tenga unos hermanos tan bondadosos y cariñosos como vosotros.

A Paquita por prácticamente todo lo que soy. Gracias por creer tanto en mí, por hacerme sentir que puedo, porque nunca has dudado que lo conseguiría. Ya ves Mamá, llevabas razón, al final lo he hecho.

A Rafaela por quererme "más que nadie", por esos guisaillos tan ricos, por

los maravillosos veranos en la playa junto a ti. Esto es lo que hacía en Puleva, abuela, no los yogures.

A Neo y Trini, por los ratos tan divertidos que nos habéis hecho pasar, por vuestra compañía.

A mi "liebe Schatz", mi tesoro, por lo mucho que me has ayudado a llevar todo para adelante, por hacerme sentir con fuerzas cada día, por creer en mí, por haber estado siempre a mi lado en lo bueno y en lo malo, por hacerme tan feliz. Gracias por el sacrificio que has hecho por mí todos estos años. Gracias por tu amor.

A mi niño, por haber compartido conmigo tantos silencios, por ser la razón de mi vida y por convertir el día más horrible en el más bello con sólo ver su sonrisa.

Por último, quiero agradecer a Elias, mi abuelo, sus besos y sonrisas cuando todo era gris alrededor. No me olvido de ti.

Índice

Abreviaturas	xi
Índice de Figuras	xiii
Índice de Tablas	xv
1. Introducción	17
1.1 Enzimas en la industria alimentaria	19
1.2 Lipasas	23
1.2.1 Características generales.....	23
1.2.2 Estructura y Mecanismo de acción.....	25
1.2.3 Aplicaciones industriales de las lipasas.....	29
1.2.4 Lipasas de <i>Galactomyces geotrichum</i>	33
1.3 Ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs)	37
1.3.1 Definición y clasificación de los ácidos grasos.....	37
1.3.2 Importancia biológica.....	40
1.3.3 Procedimientos para la obtención de aceites enriquecidos en EPA y DHA.....	46
1.3.3.1 Métodos químicos.....	46
1.3.3.2 Métodos enzimáticos.....	47
1.4 Evolución dirigida de enzimas	49
1.4.1 Introducción.....	49
1.4.2 Métodos para la creación de variabilidad genética.....	51
1.4.3 Selección de las mejores variantes.....	54
1.4.4 Evolución molecular de lipasas.....	55
2. Objetivos	57
3. Materiales y métodos	61
3.1 Reactivos químicos y Enzimas	63
3.1.1 Oligonucleótidos.....	63
3.1.2 Antibióticos.....	63
3.1.3 Tampones y otras soluciones.....	64
3.1.4 Enzimas.....	66
3.2 Microorganismos	66
3.2.1 Cepas bacterianas.....	66
3.2.2 Cepas fúngicas.....	67

3.3 Vectores plasmídicos	68
3.4 Medios de cultivo	69
3.4.1 Medios de cultivo para bacterias.....	69
3.4.2 Medios de cultivo para levaduras.....	69
3.5 Cultivo y mantenimiento de las cepas	73
3.5.1 Cepas bacterianas.....	73
3.5.2 Cepas fúngicas.....	73
3.6 Manipulación de ácidos nucleicos	74
3.6.1 Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR).....	74
3.6.2 Tratamiento con enzimas de restricción.....	75
3.6.3 Relleno de extremos 5´ protuberantes.....	76
3.6.4 Desfosforilación de extremos 5´ de fragmentos de ADN.....	76
3.6.5 Ligación de moléculas de ADN.....	77
3.6.6 Purificación de ácidos nucleicos.....	77
3.6.6.1 Purificación de ADN.....	77
3.6.6.2 ADN plasmídico bacteriano.....	78
3.6.6.2.1 Lisis Alcalina.....	78
3.6.6.2.2 NucleoSpin® Plasmid Kit.....	78
3.6.6.2.3 Preparación de ADN plasmídico a gran escala.....	79
3.6.6.3 Purificación de ADN plasmídico de levaduras.....	79
3.6.6.4 Purificación de ADN genómico de hongos filamentosos y levaduras.....	79
3.6.7 Determinación espectrofotométrica de la cantidad de ADN o ARN.....	80
3.6.8 PCR mutagénica.....	81
3.6.9 Construcción de una genoteca en <i>Pichia pastoris</i>	82
3.7 Transferencia, marcaje e hibridación de ADN	84
3.7.1 Transferencia.....	84
3.7.2 Marcaje.....	85
3.7.3 Hibridación.....	85
3.7.3.1 Prehibridación e hibridación.....	85
3.7.3.2 Detección Inmunológica.....	86
3.8 Transformación de células	86
3.8.1 Preparación de células electrocompetentes.....	86
3.8.1.1 <i>Escherichia coli</i>	86
3.8.1.2 Levaduras.....	87
3.8.2 Electrotransformación.....	88

3.8.2.1 <i>E. coli</i>	88
3.8.2.2 Levaduras (<i>Pichia pastoris</i> y <i>Saccharomyces cerevisiae</i>).....	88
3.8.3 Transformación de células competentes químicas.....	89
3.8.3.1 <i>E. coli</i>	89
3.8.3.2 <i>S. cerevisiae</i>	89
3.9 Electroforesis de Macromoléculas	90
3.9.1 Electroforesis de ADN.....	90
3.9.2 Electroforesis de proteínas.....	91
3.9.2.1 Condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).....	91
3.9.2.2 Condiciones nativas (PAGE).....	92
3.10 Métodos de Proteínas	93
3.10.1 Determinación de la concentración.....	93
3.10.2 Ultrafiltración.....	93
3.10.3 Digestión de restos glucídicos con Endoglicosidasa H.....	93
3.10.4 Determinación de la actividad lipasa.....	94
3.10.4.1 Colorimetría.....	94
3.10.4.2 Valoración ácido-base.....	95
3.11 Síntesis de tri-EPA	96
3.11.1 Obtención del ácido graso libre.....	96
3.11.2 Reacción de síntesis.....	97
3.11.3 Extracción.....	98
3.10.4 Purificación.....	98
3.12 Determinación de la especificidad de sustrato por HPLC-MS	99
4. Resultados	103
4.1 Aislamiento de la cepa <i>Galactomyces geotrichum</i> BT107	105
4.2 Producción de lipasas en la cepa <i>G. geotrichum</i> BT107	105
4.3 Clonación y secuenciación del gen <i>lipI</i> de <i>G. geotrichum</i> BT107	106
4.4 Expresión del gen <i>lipI</i> en <i>Pichia pastoris</i> X-33	111
4.4.1 Construcción del plásmido de expresión.....	111
4.4.2 <i>Screening</i> y análisis molecular de los transformantes.....	113
4.4.2.1 Selección de los mejores transformantes.....	113
4.4.2.2 Análisis del número de copias integradas.....	116
4.5 Caracterización de la lipasa 1 (GGLIP 1) recombinante	118
4.5.1 Purificación por Cromatografía de Intercambio Aniónico.....	118

4.5.2 Determinación del peso molecular.....	119
4.5.3 Análisis de la especificidad de sustrato.....	120
4.5.3.1 pH-STAT.....	120
4.5.3.2 Síntesis de triEPA.....	121
4.6 Evolución dirigida.....	122
4.6.1 Creación de variabilidad genética.....	122
4.6.2 Evolución dirigida en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	122
4.6.2.1 Clonación y expresión del gen <i>lipI</i> en <i>S. cerevisiae</i> BJ5465.....	123
4.6.2.2 Selección.....	125
4.6.2.3 Construcción de colecciones de variantes.....	125
4.6.3 Evolución dirigida en <i>Pichia pastoris</i> X-33.....	127
4.6.3.1 Selección.....	127
4.6.3.2 Obtención de transformantes monocopia.....	128
4.6.3.3 Construcción de una colección de variantes del gen <i>lipI</i> en <i>P. pastoris</i>	130
4.7 Análisis de las variantes mejoradas.....	134
4.7.1 Análisis a nivel molecular.....	134
4.7.1 Especificidad de sustrato.....	136
5. Discusión.....	145
<hr/>	
5.1 Aislamiento de <i>G. geotrichum</i> BT107. Clonación del gen <i>lipI</i>.....	147
5.2 Expresión heteróloga del gen <i>lipI</i> de <i>G. geotrichum</i> BT107.....	148
5.3 Caracterización de la proteína recombinante.....	149
5.3.1 Especificidad de sustrato.....	151
5.4 Evolución dirigida.....	153
5.4.1 Creación de variabilidad genética. PCR Mutagénica.....	156
5.4.2 Evolución dirigida en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	158
5.4.3 Evolución dirigida en <i>Pichia pastoris</i>	159
5.4.3.1 Obtención de una colección de variantes del gen <i>lipI</i>	161
5.4.3.2 Análisis de las variantes de la lipasa GGLIP 1.....	163
5.4.3.2.1 Especificidad de sustrato.....	163
5.4.3.2.2 Análisis estructural.....	167
6. Conclusiones.....	173
<hr/>	
7. Bibliografía.....	177
<hr/>	

Abreviaturas

AOX1	Gen de la alcohol oxidasa 1 de <i>Pichia pastoris</i>
APCI	<i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i> , Ionización Química a Presión atmosférica
ARNasa	Ribonucleasa
bar	Bares (unidad de presión)
cm	Centímetros
cv	Volúmenes de columna
DCM	Diclorometano
DHA	<i>Docosahexaenoic acid</i> , ácido docosahexaenoico
DMAP	4-Dimetilaminopiridina
D.O.	Densidad óptica
EDCI	Hidrocloruro de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EPA	<i>Eicosapentaenoic acid</i> , ácido eicosapentaenoico
ESI	<i>Electrospray Ionization</i> , Ionización por electrospray
EtOH	Etanol
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i> , Cromatografía Líquida Rápida de Proteínas
g	Gramos
h	Horas
HPLC-MS	<i>High Performance Liquid Chromatography Mass</i> , Cromatografía Líquida de alta resolución con detector de masas
kDa	Kilodaltons
kb	Kilobases
L	Litro
M	Concentración molar
meq	Miliequivalentes
mg	Miligramos
µg	Microgramos
min	Minutos
mL	Militros
µL	Microlitros
mM	Milimolar
µM	Micromolar
mm	Milímetros
nm	Nanómetros

o/n	<i>Over Night</i> , durante la noche
ORF	<i>Open Reading Frame</i> , marco abierto de lectura
pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , reacción en cadena de la polimerasa
PM	Peso molecular
p/v	Peso/volumen
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato sódico
s	Segundos
u.v.	ultravioleta
vol	Volúmenes
TEMED	N, N, N', N'-Tetrametiletilendiamina
TLC	<i>Thin Layer Chromatography</i> , cromatografía en capa fina
YNB	<i>Yeast Nitrogen Base</i>

Índice de Figuras

Figura 1. Acción catalítica de las lipasas.....	23
Figura 2. Modelo tridimensional para la lipasa de <i>Rhizomucor miehei</i>	27
Figura 3. Mecanismo catalítico de las lipasas.....	27
Figura 4. <i>Galactomyces geotrichum</i> BT107.....	33
Figura 5. Modelo tridimensional de la lipasa I de <i>G. geotrichum</i>	36
Figura 6. Nomenclatura <i>cis/trans</i>	38
Figura 7. Ruta de síntesis de los ácidos grasos de la serie ω -3 y ω -6.....	41
Figura 8. Reacción BP (Gateway).....	83
Figura 9. Cálculo del coeficiente de extinción molar de la resorufina.....	95
Figura 10. Rectas de calibrado para triglicéridos (triEPA y trioleína) y ácidos grasos (EPA y oleico).....	101
Figura 11. Actividad lipasa en cultivos de <i>G. geotrichum</i> BT107.....	106
Figura 12. Plásmido pBT69.....	107
Figura 13. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos del gen <i>lipI</i> de <i>G. geotrichum</i> BT107	109
Figura 14. Comparación entre secuencias de la lipasa 1 de <i>G. geotrichum</i>	110
Figura 15. Construcción del plásmido pBT70.....	112
Figura 16. Integración dirigida del plásmido pBT70 en el genoma de <i>P. pastoris</i>	113
Figura 17. Ensayo de actividad lipasa en placas microtiter.....	114
Figura 18. Proteína total secretada por los tres transformantes seleccionados.....	115
Figura 19. Actividad lipasa específica de los clones seleccionados.....	115
Figura 20. Muestras procedentes de los sobrenadantes del transformante tBT70-163 en medio BMMY.....	116
Figura 21. Hibridación de los transformantes de <i>P. pastoris</i> X-33.....	117
Figura 22. Determinación del peso molecular de la lipasa GGLIP 1.....	119
Figura 23. Actividad específica (AE) de la lipasa GGLIP 1 medida con el pH-STAT.....	121
Figura 24. Construcción del plásmido pBT158.....	124
Figura 25. Construcción de una colección de variantes de expresión en <i>S. cerevisiae</i>	126
Figura 26. Actividad lipasa frente a triEPA y a trioleína.....	128
Figura 27. Hibridación de transformantes de <i>P. pastoris</i>	129
Figura 28. Estrategia para la construcción de una colección de variantes en plásmidos de expresión en <i>P. pastoris</i>	130
Figura 29. <i>Screening</i> de la colección de variantes del gen <i>lipI</i> en <i>P. pastoris</i>	131
Figura 30. <i>Screening</i> de actividad frente a triEPA.....	132
Figura 31. Actividad de los clones seleccionados frente a trioleína.....	133

Figura 32. Comparación de las secuencias de la proteína GGLIP 1 y las variantes seleccionadas.....	135
Figura 33. Hibridación de los transformantes seleccionados.....	136
Figura 34. Porcentaje de hidrólisis de triglicéridos (triEPA y trioleína) a los 30 min de reacción.....	137
Figura 35. Cantidad de ácidos grasos, EPA y oleico, liberados a los 30 min de reacción..	138
Figura 36. Coeficiente de actividad.....	139
Figura 37. Análisis del ácido graso oleico por HPLC-MS.....	140
Figura 38. Análisis del ácido graso EPA por HPLC-MS.....	141
Figura 39. Cantidad de ácidos grasos, EPA y oleico, liberados tras la hidrólisis (30 min) de Eupoly-EPA®.....	142
Figura 40. Coeficiente de actividad tras la hidrólisis de Eupoly-EPA®.....	143
Figura 41. Estructura tridimensional de la lipasa 1THG de <i>G. geotrichum</i> ATCC 34614 mostrando los aminoácidos que afectan a la actividad enzimática.....	169
Figura 42. Estructura tridimensional de la lipasa 1THG de <i>G. geotrichum</i> ATCC 34614 mostrando los cambios aminoacídicos encontrados.....	170

Índice de Tablas

Tabla 1. Familias de lipasas.....	24
Tabla 2. Ambigüedad sobre el origen de algunas lipasas.....	25
Tabla 3. Subdivisión de las lipasas según la geometría del sitio de unión del ácido graso	26
Tabla 4. Ejemplos de algunas lipasas microbianas disponibles comercialmente.....	30
Tabla 5. Lipasas de origen microbiano comercializadas en Europa.....	32
Tabla 6. Especificidad de sustrato de las lipasas I y II de <i>G. geotrichum</i> ATCC 34614.....	35
Tabla 7. Nombres sistemáticos, comunes y abreviados de ácidos grasos insaturados.....	39
Tabla 8. Contenido aproximado de PUFAs ω -3 en diferentes especies de pescado.....	42
Tabla 9. Lista de los oligonucleótidos utilizados en este trabajo.....	63
Tabla 10. Antibióticos.....	64
Tabla 11. Composición y preparación de tampones y soluciones.....	64
Tabla 12. Listado de enzimas.....	66
Tabla 13. Nombres y características esenciales de plásmidos.....	68
Tabla 14. Condiciones de la separación cromatográfica de triglicéridos (trioleína y triEPA) y ácidos grasos (oleico y EPA) en HPLC-MS.....	100
Tabla 15. Condiciones de detección de triglicéridos (trioleína y triEPA) y ácidos grasos (oleico y EPA) en HPLC-MS.....	100
Tabla 16. Purificación de la proteína GGLIP 1.....	119
Tabla 17. Cantidades de productos y rendimientos durante la síntesis química del triEPA.....	122
Tabla 18. Número de transformantes de <i>P. pastoris</i> X-33 obtenidos con bajas concentraciones de ADN y de zeocina.....	128
Tabla 19. Mutaciones y sustituciones presentes en los cinco clones seleccionados.....	134
Tabla 20. Contenido en ácidos grasos de Eupoly-EPA®.....	166

1. Introducción

1. Introducción

1.1 Enzimas en la industria alimentaria

Las enzimas son proteínas que actúan como catalizadores en el metabolismo de los seres vivos. El nombre de enzima fue propuesto en 1876 por el fisiólogo alemán Wilhelm Kühne (1837-1900) y deriva de la frase griega “en zyme” que significa “en la levadura”.

La utilización en la industria de procedimientos en los que están implicadas enzimas se conoce desde muy antiguo. Ya en la Iliada de Homero (unos 400 años a.C.) se menciona que al almacenar leche en bolsas hechas de estómagos de terneros, corderos o cabras recién sacrificados ésta se convertía en una sustancia semisólida. Tras presionarla en un material absorbente se obtenía lo que, actualmente, conocemos como queso. Este producto presentaba ventajas sobre la leche ya que era más fácil de transportar y además adquiría aromas después de algún tiempo.

Desde entonces hasta nuestros días se han ido descubriendo nuevos datos y aplicaciones de estos biocatalizadores que han contribuido al desarrollo de múltiples procesos que permiten obtener productos beneficiosos para la humanidad.

La historia de la tecnología enzimática moderna comienza en 1864 cuando el químico danés Christian Hansen fundó en Copenhague una compañía dedicada a la producción industrial de preparados enzimáticos para elaborar quesos (**Borge Poulsen P** y **Buchholz K**, 2003). Esta empresa, llamada “Christian Hansen’s Laboratory”, aún existe hoy en día y es una de las más importantes en la producción de enzimas y microorganismos para la industria láctea.

En las décadas finales del siglo XIX se produjo un importante desarrollo en la tecnología y, especialmente, en el en el campo de la fermentación donde los logros alcanzados por Schwann, Liebig, Pasteur y Kühne fueron de gran importancia. En particular, la disputa entre Liebig y Pasteur sobre el proceso de fermentación causó una áspera polémica. Liebig argumentaba que la fermentación era resultado de un proceso químico mientras que Pasteur defendía que la fermentación no ocurría a menos que estuvieran presentes organismos vivos.

La disputa quedó finalmente resuelta en 1897 después de la muerte de ambos adversarios, cuando Eduard Buchner (1860-1917) descubrió que los extractos de levadura libres de células eran capaces de convertir glucosa en etanol y dióxido de carbono tal y como lo hacían las células vivas. En otras palabras, la conversión no sólo era atribuida a las células de levadura como tal sino a sus enzimas, una vez liberadas de la célula.

Tras el descubrimiento de Buchner, los científicos asumieron que las fermentaciones y las reacciones vitales, en general, eran producidas por enzimas. Sin embargo, todos los intentos de aislar e identificar su naturaleza química fracasaron.

La investigación llevada a cabo en las décadas posteriores promovió un considerable desarrollo del uso de las enzimas, con grandes aportaciones tales como las de E. Fischer en 1894 sobre especificidad enzimática. Croft-Hill en 1898 diseñó la primera síntesis enzimática a partir de un extracto de levadura (α -glucosidasa) que actuaba sobre una solución de glucosa al 40% produciendo isomaltosa. En 1900, Kastle y Loevenhart observaron que la hidrólisis de grasas y otros ésteres por parte de las lipasas era un reacción reversible y que la síntesis enzimática podía ocurrir en una mezcla diluida de alcohol y ácido (**Borge Poulsen P y Buchholz K**, 2003).

Más tarde, en 1926, el bioquímico estadounidense James B. Sumner (1887-1955) consiguió aislar y cristalizar la urea ("The Chemical Nature of Enzymes", *Nobel lectures, Chemistry 1946*). Cuatro años más tarde su colega, John Howard Northrop ("The preparation of Pure Enzymes and Virus Proteins", *Nobel Lecture Chemistry, 1946*), aisló y cristalizó la pepsina y tripsina.

Al principio del siglo XX, Nicloux y Hoyer desarrollaron la producción lipasa a partir de semillas de ricino mediante disrupción mecánica. Las semillas se almacenaban, varios días, en presencia de algún ácido lo que, al parecer, activaba a la lipasa. A continuación, estos preparados se utilizaron para la producción de ácidos grasos a partir de aceites y grasas.

A partir de 1940, las aplicaciones industriales de las enzimas fueron extendiéndose progresivamente. Un ejemplo del desarrollo comercial de las preparaciones enzimáticas es la división de enzimas de la empresa Novo Industri (actualmente Novozymes). Hasta 1965 sus ventas no excedían el millón de

dólares americanos. Sin embargo, la aparición en 1960 de un detergente conteniendo una alcalasa de *Bacillus licheniformis*, y el desarrollo de un proceso enzimático para producir dextrosa a partir de glucoamilasas llevó a que la empresa facturase más de 50 millones de dólares anuales sólo cuatro años más tarde.

En 1987 el mercado de enzimas en Estados Unidos y Europa alcanzó los 700 millones de dólares. Las de origen microbiano representaron un 60% de esta cifra. El crecimiento del mercado de enzimas para uso industrial ha continuado hasta alcanzar, en 1998, los 1,6 billones de dólares repartidos en las siguientes áreas: alimentación (45%), detergentes (34%), textil (11%), cuero (3%), papel (1,2%). Aproximadamente un 60% de las enzimas utilizadas en alimentación, formulación de detergentes e industrias de procesamiento del almidón son productos recombinantes (**Adrio JL y Demain AL**, 2003).

En el año 2000, el mercado alcanzó los 2.000 millones de dólares sin incluir enzimas terapéuticas y de diagnóstico.

Actualmente, la utilización de enzimas en la formulación de detergentes constituye el ejemplo más exitoso de la aplicación de enzimas en la industria. Proteasas, lipasas, amilasas, oxidasas, peroxidasas y celulasas se añaden a detergentes, donde éstas catalizan la ruptura de enlaces químicos en presencia de agua.

La aparición de nuevas tecnologías, como la ingeniería genética y la ingeniería de proteínas, a finales del siglo XX, ha permitido la generación de “xenzimas”. Éstas son creadas a partir de las enzimas naturales mediante modificación química, mutación aleatoria o dirigida. Estas enzimas alteradas incrementan la eficacia de la fermentación y, en muchos casos, no sólo aceleran el proceso sino que aportan distintas propiedades al producto, como ocurre en la elaboración del queso, en el cual se mejoran los aromas.

La extensión del uso de enzimas en alimentación ha obligado a que diferentes organismos como la EFSA (*European Food Safety Authority*) en Europa, la FDA (*Food and Drug Administration*) en Estados Unidos o la JECFA (*Joint Expert Committee on Food Additives*) de la FAO/WHO a regular estos productos con la finalidad de garantizar la seguridad del consumidor.

En la Unión Europea, las enzimas se clasifican, desde un punto de vista

regulatorio, como aditivos alimentarios o bien como ayudas al procesamiento (“processing aids”), según estén presentes o no en el producto final, respectivamente. Las únicas enzimas aprobadas por la JECFA como ingredientes alimentarios son la invertasa de *Saccharomyces cerevisiae* (E1103) y la lisozima obtenida del huevo de la gallina (E1105). El resto de las enzimas utilizadas en alimentación se consideran como parte del proceso o procedimiento de obtención de un determinado producto, según la directiva 95/2/EEC.

El número de enzimas heterólogas fúngicas aprobadas para su uso en alimentación no es muy grande, sin embargo, la lista se está incrementando continuamente (<http://www.enzymetechnicalassoc.org>).

1.2 Lipasas

1.2.1 Características generales

Las lipasas (triacilglicerol hidrolasas o carboxil esterases, EC 3.1.1.3) son enzimas que catalizan la hidrólisis o la síntesis de ésteres formados por glicerol y ácidos grasos de larga cadena ($\geq C_{10}$) (**Jaeger KE** y col., 1999) (**Figura 1**). Las lipasas constituyen una clase especial de esterases que actúan específicamente sobre ésteres insolubles en agua, en la interfase lípido-acuosa.

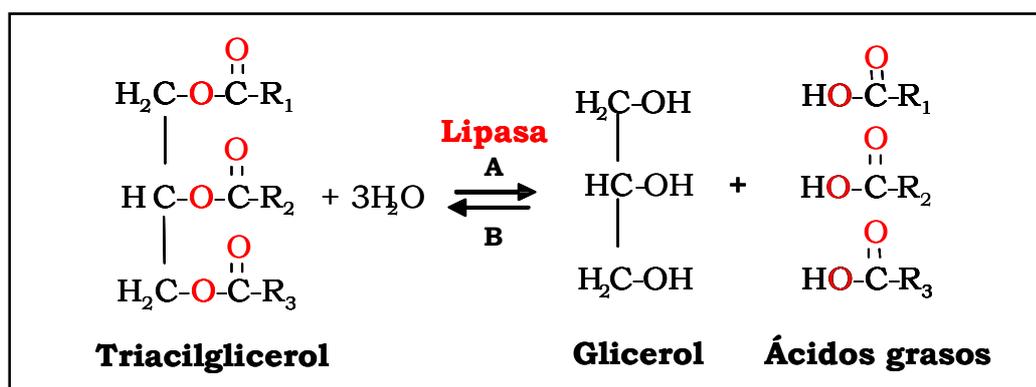


Figura 1. Acción catalítica de las lipasas. Un triglicérido puede ser hidrolizado hasta glicerol y ácidos grasos (A), o la reacción reversa que combina glicerol y ácidos grasos para formar el triacilglicérido (B).

A diferencia de ellas, las esterases (EC 3.1.1.1) hidrolizan ésteres en los que participan ácidos grasos de cadena corta ($< C_{10}$), realizando estas hidrólisis sobre sustratos solubles en agua (**Schmid RD** y **Verger R**, 1998; **Jaeger KE** y col., 1999).

Estas reacciones normalmente proceden con elevada regio- y/o enantioselectividad, convirtiendo a las lipasas en un importante grupo de biocatalizadores en química orgánica. Las razones para su enorme potencial biotecnológico residen en sus principales características (**Jaeger KE** y **Reetz MT**, 1998; **Schmid RD** y **Verger R**, 1998):

- Son estables en presencia de disolventes orgánicos.
- No requieren cofactores.
- Poseen una amplia especificidad de sustrato, ya que catalizan tanto la acilación como la deacilación de grasas y, además, actúan sobre otros sustratos no

naturales.

- Son altamente enantio- y regioselectivas.

Las lipasas se pueden encontrar en variedad de organismos, incluyendo microorganismos, plantas y animales. La base de datos *Lipase Engineering database* (<http://www.led.uni-stuttgart.de>) recoge un total de 1.367 secuencias de lipasas microbianas y serín-hidrolasas, agrupadas en 16 superfamilias (Pleis J y col., 2000) (**Tabla 1**).

Tabla 1. Familias de lipasas. Información obtenida de la base de datos *The Lipase Engineering database* (<http://www.led.uni-stuttgart.de>).

Superfamilia	Proteínas	Secuencias	Estructuras
Lipasas de <i>Bacillus</i>	6	9	2
Lipasas de <i>Burkholderia</i>	41	68	15
Lipasa de <i>Candida antarctica</i>	1	8	7
Cutinasas	21	71	44
Lipasas de hongos filamentosos	36	70	29
Lipasas gástricas	73	107	4
Lipoproteín lipasas	92	134	9
Lipasas de <i>Moraxella</i>	6	8	2
Peroxidasas no hemo	84	107	12
Lipasas de <i>Pseudomonas</i>	14	15	0
Lipasas de <i>Saccharomyces</i>	2	3	0
Carboxilesterasas	324	613	58
Esterasas de <i>Acinetobacter</i>	27	34	0
Lipasas de <i>Candida rugosa</i>	9	38	10
Lipasas sensibles a hormonas	68	80	5
Lipasas de <i>Yarrowia lipolytica</i>	2	2	0

Existe ambigüedad en cuanto al origen de algunas lipasas disponibles comercialmente provocado por los cambios en los nombres sistemáticos de algunas bacterias y hongos así como por la producción por parte de un mismo microorganismo de varias lipasas que sólo se diferencian en el patrón de glicosilación o en la maduración de la prolipasa generando mezclas de enzimas con

actividad lipolítica (**Tabla 2**).

Tabla 2. Ambigüedades sobre el origen de algunas lipasas disponibles comercialmente (**Schmid RD** y **Verger R**, 1998).

Organismo	Observaciones
<i>Candida rugosa</i>	Organismo formalmente clasificado como <i>Candida cylindracea</i> . La purificación de la proteína y la clonación del gen revelaron que el organismo produce al menos 5 isoformas de la lipasa.
<i>Geotrichum candidum</i>	Produce dos isoformas que difieren entre otras cosas en su especificidad frente a ácidos grasos Δ^9 insaturados.
<i>Rhizopus</i>	Aunque la literatura sugiere diferentes especificidades de las lipasas de <i>R. arrhizus</i> , <i>R. oryzae</i> , <i>R. delemar</i> y <i>R. niveus</i> , la clonación de los genes y su secuenciación revelaron la prácticamente completa identidad de las 4 enzimas.
<i>Penicillium camemberti</i>	Clasificada como lipasa de <i>P. cyclopium</i> hasta 1990. Contiene 4 isoformas de la lipasa que difieren en el patrón de glicosilación.
<i>Pseudomonas glumae</i>	La clonación y secuenciación del gen mostraron homología con la lipasa de <i>Chromobacterium viscosum</i> .
<i>Pseudomonas cepacia</i>	Reclasificada como <i>Burkholderia cepacia</i> en 1995. La clonación y secuenciación mostraron homología con la lipasa de <i>Pseudomonas sp.</i> ATCC21808.

1.2.2 Estructura y Mecanismo de acción

Las lipasas conocidas muestran un amplio rango de pesos moleculares, desde ~19 kDa (cutinasas) hasta ~60 kDa (lipasa de *Candida rugosa*). La mayoría de ellas, a excepción de las lipasas pancreáticas, están formadas por un único dominio. Todas las ellas presentan plegamiento α/β hidrolasa que consiste en una lámina β central hidrofóbica constituida por diferentes cadenas β ($\beta 1$ – $\beta 8$) conectadas por hasta seis α hélices anfifílicas (A-F) (**Jaeger KE** y **Reetz MT**, 1998; **Schmid RD** y **Verger R**, 1998; **Pleiss J** y col., 2000). Según la geometría del sitio de unión del ácido graso, las lipasas se subdividen en los tres grandes grupos que se muestran en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Subdivisión de las lipasas según la geometría del sitio de unión del ácido graso (**Schmidt-Dannert C** y col., 1998).

Grupo	Sitio de unión	Lipasas
Grupo I	Similar a una grieta (próximo a la superficie)	Familia <i>Rhizomucor</i>
Grupo II	Similar a un embudo	Familia lipasas gástricas, Familia <i>Pseudomonas cepacia</i> , y lipasa B de <i>Candida Antarctica</i>
Grupo III	Similar a un túnel	Familia <i>Candida rugosa</i>

La maquinaria catalítica está formada por una *triada aminoacídica*, constituida por serina, aspártico (o glutámico) e histidina (Ser-Asp/Glu-His). El residuo nucleofílico serina está localizado en el extremo C-terminal de la cadena β -5 en un pentapéptido altamente conservado (Gly-X-Ser-X-Gly, donde X puede ser cualquier aminoácido), formando una estructura característica β -giro- α llamada *codo nucleofílico* (**Figura 2**). La hidrólisis del sustrato comienza con un ataque nucleofílico por parte del oxígeno de la serina sobre el átomo de carbono carbonílico del enlace éster (**Figura 3**). Esto origina la formación de un intermediario tetraédrico estabilizado por el hidrógeno vinculado a los átomos de nitrógeno de los residuos de la cadena principal que pertenecen al llamado “agujero oxianión”. De esta forma se libera un alcohol, dejando detrás un complejo acil-lipasa, el cual es finalmente hidrolizado con la liberación del ácido graso y la regeneración de la enzima (**Jaeger KE** y **Reetz MT**, 1998; **Schmid RD** y **Verger R**, 1998; **Pleiss J** y col., 2000).

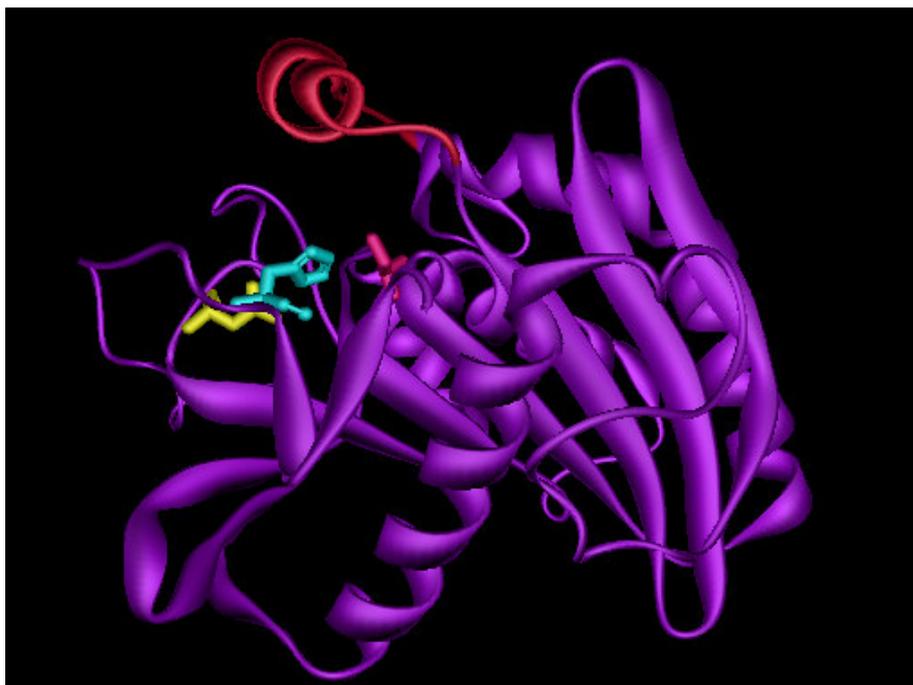


Figura 2. Modelo tridimensional para la lipasa (3TGL) de *Rhizomucor miehei* (Brady L y col., 1990). En fucsia se resalta la estructura correspondiente a la *tapadera peptídica*. La triada catalítica está constituida por los aminoácidos Ser144 (rosa), Asp203 (amarillo), His257 (azul).

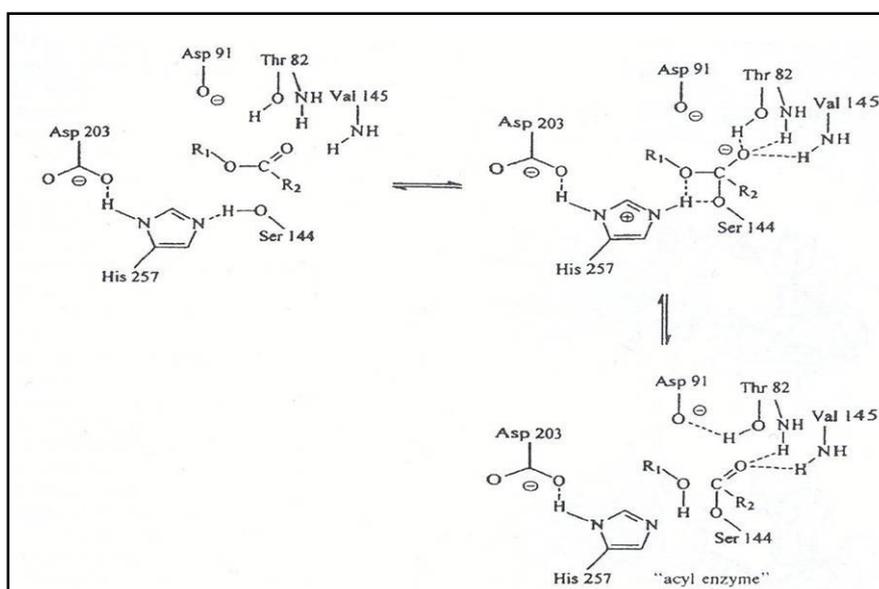


Figura 3. Mecanismo catalítico de las lipasas. La numeración de los aminoácidos en este ejemplo se refiere a la lipasa de *Rhizopus oryzae* (Schmid RD y Verger R, 1998).

Las reacciones lipolíticas tienen lugar en la interfase lípido-acuosa, lo que implica que la cinética de estas enzimas no puede ser descrita por las ecuaciones de Michaelis-Menten, que, por definición, sólo son válidas para reacciones catalíticas que tienen lugar en una fase homogénea.

Sarda y Desnuelle (**Sarda L** y **Desnuelle P**, 1958) demostraron cuantitativamente que la lipasa pancreática exhibía muy poca actividad cuando el sustrato, la triacetina (triacilglicerol constituido por ácidos grasos de cadena corta), estaba perfectamente solubilizado. Sin embargo, cuando se utilizaban concentraciones de triacetina por encima de su límite de solubilidad se formaban partículas emulsionadas que, sorprendentemente, eran hidrolizadas por la lipasa de una forma más eficiente.

Este fenómeno de catalisis de una reacción heterogénea es único de las lipasas e involucra una *activación interfacial*, es decir, un incremento en la actividad de la enzimática cuando la solubilidad del sustrato se excede y aparece una interfase lípido-acuosa. Esta característica se contrapone con el comportamiento de las esterasas, que actúan sobre ésteres solubles en agua y que muestran una dependencia, en cuanto a la concentración de sustrato, tipo Michaelis-Menten (**Verger R**, 1997; **Wong DWS**, 2003). Esta propiedad se ha utilizado durante mucho tiempo para diferenciar entre lipasas y esterasas.

A principios de la década de los 90 se elucidaron las primeras estructuras tridimensionales de estas enzimas. Tanto en la lipasa pancreática humana (**van Tilbeurgh H** y col., 1993) como en la lipasa de *Rhizomucor miehei* (**Brady L** y col., 1990) se podía apreciar un bucle o “loop” superficial que se denominó *tapadera peptídica* (ver **Figura 2**). Esta “tapadera” es un fragmento peptídico anfifílico que cubre el centro activo haciéndolo inaccesible al sustrato o al solvente. A la vista de esta estructura, se postuló que la “tapadera” tenía que sufrir un cambio conformacional en presencia de la interfase lípido-acuosa que explicaría el fenómeno de la activación interfacial.

Durante el transcurso del “European Lipase Project” (1990-1994) se llevó a cabo la elucidación de nuevas estructuras tridimensionales y se acumularon numerosos datos bioquímicos y cinéticos de las lipasas. Gracias a estos estudios se pudo concluir que no todas estas enzimas presentaban el fenómeno de la

activación interfacial, y que la presencia de una *tapadera peptídica* no se correlaciona necesariamente con dicha activación. Por ejemplo, las lipasas de *Pseudomonas glumae*, *P. aeruginosa* y *Candida Antarctica B* no muestran activación interfacial pero sí presentan una *tapadera peptídica* cubriendo el centro activo (**Verger R**, 1997; **Jaeger KE** y **Reetz MT**, 1998; **Schmid RD** y **Verger R**, 1998; **Reetz MT**, 2002).

Por lo tanto, ni la activación interfacial ni la presencia de una *tapadera peptídica* (hay lipasas que no la presentan) parecen ser criterios suficientes para determinar si una determinada esterasa pertenece o no a la subfamilia de las lipasas.

Por todo lo expuesto anteriormente, definiremos las lipasas como carboxilesterasas que catalizan la hidrólisis de acilglicérols de larga cadena (**Verger R**, 1997; **Jaeger KE** y **Reetz MT**, 1998; **Schmid RD** y **Verger R**, 1998).

1.2.3 Aplicaciones industriales de las lipasas

Además de su importancia biológica (son indispensables para la digestión de los lípidos), las lipasas tienen un gran potencial en áreas tales como tecnología alimentaria y la industria química y farmacéutica. En la **Tabla 4** se muestran algunas de las lipasas comerciales más utilizadas. Estas enzimas catalizan un amplio rango de reacciones incluyendo hidrólisis, interesterificaciones, alcoholisis, acidólisis, esterificación y aminólisis. Las lipasas pueden actuar en condiciones extremas, usando una gran variedad de disolventes orgánicos y, algunas de ellas, muestran selectividad muy estricta para un único tipo de reacción o sustrato (**Wong DWS**, 2003).

Las lipasas han pasado a ser una parte integral en la actual industria alimentaria. Se ha potenciado el uso de enzimas para mejorar procesos químicos tradicionales en la manufactura alimentaria y, las lipasas, se usan actualmente en la producción de una gran variedad de productos como quesos y alimentos preparados, entre otros (**Ashok P** y col., 1999).

1. Introducción

Tabla 4. Ejemplos de algunas lipasas microbianas disponibles comercialmente (**Jaeger KE** y **Reetz MT**, 1998; **Schmid RD** y **Verger R**, 1998).

Organismos	Masa (kDa)	Regio-especificidad	Aplicación	Casa comercial
<i>Candida rugosa</i>	60	Inespecifica	Síntesis orgánica	Amano, Biocatalyst, Boehringer Mannheim, Fluka, Genzyme, Sigma
<i>Candida Antarctica B</i>	60	sn-1,3	Síntesis orgánica	Boehringer Mannheim, Novozymes
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	30	Inespecifica	Aditivo de detergentes	Boehringer Mannheim, Novozymes
<i>Rhizomucor miehei</i>	30	sn-1,3	Procesamiento de alimentos	Novozymes, Biocatalysts, Amano
<i>Burkholderia cepacia</i>	33	Inespecifica	Síntesis orgánica	Amano, Fluka, Boehringer Mannheim
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	33	sn-1,3	Aditivo de detergentes	Genencor
<i>Pseudomonas mendocina</i>	33	sn-1,3	Aditivo de detergentes	Genencor
<i>Chromobacterium viscosum</i>	33	sn-1,3	Síntesis orgánica	Asahi, Biocatalysts

Las lipasas de origen microbiano se han utilizado para la producción de determinados sabores en quesos y otros alimentos por la producción de ácidos grasos volátiles. Dependiendo de la especificidad de las lipasas empleadas pueden liberarse ácidos grasos de cadena corta (C4-C6), que aportan un sabor fuerte y penetrante, o bien pueden liberarse ácidos grasos de cadena larga (>C12), de aspecto más jabonoso, que son metabolizados por los microorganismos presentes en el queso para producir otros productos aromáticos, como β -cetoácidos (**Schmid RD** y **Verger R**, 1998).

Estas enzimas, además, pueden ser utilizadas para la interesterificación de grasas y aceites, produciendo acilglicérols modificados que no pueden obtenerse mediante química tradicional, o para la obtención de lípidos estructurados (**Schmid RD** y **Verger R**, 1998; **Ashok P** y col., 1999; **Sharma R** y col., 2001). Así, por

ejemplo, se puede alterar el punto de fusión de un aceite modificando la composición y/o estructura de sus triglicéridos mediante esterificación, utilizando como co-sustratos determinados ácidos grasos u otros triglicéridos de diferente composición (**Schmid RD y Verger R**, 1998).

Además, la acción catalítica de las lipasas ha permitido el desarrollo de nuevos productos como los ésteres de carbohidratos y ácidos grasos (sucroésteres), con un mercado potencial interesante como surfactantes en alimentos, fármacos y cosméticos (**Ashok P** y col., 1999).

En EE.UU. existen varias lipasas que han logrado el estatus GRAS (Generally Recognised As Safe) de la FDA (<http://vm.cfsan.fda.gov>):

- Lipasa pancreática de origen animal, para la preparación de ácidos grasos que forman parte de glicéridos.
- Lipasa de *Rhizopus niveus*, para la interesterificación de grasas y aceites.
- Lipasa-esterasa de *Rhizomucor miehei*, para su uso como potenciador del aroma en quesos, en aceites y grasas y en productos lácteos.
- Lipasa de *Candida rugosa* para la modificación de grasas y aceites.

Además, también han obtenido este estatus de seguridad tres enzimas de origen recombinante:

- Lipasa recombinante de *Thermomices lanuginosus* producida por *A. oryzae*, para su utilización en productos de panadería y en industria de grasas y aceites.
- Lipasa recombinante de *Fusarium oxysporum* producida por *A. oryzae*, para su uso como ayuda al procesamiento en la modificación de grasas y aceites así como en productos de panadería.
- Lipasa recombinante procedente de una construcción génica que contiene el gen modificado de la lipasa de *T. lanuginosus* y una porción del gen de la lipasa de *F. oxysporium*, expresado por *A. oryzae*, como ayuda al procesamiento en productos de panadería, yemas de huevo, así como grasas y aceites.

Según la “Association of Manufactures and Formulators of Enzyme Products” (AMFEP) las lipasas de origen microbiano que se encuentran disponibles comercialmente en Europa son las que figuran en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Lipasas de origen microbiano comercializadas en Europa.

Organismo Hopedador	Organismo Donador
<i>Aspergillus niger</i>	Ninguno
<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Candida sp.</i> <i>Fusarium sp.</i> <i>Rhizomucor sp.</i> <i>Thermomyces sp.</i>
<i>Candida lipolytica</i>	Ninguno
<i>Candida rugosa</i>	Ninguno
<i>Mucor javanicus</i>	Ninguno
<i>Penicillium roqueforti</i>	Ninguno
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	<i>Pseudomonas sp.</i>
<i>Rhizomucor miehei</i>	Ninguno
<i>Rhizopus delemar</i>	Ninguno
<i>Rhizopus niveus</i>	Ninguno
<i>Rhizopus oryzae</i>	Ninguno

Las lipasas también tienen aplicación en biomedicina debido a su excelente capacidad para catalizar reacciones con elevada regioespecificidad, en una gran variedad de solventes orgánicos y con un amplio abanico de sustratos. Además presentan una elevada enantioselectividad lo que les permite diferenciar entre isómeros *S* y *R*. La lipasa de *Candida rugosa* es altamente (*S*)-específica mientras que otras lipasas como las de *Mucor* y *Rhizopus* presentan la misma enantioselectividad pero de forma menos específica (**Ashok P** y col., 1999). La lipasa de *Pseudomonas aeruginosa* se emplea en la obtención de compuestos enantioméricamente puros para síntesis en química orgánica (**Jaeger KE** y col., 1997; **Sharma R** y col., 2001).

Sin embargo, la aplicación industrial más importante de este tipo de enzimas es su inclusión en la formulación de detergentes. En 1994, Novo Nordisk (Novozymes) introdujo Lipolase™, la primera lipasa recombinante comercial para su uso en detergentes, obtenida mediante la clonación del gen de la lipasa de

Humicola lanuginosa en el genoma de *Aspergillus oryzae*.

Otras aplicaciones industriales de las lipasas incluyen, por ejemplo, el procesamiento del cuero para eliminar la grasa subcutánea (industria de encurtidos), tratamiento de la pulpa en la industria papelera o síntesis orgánica de pesticidas mediante reacciones de síntesis estereoespecíficas (**Schmid RD y Verger R**, 1998; **Ashok P** y col., 1999; **Sharma R** y col., 2001).

1.2.4 Lipasas de *Galactomyces geotrichum*

Galactomyces geotrichum es un hongo filamentoso (Filum Ascomycota, Orden Saccharomycetales) que se caracteriza por la formación de esporas transparentes mediante la segmentación de los filamentos vegetativos (**Figura 4**). *G. geotrichum* es un organismo *holomorfo*, es decir, en él coexisten las dos formas de reproducción (sexual y asexual): la forma de multiplicación asexuada da origen al *anamorfo* (*Geotrichum candidum*) o estado imperfecto, y la sexuada al *teleomorfo* (*Galactomyces geotrichum*) o estado perfecto.



Figura 4. *Galactomyces geotrichum* BT107 crecido en placas de medio PDA.

Este hongo se encuentra en diversos hábitats. Está presente como un componente de la flora natural de la leche y se usa como agente madurador de quesos suaves y fuertes. Sus lipasas y proteasas producen la liberación de

ácidos grasos y péptidos que pueden ser metabolizados por otras poblaciones microbianas promoviendo el desarrollo de diferentes aromas, entre otras propiedades. Este microorganismo presenta variabilidad fenotípica y puede actuar como un patógeno oportunista, causando geotricosis.

En *G. geotrichum* ATCC 34614 se han aislado y secuenciado dos ADN complementarios correspondientes a genes de lipasas (**Shimada Y** y col., 1989; **Shimada Y** y col., 1990). Posteriormente, los mismos autores purificaron las dos isoenzimas correspondientes, llamadas lipasa I y lipasa II (**Sugihara A** y col., 1990) y concluyeron que ambas formas no presentaban diferencias significativas en cuanto a selectividad de sustrato, aunque si mostraban pequeñas diferencias en algunas propiedades bioquímicas.

Sin embargo, Sidebottom y colaboradores (**Sidebottom CM** y col., 1991) mostraron que dos lipasas, isoenzimas, de otra cepa de *G. geotrichum* (CMICC 335426), a las que llamaron lipasas A y B, tenían una marcada diferencia en cuanto a especificidad de sustrato. Las dos isoformas presentaban preferencia por ácidos grasos de cadena larga pero, además, la lipasa B era más selectiva frente a sustratos con insaturaciones *cis* en posición 9. Posteriormente, por comparación de especificidades y secuencias peptídicas parciales revelaron que la lipasa A es similar a la lipasa II y la lipasa B a la lipasa I. Los resultados contradictorios referentes a la especificidad de sustrato de las enzimas se pudieron originar por la expresión diferencial de los dos genes en las diferentes condiciones de cultivo utilizadas por los ambos grupos (**Bertolini MC** y col., 1994).

Por lo tanto, podemos hablar de la producción por parte de *G. geotrichum* de dos lipasas extracelulares denominadas lipasa I y lipasa II, codificadas por los genes *lipI* y *lipII*, respectivamente, y que pertenecen a la familia de lipasas de *Candida rugosa*.

El gen *lipI* tiene un tamaño de 1.692 pb y el gen *lipII* de 1.767 pb. La expresión de ambos genes se induce al crecer el hongo en presencia de ácidos grasos de cadena larga, siendo mayor en el caso de *lipII*. Este hecho se debe a la existencia de una región en el promotor de estos genes implicada en la inducción de la expresión en presencia de este tipo de ácidos grasos, teniendo, en el caso del promotor del gen *lip II*, una estructura particular que conlleva una mayor eficiencia transcripcional (**Nagao T** y col., 1996). En ambos genes no hay presencia de intrones. La similitud

entre las secuencias, a nivel de nucleótidos, es muy alta, siendo esta del 86% (**Nagao T** y col., 1993; **Holmquist M** y col., 1998).

La lipasa I (GGLIP 1) tiene un tamaño de 63 kDa y 563 aminoácidos y la lipasa II (GGLIP 2) de 66 kDa y 587 aminoácidos. Ambas enzimas presentan diferentes especificidades de sustrato, las cuales se muestran en la **Tabla 6**. Las diferencias detectadas en la secuencia de los primeros 194 aminoácidos del extremo N-terminal entre ambas lipasas (12 de las cuales están en la región de la “tapadera”) no parece contribuir a la diferente especificidad de sustrato señalada entre las dos enzimas (**Bertolini MC** y col., 1995; **Holmquist M** y col., 1997; **Tessier DC** y **Cygler M**, 1997).

Tabla 6. Especificidad de sustrato de las lipasas I y II de *G. geotrichum* ATCC 34614 (**Bertonili MC** y col., 1995).

Sustrato	Lipasa I	Lipasa II
Trioleína (C18:1 ω 9), Trilinoleína (C18:2 ω 9), Trilinolenina (C18:3 ω 9)	Elevada	Moderada
Triglicéridos con ác. grasos de cadena media (C8, C10, C12, C14)	Baja	Moderada
Triglicéridos con ác. grasos de cadena corta (C4-C6)	Baja	Baja
Tripalmitina (C16:0)	Muy baja	Muy baja
Triestearina (C18:0)	Muy baja	Muy baja

Ambas proteínas tienen características bioquímicas muy similares por lo que la purificación de ambas a partir del medio de cultivo es muy complicada. Para realizar la purificación y caracterización de cada proteína, debe procederse a la clonación de sus respectivos genes y a la expresión de los mismos en un sistema heterólogo. De esta manera, el gen *lip* I ha sido expresado en *Saccharomyces cerevisiae* (**Bertolini MC** y col., 1995) y en *Pichia pastoris* (**Holmquist M** y col., 1997) con el fin de realizar su caracterización bioquímica.

La única estructura tridimensional disponible de una lipasa del género *Galactomyces* es la de la lipasa 1 THG de *G. geotrichum* ATCC 34614 cristalizada con una resolución de 2,2 Å (**Schrag JD** y col., 1991) y otra posterior de mayor resolución, 1,8 Å (**Schrag JD** y **Cygler M**, 1993). En esta estructura se puede

destacar la región correspondiente a la *tapadera peptídica*, así como la triada catalítica (**Figura 5**). La *tapadera peptídica* está constituida por dos α hélices y un *loop* dispuesto entre ellas. El sitio catalítico de la enzima está muy próximo al centro de la molécula y, en la conformación observada en la estructura cristalográfica, es inaccesible al solvente (**Schrag JD y Cygler M, 1993**).



Figura 5. Modelo tridimensional de la lipasa I de *Galactomyces geotrichum* ATCC 34614. En fucsia se resalta la estructura correspondiente a la *tapadera peptídica*. La triada catalítica está constituida por los aminoácidos Ser217 (azul), Glu354 (amarillo), His463 (rosa).

1.3 Ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs)

1.3.1 Definición y clasificación de los ácidos grasos

Los ácidos grasos son moléculas débilmente anfipáticas constituidas por una cadena lineal hidrocarbonada que posee, en uno de sus extremos, un grupo carboxilo. Según la naturaleza de la cadena hidrocarbonada, los ácidos grasos pueden ser saturados, monoinsaturados (con un solo doble o triple enlace) o poliinsaturados (con varias insaturaciones). Las grasas que contienen una gran proporción de ácidos grasos saturados son sólidas a temperatura ambiente. Se conocen como grasas saturadas y, normalmente, son de origen animal (por ejemplo, manteca, sebo y mantequilla). La mayoría de las grasas vegetales son ricas en grasas poliinsaturadas o monoinsaturadas, excepto las grasas de palma y de coco, que son muy saturadas.

A lo largo de los años se han propuesto un gran número de sistemas de nomenclatura. En la terminología estándar de la IUPAC (*The International Union of Pure and Applied Chemists*) el ácido graso se nombra tomando como base el hidrocarburo parental. Así, un ácido carboxílico de 18 átomos de carbono se nombra ácido octadecanoico. En el caso de los ácidos grasos insaturados, los dobles enlaces se designan usando la configuración Δ que representa la distancia desde el carbono carboxílico (carbono número uno) hasta el doble enlace. Por ejemplo, el doble enlace entre los átomos de carbono 9° y 10° presente en el ácido oleico (9- octadecaenoico) se representaría como C18:1 Δ^9 (O'Keefe SF, 2002).

La geometría del doble enlace se designa con los sistemas de nomenclatura *cis/trans* o *E/Z* aunque es el primer sistema el que se utiliza más habitualmente. El término *cis/trans* se utiliza para describir las posiciones de los átomos o grupos conectados a los átomos de carbono unidos por el doble enlace. Los átomos o grupos son *cis* si están dispuestos en el mismo lado, o *trans* si están opuestos con respecto al plano de la molécula (**Figura 6**). Los prefijos *cis* y *trans* se pueden abreviar como *c* y *t* en las fórmulas estructurales.

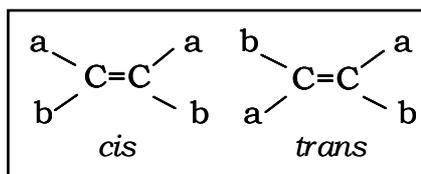


Figura 6. Nomenclatura *cis/trans*.

Para los ácidos grasos insaturados existe una nomenclatura abreviada, con la letra griega ω (omega) (**Tabla 7**). En este sistema la designación comienza con el número de átomos de carbono del ácido graso, seguido por el número de dobles enlaces y por último la posición del último doble enlace más próximo al último metilo del ácido graso (que sería el grupo metilo número uno). Así, por ejemplo, ácido oleico (C18:1 Δ^9) también se abreviaría como C18:1 ω 9. Se asume en esta nomenclatura que los ácidos grasos tienen dobles enlaces *cis* y si el ácido graso es poliinsaturado los dobles enlaces son conjugados.

En ocasiones el símbolo ω es reemplazado por *n*- (por ejemplo, 18:2 n -6 en lugar de 18:2 ω 6). Aunque ha habido recomendaciones para eliminar ω y usar sólo *n*-, ambos se utilizan en la literatura y son equivalentes (**O'Keefe SF**, 2002).

Tabla 7. Nombres sistemáticos, comunes y abreviados de los ácidos grasos insaturados.

Nombre sistemático	Nombre común	Abreviada
c-9-Dodecaenoico	Lauroleico	12:1 ω3
c-5-Tetradecaenoico	Fiseterico	14:1 ω9
c-9-Tetradecaenoico	Miristoleico	14:1 ω5
c-9-Hexadecaenoico	Palmitoleico	16:1 ω7
c-7, c-10, c-13-Hexadecatrienoico		16:3 ω3
c-4, c-7, c-10, c-13-Hexadecatetraenoico		16:4 ω3
c-9-octadecaenoico	Oleico	18:1 ω9
c-11-octadecaenoico	cis-vacénico	18:1 ω7
c-9, c-12-octadecadienoico	Linoleico	18:2 ω6
c-9, c-12, c-15-octadecatrienoico	Linolénico	18:3 ω3
c-6, c-9, c-12-octadecatrienoico	γ-linolénico	18:3 ω6
c-6, c-9, c-12, c-15-octadecatetraenoico	Estearidónico	18:4 ω3
c-11-eicosaenoico	Gondoico	20:1 ω9
c-9-eicosaenoico	Gadoleico	20:1 ω11
c-8, c-11, c-14-eicosatrienoico	Dihomo- γ-linolénico	20:3 ω6
c-5, c-8, c-11-eicosatrienoico		20:3 ω9
c-5, c-8, c-11, c-14-eicosatetraenoico	Araquidónico	20:4 ω6
c-5, c-8, c-11, c-14, c-17-eicosapentaenoico	Eicosapentaenoico (EPA)	20:5 ω3
c-13-docosaenoico	Erucico	22:1 ω9
c-11-docosaenoico	Cetoleico	22:1 ω11
c-7, c-10, c-13, c-16, c-19-docosapentaenoico	DPA	22:5 ω3
c-4, c-7, c-10, c-13, c-16, c-19-docosahexaenoico	Docosahexaenoico (DHA)	22:6 ω3
c-15-tetracosanoico	Nervónico	22:1 ω9

1.3.2 Importancia biológica

Mientras que las grasas saturadas y monoinsaturadas no son esenciales en la dieta, ya que el cuerpo humano es capaz de sintetizarlas, existen dos ácidos grasos poliinsaturados que el cuerpo no puede producir: el ácido linoleico (18:2 ω 6) que da lugar a la serie ω 6 y el ácido α -linolénico (18:3 ω 3) que da origen a la serie ω 3. Ambos deben obtenerse de la dieta y se conocen como *ácidos grasos esenciales*. Una vez ingeridos, estos ácidos grasos dan lugar, por medio de reacciones de desaturación, a otros ácidos grasos como el ácido araquidónico, ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA) (**Figura 7**). Sin embargo, la conversión de α -linolénico en EPA o DHA es relativamente baja ya que sólo un 10-15% de la concentración de este ácido graso se convierte en EPA (20:5 ω 3) y alrededor de un 4% en DHA (22:6 ω 3) (**Emken EA** y col., 1994; **Gerster H**, 1998; **Davis BC** y **Kris-Etherton PM**, 2003).

Los ácidos grasos esenciales tienen muchos efectos beneficiosos en el organismo: son importantes para mantener la estructura y la función de la membrana celular y las membranas subcelulares, para producir las prostaglandinas que regulan muchos procesos corporales como, por ejemplo, la inflamación y para la coagulación sanguínea. Los ácidos grasos esenciales son importantes también para el correcto desarrollo, especialmente de los vasos sanguíneos y los nervios. También mantienen la piel y otros tejidos jóvenes y flexibles debido a su capacidad lubricante (**O'Keefe SF**, 2002).

Las principales fuentes de obtención de ácido α -linolénico en alimentación humana son los aceites de semillas como el aceite de colza, girasol, maíz o soja, entre otros. El aceite de linaza es un aceite excepcional que contiene tanto ácido linoleico como α -linolénico en abundantes cantidades, siendo la fuente natural más rica en ácido α -linolénico.

Por otro lado, los aceites de pescado de aguas saladas frías como el arenque, el merlango, el bacalao, la caballa, sardinas y anchoas son también ricos en ácidos grasos poliinsaturados ω 3 de larga cadena (PUFAs), EPA y DHA. El contenido en PUFAs varía según la especie de pescado que se trate, la localización geográfica y la temporada de captura (**Tabla 8**).

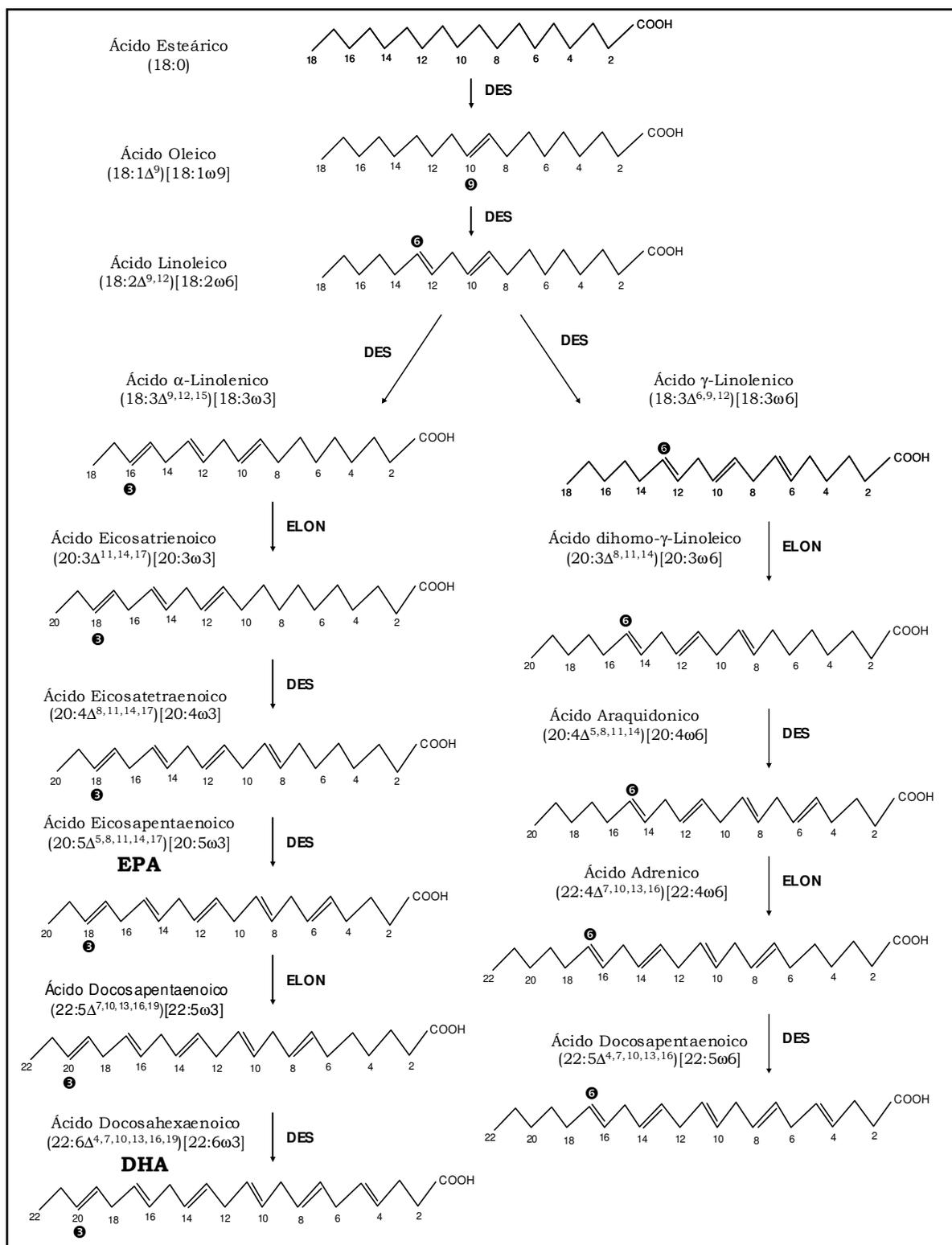


Figura 7. Ruta de síntesis de los ácidos grasos de la serie ω -3 y ω -6. ELON: elongasa, DES: desaturasa.

Tabla 8. Contenido aproximado de PUFAs ω 3 en diferentes especies de pescado (**Schmidt EB** y col., 2001).

Pescado	g PUFAs ω-3/100 g
Caballa	1,8-5,3
Arenque	1,2-3,1
Salmón	1,0-2,0
Trucha	0,5-1,6
Atún	0,5-1,6
Halibut	0,5-1,0
Gamba	0,2-0,4
Bacalao, Platija	~ 0,2

Una tercera fuente de PUFAs de cadena larga son algunas especies de hongos, bacterias y microalgas marinas que forman parte del fitoplancton (**Sijtsma L** y **de Swaaf ME**, 2004). Algunas de estas últimas pueden ser fototrofas (*Skeletonema costatum*, *Isochrysis galbana*) o heterótrofas (*Thraustochytrium aereum*, *Schizochytrium* sp., *Cryptocodinium cohnii*) La mayor parte de los PUFAs que producen estos microorganismos se encuentra en forma de triglicéridos, que es la forma preferida de ingestión de lípidos en la dieta (**Kendrick A** y **Ratledge C**, 1992). Algunas empresas han desarrollado tecnologías de fermentación a partir de estas microalgas heterótrofas y comercializan aceites ricos en DHA destinados principalmente a su uso como suplementos alimentarios o para la preparación de alimentos infantiles (**Ratledge C**, 2004).

Efectos beneficiosos de los PUFAs ω 3 a nivel cardiovascular

Hay algunos datos epidemiológicos que muestran que poblaciones con un elevado consumo de PUFAs ω 3 procedente de pescado tienen un índice más bajo de enfermedades coronarias.

El consumo de PUFAs de cadena larga procedentes de pescado varía mucho en las diferentes poblaciones. Este consumo es muy elevado en el caso de los esquimales de Groenlandia (10-14 g/día), intermedia en países como Japón y

Noruega (1-3 g/día) y baja en las poblaciones occidentales (<0,5 g/día).

El consumo de 1 ó 2 piezas de pescado al día reduce la mortalidad provocada por estas enfermedades en poblaciones de alto riesgo (**Schmidt EB** y col., 2001; **Holub BJ**, 2002). Esto se ha visto más claramente en poblaciones de esquimales de Groenlandia y de Alaska. En el caso de Japón se ha observado que la incidencia de patologías coronarias era menor en las zonas costeras de pesca en comparación con las zonas rurales del interior, con un menor consumo de pescado.

La FDA de los EE. UU. publicó en septiembre de 2004 una nota indicando que los alimentos que contienen EPA o DHA pueden contribuir a reducir el riesgo de sufrir enfermedades coronarias.

Diversos estudios han demostrado efectos beneficiosos de los PUFAs ω 3 en aterosclerosis experimental, utilizando diferentes modelos animales tales como cerdos, monos, ratones y conejos, reduciendo los niveles de colesterol y triacilglicéridos totales (**Mortesen A** y col., 1998).

Algunos de los efectos antiateroscleróticos favorecidos debido al consumo de los PUFAs ω 3 son:

- Incrementan ligeramente los niveles de la lipoproteína antiaterogénica HDL2 y disminuyen sustancialmente los niveles de triacilglicéridos (**Schmidt EB** y col., 2001; **Nordoy A**, 2001), colesterol total y lipoproteína Apo B presentes en el plasma (**Baró L** y col., 2003; **Carrero JJ** y col., 2004; **Carrero JJ** y col., 2005).
- Disminuyen la presión sanguínea entre 2-5 mmHg, particularmente en pacientes con hipertensión, así como la viscosidad sanguínea (**Nordoy A**, 2001; **Schmidt EB** y col., 2001; **Holub BJ**, 2002).
- Reducen la agregación plaquetaria y la formación de tromboxanos que participan en las patologías arteriales (**Horrocks LA** y **Yeo YK**, 1999; **Schmidt EB** y col., 2001).
- Mejoran la función de la pared vascular e inhiben la proliferación de las células de músculo liso vascular (**Horrocks LA** y **Yeo YK**, 1999; **Schmidt EB** y col., 2001; **Holub BJ**, 2002; **Wijendran V** y **Hayes KC**, 2004).
- Previenen las arritmias cardíacas evitando la sobrecarga de calcio en los

miocitos durante periodos de stress y protegen frente a los paros cardiacos. Un aporte de 5,5 g de ácidos grasos ω 3 por mes (que equivale a una comida con grasa de pescado a la semana) se ha asociado a una reducción del 50% en este riesgo, después del ajuste de factores tales como edad, historia familiar, actividad física, educación y hábito de fumar (**Horrocks LA** y **Yeo YK**, 1999; **Wijendran V** y **Hayes KC**, 2004).

El consumo de PUFAs ω 3 de pescado, principalmente EPA y DHA, y eventualmente de PUFAs ω 3 de plantas, como el α -linolénico, se considera una dieta saludable, baja en grasas saturadas, ideal para todo el mundo, mientras que la administración adicional de concentrados en PUFAs ω 3 se podrían administrar a grupos especiales de pacientes (**Nordoy A**, 2001).

En los casos en los que en la dieta no se consuma la cantidad adecuada de alimentos que contengan PUFAs ω 3, éstos se pueden añadir a alimentos de consumo habitual como leche, yogurt, pan o zumos, dando lugar a los llamados “alimentos funcionales”.

La incorporación de PUFAs ω 3 a un preparado lácteo se ha llevado a cabo en Puleva Biotech, S.A., en donde se ha comprobado, a través de estudios en humanos, como el consumo de este tipo de producto contribuye a disminuir el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares (**Carrero JJ** y col., 2004).

Otros efectos beneficiosos de los PUFAs ω 3

Los ácidos grasos poliinsaturados ω 3 desempeñan funciones muy importantes en la gestación, lactancia e infancia ya que son constituyentes de los fosfolípidos de las membranas celulares y forman parte de las estructuras neuronales. Las necesidades de estos ácidos grasos se incrementan durante estos periodos ya que son fases de crecimiento y desarrollo del tejido celular.

De acuerdo con la ISSFAL (*Internacional Society for the Study of Fatty Acids and Lipids*), cantidades adecuadas de ácido araquidónico y DHA son necesarias para el crecimiento y desarrollo funcional del cerebro, así como para el desarrollo de la agudeza visual en niños. Tanto la integridad neuronal como su función pueden ser permanentemente dañadas por el déficit en ácidos grasos esenciales, tanto ω 3 como

$\omega 6$ durante el desarrollo fetal y neonatal.

Durante el desarrollo fetal el DHA es transportado preferentemente a través de la placenta a la circulación fetal. El cerebro del feto puede producir una cantidad limitada de DHA a partir de su precursor, el α -linolénico. El hígado fetal e infantil también puede producir algo de DHA pero, probablemente, no lo suficiente para un óptimo desarrollo. Los niños adquieren los ácidos grasos esenciales inicialmente en el útero durante el embarazo y posteriormente en la dieta a través de la leche materna (**Horrocks LA** y **Yeo YK**, 1999).

A propuesta de un informe del SCF (*Scientific Committee on Food*), ahora sustituido por la EFSA (*European Food Safety Authority*), sobre “La revisión de los requerimientos esenciales de las fórmulas infantiles y de continuación” (SCF/CS/NUT/IF/65 final, 18 Mayo 2003) se establece que el contenido de ácidos grasos PUFAs $\omega 3$ no debe superar el 1% del contenido total en ácidos grasos y, a su vez, la concentración de DHA no debe ser inferior al 0,2%. Estas cantidades se propusieron en base a los estudios de los efectos del DHA en niños.

En adultos, los ácidos grasos poliinsaturados de larga cadena, particularmente el DHA, pueden reducir el desarrollo de depresión unipolar (**Horrocks LA** y **Yeo YK**, 1999; **Green P** y col., 2005). La aparición de este tipo de depresión se correlaciona bien con un déficit en la ingesta de ácidos grasos esenciales $\omega 3$. Así, la tasa de depresión es menor en sociedades que consumen grandes cantidades de pescado. Por ejemplo, en Japón esta tasa es del 0,12% mientras en los EE. UU se sitúa en un 3%. El DHA también es importante durante el envejecimiento celular, para el tratamiento y prevención de la demencia senil (**Horrocks LA** y **Yeo YK**, 1999). Además el déficit de PUFAs $\omega 3$ está asociado con la pérdida de memoria y con la disminución de las funciones cognitivas (**Jump DB**, 2002). DHA y EPA están relacionados con multitud de aspectos de la función neuronal, incluyendo neurotransmisión, fluidez de membranas, canales iónicos así como regulación enzimática y expresión génica. Existen estudios que sugieren que el aporte de PUFAs $\omega 3$, concretamente de DHA, podría disminuir la prevalencia de la enfermedad de Alzheimer (**Lim GP** y col., 2005). Algunos estudios recientes indican que el incremento del aporte diario de PUFAs $\omega 3$ puede reducir la aparición de comportamientos agresivos y violentos (**Hibbeln JR** y col., 2004).

Debido a sus propiedades antiinflamatorias, los PUFAs podrían contribuir a

mejorar de los síntomas en enfermedades como la artritis reumatoide o el asma mediante la supresión de la síntesis de citoquinas proinflamatorias como el TNF, la interleuquina 1 e interleuquina 6 (**Artemis P** y **Simopoulos MD**, 2002; **Wijendran V** y **Hayes KC**, 2004) y alterando las funciones de linfocitos, monocitos y macrófagos, (**Horrocks LA** y **Yeo YK**, 1999; **Schmidt EB** y col., 2001).

Además existen algunos estudios que indican que los PUFAs podrían prevenir o reducir la progresión de ciertos tipos de cáncer (**Simopoulos AP**, 2002), como, por ejemplo, el de mama (**Goodstine SL** y col., 2003), próstata (**Terry P** y col., 2001) o colon (**Oh K** y col., 2005)

1.3.3 Procedimientos para la obtención de aceites enriquecidos en EPA y DHA

Las principales fuentes de EPA y DHA son los aceites de pescado obtenidos habitualmente como subproducto del procesamiento del mismo (**Schmitt-Rozieres M** y col., 2000). Estos aceites contienen alrededor de un 30% de PUFAs $\omega 3$ combinados con diferentes ácidos grasos principalmente en forma de triglicéridos. Se han desarrollado varios métodos para la purificación de PUFAs a partir de este tipo de aceites mediante métodos químicos o métodos enzimáticos (**Shahidi F** y **Wanasundara UN**, 1998).

1.3.3.1 Métodos químicos

Mediante métodos cromatográficos es posible separar ácidos grasos en función de su número de átomos de carbono así como del grado de insaturaciones que posean utilizando HPLC o cromatografía con resina de plata (**Robles Medina A** y col., 1998; **Shahidi F** y **Wanasundara UN**, 1998).

La destilación molecular se ha utilizado para la separación parcial de mezclas de ésteres de ácidos grasos. Este método tiene la ventaja de las diferencias en el punto de ebullición y el peso molecular de éstas moléculas bajo una presión reducida (0,1-1,0 mmHg). Un inconveniente que presenta esta metodología es que se requieren elevadas temperaturas (250°C) que favorecen la oxidación,

polimerización e isomerización de los dobles enlaces presentes en estos ácidos grasos (**Rosu R** y col., 1998; **Shahidi F** y **Wanasundara UN**, 1998). Por este motivo, los triglicéridos son transformados en etil ó metil ésteres que tienen puntos de ebullición más bajos y pueden ser separados más fácilmente por destilación en vacío. La principal desventaja de este método es el uso de grandes cantidades de disolventes tanto para la reacción como para la separación de los productos.

Los PUFAs ω 3 de elevada pureza se encuentran disponibles comercialmente en forma de etil o metil ésteres. Así, por ejemplo, el etil éster del EPA está siendo utilizado en Japón desde 1990 para el tratamiento de hiperlipemia y arteriosclerosis (**Rosu R** y col., 1998).

Otros métodos químicos para concentrar PUFAs ω 3 son la cristalización a baja temperatura y la formación de complejos con urea (**Shahidi F** y **Wanasundara UN**, 1998; **Robles Medina A** y col., 1998). El primero se basa en las diferencias de solubilidad de las grasas en disolventes orgánicos. Esta solubilidad disminuye cuando se incrementa el peso molecular y aumenta cuando el número de insaturaciones es mayor. Por otro lado, los ácidos grasos saturados de seis ó más átomos de carbono forman complejos con urea, que precipitan. La formación de estos complejos se dificulta cuando se incrementan el número de insaturaciones presentes en la molécula (**Shahidi F** y **Wanasundara UN**, 1998).

1.3.3.2 Métodos enzimáticos

Hay estudios que indican como los PUFAs se absorben más eficientemente en forma de triglicéridos que como etil o metil ésteres (**Lawson LD** y **Hughes BG**, 1988). Por lo tanto, desde un punto de vista nutricional, los triglicéridos de PUFAs son la forma más deseada como ingrediente alimentario.

En los últimos años diversos investigadores han utilizado lipasas de origen microbiano para producir concentrados de PUFAs ω 3 a partir de la hidrólisis de aceites de pescado. En función del tipo de microorganismo del que proceden, existen lipasas que muestran preferencia por los ésteres de DHA frente a los ésteres de EPA y viceversa.

La actividad de las lipasas microbianas frente a los ésteres de ácidos grasos

poliinsaturados es baja debido a los impedimentos estéricos derivados de la estructura de estas moléculas. Ello se debe a la aparición de “codos” en la molécula a causa de los dobles enlaces, de forma que el grupo metilo terminal de ácido graso aparece próximo al enlace éster (**Shahidi F y Wanasundara UN**, 1998). Los PUFAs EPA y DHA contienen, respectivamente, 5 y 6 insaturaciones en sus cadenas hidrocarbonadas por lo que se dificulta enormemente el acceso de la lipasa al enlace éster entre éstos y el glicerol.

Tanaka y colaboradores (**Tanaka Y** y col., 1992) utilizaron seis tipos de lipasas para hidrolizar aceite de atún y comprobaron que la lipasa de *Candida cylindracea* mostraba baja actividad frente a ésteres de DHA, incrementando la concentración de este ácido graso en forma de glicérido, al doble que en el aceite original. Además, en el mismo trabajo, comprobaron que el contenido de EPA en aceite de atún disminuía tras la hidrólisis con las lipasas de *Rhizopus delemar* y *Rhizopus javanicum*.

Shimada y colaboradores (**Shimada Y** y col., 1994; **Shimada Y** y col., 1995) hidrolizaron aceite de atún con la lipasa I de *Galactomyces geotrichum* logrando incrementar el contenido de EPA y DHA en la fracción no hidrolizada en un 54,5% y 57%, respectivamente. Al realizar este mismo proceso con la lipasa de *C. cylindracea* obtuvieron glicéridos con un 65,6 % de DHA y un 34,5% de EPA.

El contenido en PUFAs puede enriquecerse, en la fracción de ácidos grasos libres, mediante una esterificación selectiva en presencia de etanol y glicerol, y empleando una lipasa que tenga baja actividad sobre PUFAs en comparación con el resto de ácidos grasos de la mezcla (**Shahidi F y Wanasundara UN**, 1998; **Shimada Y** y col., 2001). Desafortunadamente existen muy pocas lipasas que realicen este proceso de forma eficiente.

Algunas lipasas muestran diferente selectividad entre los PUFAs ω 3 y, en general, la actividad suele ser mayor frente a EPA que frente a DHA. Así, las lipasas de *Candida rugosa*, *Rhizopus oryzae* y *Candida lipolytica* discriminan moderadamente a favor del EPA, mientras que en el caso de la lipasa de *Rhizomucor miehei* esa predilección fue mucho mayor entre EPA y DHA en esterificaciones de ácidos grasos libres procedentes de pescado tanto con etanol como con glicerol (**Halldorsson A** y col., 2004). El origen de esta selectividad podría deberse a los, ya mencionados, impedimentos estéricos que aparecen como resultado de la longitud

de la cadena. Sin embargo, esto no es cierto para todas las lipasas, ya que, por ejemplo, las lipasas de *Pseudomonas sp.* presentan mayor actividad frente a DHA que frente a EPA (**Halldorsson A** y col., 2004).

1.4 Evolución dirigida de enzimas

1.4.1 Introducción

Las enzimas están optimizadas y a menudo altamente especializadas para una función específica dentro del organismo que la produce. Sin embargo, el continuo incremento en las aplicaciones de estos biocatalizadores en la industria química, farmacéutica y alimentaria ha provocado una gran demanda de enzimas que exhiban una mayor estabilidad operacional, mayor especificidad y enantioselectividad así como nuevas actividades sobre sustratos naturales o artificiales.

Las metodologías de selección o “screening” desarrolladas en los últimos años están expandiendo la búsqueda de nuevas fuentes de enzimas en organismos no cultivados (<http://www.diversa.com>), en más de 100 genomas secuenciados (<http://tigr.org>; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y a través de la diversidad de microorganismos extremófilos (**Cohen N** y col., 2001; **Adrio JL** y **Demain AL**, 2005).

Actualmente, mediante métodos genéticos, se pueden modificar enzimas y así adaptar sus funciones a una aplicación determinada mediante dos estrategias:

- la modificación mediante diseño racional a partir de biocatalizadores ya existentes o,
- la búsqueda de la función enzimática deseada en colecciones de variantes generadas aleatoriamente.

El diseño racional de un catalizador requiere numerosos datos y previsiones a nivel estructural, mecanístico y dinámico. Esta información está disponible para muy pocos catalizadores de interés. Sin embargo, el rápido crecimiento de bases de datos de estructuras proteicas así como de secuencias génicas ayuda a paliar esta falta de datos. La comparación entre la secuencia de un nuevo biocatalizador

obtenido a partir de un *screening* y las cientos de secuencias depositadas en las bases de datos permite identificar proteínas relacionadas cuyas funciones y/o estructuras ya son conocidas. Existen algunos ejemplos exitosos de enzimas modificadas mediante esta estrategia (**Van der Burg B** y col., 1998).

El desarrollo de nuevas herramientas para la obtención de grandes colecciones de variantes y la acumulación de datos detallados sobre la correlación estructura-función para muchas proteínas ha llevado al aislamiento de enzimas nuevas y mejoradas usando técnicas de “evolución *in vitro*” (**Cohen N** y col., 2001).

De todas las nuevas metodologías utilizadas para el descubrimiento de enzimas, la evolución dirigida se ha mostrado como la más poderosa, ya que es una forma rápida de encontrar variantes enzimáticas que actúan mejor que las que se encuentran de forma natural bajo unas condiciones específicas. La evolución natural no actúa en una dirección determinada sino que el proceso ocurre espontáneamente durante la reproducción y la supervivencia del organismo. A diferencia de esto, un experimento de evolución dirigida tiene un propósito determinado y las claves del proceso son controladas por el experimentador. Aunque hay muchas formas de alcanzar el objetivo (por ejemplo, una función enzimática mejorada) se aborda siempre aquel diseño experimental que minimice el esfuerzo. De esta forma, un buen punto de partida sería una proteína próxima a aquella que se desea obtener por evolución (**Arnold FH**, 1998).

La evolución dirigida nos permite explorar funciones enzimáticas jamás requeridas en el ambiente natural y para las cuales no se conoce la base molecular o no puede ser entendida (**Kuchner O** y **Arnold F**, 1997; **Harris JL** y **Craik CS**, 1998; **Marrs B** y col., 1999). La evolución es un poderoso algoritmo con probada capacidad para alterar la función enzimática y, especialmente, para afinar las propiedades de las enzimas.

Para realizar con éxito un experimento de evolución dirigida se han de cumplir cuatro requerimientos básicos (**Kuchner O** y **Arnold F**, 1997; **Hall BG**, 1999):

1. La función deseada debe ser física y químicamente factible.
2. La función debe ser también biológicamente o “evolutivamente” viable, es decir, debe existir una ruta mutacional para llegar de un punto a otro más evolucionado a través de sucesivos mutantes mejorados.

3. La enzima debe producirse correctamente en el hospedador elegido.
4. Debe existir un método de “screening” rápido o una selección que refleje la función deseada.

Las características no requeridas para la función biológica, tales como estabilidad, actividad en un ambiente no natural o actividad frente a un nuevo sustrato son especialmente susceptibles de mejora. La frecuencia de aparición de mutantes mejorados debería ir disminuyendo en la medida en que la secuencia obtenida se hace más próxima a la óptima por lo que la facilidad para identificarlos va disminuyendo a lo largo del proceso.

Cuando la nueva función que se pretende obtener requiere el reemplazamiento simultáneo de múltiples aminoácidos, es poco probable que esto aparezca en una colección de mutantes generados al azar. En este caso, una posible solución sería la combinación de diseño racional y estas técnicas de mejora aleatoria (**Altamirano y col.**, 2000).

1.4.2 Métodos para la creación de variabilidad genética

El fundamento de la mutagénesis por radiación ultravioleta o por agentes químicos es que el ADN que ha sido dañado no se replique o repare correctamente consiguiendo de esta forma una mutación en el material genético (**Taguchi S y col.**, 1998). Aplicando la misma lógica, se han utilizado cepas bacterianas con alteraciones en una o varias rutas de reparación del ADN alteradas para contribuir a incrementar la tasa de mutación en genes clonados en plásmidos (**Bornscheuer UT y col.**, 1998). Sin embargo, este tipo de técnicas, a diferencia de lo que ocurre con otras metodologías, provocan una mutagénesis indiscriminada no sólo en el gen de interés sino en otros contenidos en el plásmido de clonación y en el propio genoma de la bacteria hospedadora (**Neylon C**, 2004).

La PCR mutagénica es, quizás, la técnica más utilizada para obtener variabilidad genética (**Leung DW y col.**, 1989; **Cadwell RC y Joyce GF**, 1992). La tasa de error introducida por la ADN polimerasa en el proceso de amplificación puede incrementarse de múltiples formas. Uno de los métodos más conocidos y empleados es la combinación de pequeñas cantidades de Mn^{2+} así como concentraciones desbalanceadas de nucleótidos trifosfato, pudiéndose

controlar el grado de mutagénesis tanto mediante la cantidad del cofactor (Mn^{2+}) como por el número de ciclos de amplificación. Varias casas comerciales disponen de kits basados en ADN polimerasa y diferentes agentes que pueden modificar la tasa de mutación según su concentración en el medio. Otras, en cambio, utilizan de ADN polimerasas con una elevada tasa de error (**Neylon C**, 2004).

Es importante tener en cuenta que si la tasa de mutación obtenida es demasiado alta, la mayoría de las enzimas obtenidas serán inactivas. Por el contrario, si es demasiado baja la original generará un fondo o “background” elevado y se obtendrá muy poca diversidad (**Moore JC** y **Arnold FH**, 1996).

Por lo tanto, una buena estrategia evolutiva sería aquella en la cual se modifiquen 1-2 aminoácidos en cada generación, de manera que se acumulen múltiples cambios de forma secuencial a través de varias rondas de mutación y/o recombinación, hasta adquirir la función deseada (**Hall BG**, 1999).

En 1994, Stemmer (**Stemmer WPC**, 1994) desarrolló un método de recombinación aleatoria *in vitro* del ADN denominado *DNA Shuffling* o “barajado de ADN”. En este método variantes de un mismo gen con diferentes mutaciones puntuales (beneficiosas y aditivas), son digeridas con ADNasa I y los fragmentos aleatorios obtenidos se reensamblan en un gen completo mediante ciclos repetitivos de anillamiento en presencia de una ADN polimerasa. Este procedimiento de recombinación homóloga permite la rápida acumulación de las mutaciones beneficiosas presentes en genes diferentes y la eliminación de las mutaciones neutras o perjudiciales (**Hall BG**, 1999; **Hiraga K** y **Arnold FH**, 2003).

Una variación de esta metodología es el *Family shuffling* en el que genes procedentes de diversas especies, pero con elevada homología, se recombinan creando quimeras que difieren en varias posiciones. Cramer y colaboradores (**Cramer A** y col., 1998) demostraron un mayor incremento en la diversidad y aceleración de la evolución de una β -lactamasa mediante este método en comparación con el *DNA shuffling* realizado sobre los mismos genes individualmente.

Durante la última década han surgido numerosas variantes de la técnica de *DNA Shuffling*. Así, por ejemplo, el grupo liderado por Frances Arnold (Caltech, SF) ha desarrollado métodos de recombinación aleatoria en los cuales no es necesario fragmentar el ADN parental. En uno de estos procedimientos, llamado StEP

(*Staggered Extension Process*, Proceso de Extensión Escalonado), se utiliza como molde de una reacción de PCR variantes mutadas de un mismo gen y procesos de extensión muy cortos con lo que se generan fragmentos del gen truncados que vuelven a hibridar con el ADN parental en el ciclo siguiente promoviendo la aparición de secuencias recombinantes (**Arnold FH**, 1998).

Otro procedimiento desarrollado recientemente es el denominado RACHITT (*Random Chimeragenesis on Transient Templates* o Generación de Quimeras al azar sobre Moldes Efímeros) que es una técnica conceptualmente similar al StEP y *DNA Shuffling* pero está diseñada para conseguir mayor número de entrecruzamientos, entre 12 y 19 en una sola ronda de *Family Shuffling* (**Coco WM**, 2003). En este caso, el alineamiento ocurre entre los fragmentos generados a partir de una hebra de todas las variantes y una hebra completa del ADN parental. Estos fragmentos se reensamblan hasta alcanzar la longitud completa de la hebra opuesta a la parental. Los fragmentos que posean extremos 5' o 3' libres se incorporan tras eliminar las "colas" utilizando las actividades endo y exonucleasa de la *Taq* polimerasa y *Pfu* polimerasa, respectivamente. Después de rellenar los huecos y la ligación, el molde, es finalmente destruido para dejar sólo los fragmentos del gen ligados que se convertirán en ADN de doble hebra.

Además de estas técnicas *in vitro*, hay otros procedimientos basados en la recombinación homóloga en levaduras que se agrupan bajo el término *in vivo shuffling* (**Cherry JR** y col., 1999; **Bulter T** y col., 2003; **Swers JS** y col., 2004). En este proceso, fragmentos de ADN con diferentes mutaciones (procedentes de PCR mutagénica) se mezclan equimolarmente con un plásmido linearizado y se cotransforman en la levadura. Los fragmentos homólogos recombinan entre sí, intercambiando mutaciones teniendo lugar, además, la reparación del vector linearizado la cual puede ocurrir antes y/o después de esta recombinación. Este método elimina los pasos de ligación y transformación en *Escherichia coli* previos a la generación de colecciones de variantes génicas que, posteriormente, se expresarán en levaduras. Una variación de esta técnica recombinatoria es el CLERY (*Combinatorial Libraries Enhanced by Recombination in Yeast* o Colecciones Combinatorias de variantes Potenciadas por Recombinación en Levaduras) que combina la recombinación *in vitro* mediante *family shuffling* y la recombinación homóloga *in vivo*. Mediante este método se han logrado colecciones de variantes con bastante diversidad pero con baja eficiencia (12% de clones funcionales) debido

a la elevada tasa de mutaciones puntuales incorporadas (**Kurtzman A** y col., 2001). Este método es de gran utilidad para llevar a cabo reacciones de recombinación entre secuencias con una baja homología.

La dificultad para generar eventos de recombinación entre secuencias que muestran muy baja homología ha llevado al desarrollo de otras técnicas, como SHIPREC (*Sequence-Homology-Independent Protein Recombination* o Recombinación de Proteínas Independiente de la Homología de las Secuencias) (**Sieber V** y col., 2001) o ITCHI (*Incremental Truncation for the Creation of Hybrid enzymes* o Truncamiento Incremental para la Creación de Enzimas Híbridas) (**Lutz S** y **Benkovic SJ**, 2000) que permiten la creación de colecciones de variantes mediante la ligación de genes truncados. La unión se produce a través de secuencias de corte. En estos procedimientos no se requiere la recombinación homóloga entre fragmentos ya que a través de la ligación se regenera el gen completo.

1.4.3 Selección de las mejores variantes

La identificación y el aislamiento del mejor mutante/s es un paso crucial en el proceso de evolución dirigida. Una vez obtenida la variabilidad genética, los genes modificados son clonados en un plásmido para su expresión en un hospedador adecuado (bacteria o levadura). Los clones que expresan los genes mejorados son identificados mediante un “screening” específico y pueden ser seleccionados, en caso necesario, para una nueva ronda de evolución dirigida (**Marrs B** y col., 1999; **Kuchner O** y **Arnold F**, 1997).

La eficacia y la precisión de este paso de selección de las variantes mejoradas se verá afectada por el tipo de señal que se genere. Los métodos de selección deben permitir el análisis de un gran número de variantes (“High-throughput screening” o selección con alta capacidad de procesamiento) de una forma rápida y con elevada precisión y sensibilidad.

El desarrollo de un método de selección adecuado para la propiedad deseada es el elemento más importante que determine el éxito de un experimento de evolución.

Dada la variabilidad en las enzimas y los distintos parámetros que se desean optimizar, se han desarrollado una gran variedad de procedimientos de selección.

Así, por ejemplo, se han desarrollado métodos de selección en medio sólido combinado con imágenes espectroscópicas (**Delagrave S** y col., 2001), métodos basados en la medida de actividad *in vitro* por detección de fluorescencia (**Kumar S** y col., 2005), utilización de compuestos colorimétricos (**Henke E** y **Bornscheuer UT**, 1999; **Jaeger KE** y **Reetz MT**, 2000; **Alcalde M** y col., 2005; **Parikh MR** y **Matsumura I**, 2005; **Wong TS** y col., 2005) o fluorimétricos como son los ésteres de umbelliferilo (**Fujii R** y col., 2003; **Babiak P** y **Reymond JL**, 2005).

Otras metodologías de *screening* se basan en la utilización de aparatos más complejos como análisis por HPLC-MS (**Eggert T** y col., 2005), resonancia magnética nuclear (**Reetz MT** y col., 2004) o resonancia Raman dispersa (**Bornscheuer UT**, 2004).

1.4.4 Evolución molecular de lipasas

Las lipasas han emergido como importantes biocatalizadores en la industria biomédica debido a su excelente capacidad para llevar a cabo reacciones regioselectivas en una gran variedad de solventes orgánicos y con una amplio rango de sustratos. La síntesis estereoselectiva de compuestos orgánicos quirales tiene un elevado interés académico e industrial. La biocatálisis enantioselectiva es una herramienta clave en la producción de sustancias químicas para su uso en fármacos o cosméticos. (**Ashok P** y col., 1999; **Jaeger KE** y **Eggert T**, 2004).

La enantioselectividad de la lipasa extracelular de *Pseudomonas aeruginosa* frente al ácido 2-metildecanoico *p*-nitrofenil éster en configuración (*S*) se incrementó diez veces en cuatro rondas de PCR mutagénica (**Liebeton K** y col., 2000). Los sobrenadantes procedentes de cultivos de mutantes se ensayaron frente a ésteres de este ácido con *p*-nitrofenol y la hidrólisis de los compuestos enantioméricamente puros (*R* o *S*) era monitorizada a través de la detección espectrofotométrica del *p*-nitrofenol (**Reetz MT** y **Jaeger KE**, 2000). Posteriormente, la mutagénesis a saturación en aquellas posiciones donde se habían producido los cambios permitió obtener una variante con una enantioselectividad 25 veces mayor que la enzima original (**Reetz MT**, 2002).

La mejora de la enantioselectividad también se ha llevado a cabo con otras lipasas como la lipasa A de *Bacillus subtilis* para la formación de alcoholes quirales

(**Funke SA** y col., 2003) y con la lipasa de *Burkholderia cepacia* donde se logró invertir su enantioselectividad de la configuración (S) a la forma R del etil-3-fenilbutirato (**Koga Y** y col., 2003).

Existen otros trabajos en los que se ha modificado la especificidad de sustrato de la enzima como, por ejemplo, la lipasa de *Bacillus thermocatenuatus* donde una ronda de mutación al azar y selección permitió obtener tres variantes con una actividad fosfolipasa 10-12 veces superior a la enzima original. Además, la actividad frente a metil ésteres de ácidos grasos de cadena larga también se incrementó entre 1,5-4 veces (**Kauffmann I** y **Schmidt-Dannert C**, 2001). La actividad amidasa de la lipasa de *Pseudomonas aeruginosa* se incrementó 2 veces tras una ronda de mutación y selección. Tres mutaciones localizadas lejos del centro activo, pero en las proximidades del sitio de unión del ión calcio, fueron responsables de este cambio (**Fujii R** y col., 2005).

También se ha mejorado mediante técnicas de evolución dirigida otra propiedad importante como la termoresistencia. Dos variantes de la lipasa B de *Candida Antarctica* mostraron una vida media, a 70°C, 20 veces superior a la proteína original (**Zhang N** y col., 2003). Dos ciclos de PCR mutagénica y selección, combinados con información estructural, permitieron obtener mutantes con una vida media de desnaturalización 300 veces superior que la lipasa de *Bacillus subtilis* (**Acharya P** y col., 2004).

2. Objetivos

2. Objetivos

La obtención de aceites ricos en PUFAs ω 3 en la fracción de glicéridos mediante hidrólisis enzimática selectiva de una mezcla conteniendo diversos tipos de ácidos grasos sería de gran interés ya que podría constituir un primer paso en el desarrollo de un posible proceso industrial para la obtención de este tipo de aceites.

Para obtener una enzima capaz de realizar esta hidrólisis selectiva se plantearon los siguientes objetivos:

- 1. Aislar a partir de fuentes naturales un microorganismo con alta capacidad de producción de lipasas.**
- 2. Clonar y caracterizar el gen que codifica para dicha lipasa.**
- 3. Expresar el gen de la lipasa en un sistema heterólogo de alta eficacia y caracterizar la proteína producida.**
- 4. Obtener variantes de dicha lipasa con actividad menor o nula frente a triglicéridos ricos en PUFAs, pero manteniendo la actividad frente a ácidos grasos saturados y mono-insaturados.**
- 5. Analizar a nivel molecular las variantes de lipasas obtenidas para conocer el origen de la nueva especificidad.**
- 6. Validar el proceso de hidrólisis selectiva analizando la actividad de las variantes seleccionadas frente a un aceite comercial rico en PUFAs.**

3. Materiales y Métodos

3. Materiales y Métodos

3.1 Reactivos químicos y Enzimas

3.1.1 Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados en esta memoria se muestran en la **Tabla 9**. Fueron sintetizados por MWG-Biotech AG (Ebersberg, Alemania).

Tabla 9. Lista de los oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

Nombre	Secuencia	T _m (°C)
GCLip-F3	5'-GTCGACAAAAGACAGGCCCCC-3'	73,0
GCLip1-R	5'-AACTGCAGTTAACCGAAGAGA-3'	58,4
GCLip1-R1	5'-CGACTCTAGAGGATCCCCAACTG-3'	64,2
GCLip1-F4	5'-GCGAATTCCAAACCCCCACG-3'	61,4
GCLip1Not-R	5'-CAAATATGCGGCCGCTTAACC-3'	74,8
158PCRmut-F1	5'-GCCAGCATTGCTGCTAAAG-3'	56,7
RMLC	5'-GGGAGGGCGTGAATGTAAGC-3'	61,4
RMLN	5'-CCTCTATACTTTAACGTC AAGG-3'	56,5
GATE-B1-D*	5'-GGGG <u>ACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGG</u> <u>CTCACGTTAAGGGATTTT</u> -3'	72,2
GATE-B2-R*	5'-GGGG <u>ACCACTTTGTACAAGAAAGCTGG</u> <u>GTGGATCCCGCACAAACGAAGGTCTCAC</u> -3'	>75,0

(*) La secuencia subrayada indica los sitios de integración *attB*.

3.1.2 Antibióticos

Los antibióticos utilizados en el presente trabajo se muestran en la **Tabla 10**. Las soluciones *stock* una vez preparadas, a la concentración correspondiente, disueltas en agua o etanol (cloranfenicol), se esterilizaron por filtración a través de un filtro de 0,22 µm y se almacenaron a -20°C.

Tabla 10. Antibióticos utilizados.

Nombre	Concentración Stock (mg/mL)	Concentración trabajo (µg/mL)
Ampicilina	100	100
Cloranfenicol	30	30
Zeocina	100	50*, 100**
Tetraciclina	12,5	12,5
Kanamicina	50	50

Concentración en cultivos de * *Escherichia coli*, ** *Pichia pastoris*

3.1.3 Tampones y otras soluciones

En la **Tabla 11** se muestra la composición y preparación de los tampones y soluciones utilizadas en este trabajo.

Tabla 11. Composición y preparación de tampones y soluciones.

Nombre	Preparación
IPTG 1000 x (isopropil-β-D-tiogalactopiranosido)	Disolver 1 g en 8 mL de agua Milli Q (0,42 M). Almacenar a -20°C.
X-gal 1000 x (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido)	Disolver 40 mg en 1 mL de dietilformamida. Almacenar a -20°C.
Tampón TE	Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM pH 8.
STET	Sacarosa 8%, Tritón X-100 0,5%, Tris HCl 10mM EDTA 50mM pH 8.
Tampón fosfato potásico 1 M pH 6	Mezclar 132 mL de K ₂ HPO ₄ 1 M, 868 mL KH ₂ PO ₄ . Ajustar el pH a 6 añadiendo ácido fosfórico o KOH).
YNB 10x	Disolver 134 g de <i>Yeast Nitrogen Base</i> (con sulfato amónico y sin aminoácidos) en 1 L de agua destilada. Esterilizar por filtración.
Biotina 500x	Disolver 20 mg de biotina en 100 mL de agua destilada. Esterilizar por filtración.

Nombre	Preparación
D-Glucosa 10x	Disolver 200 g de D-glucosa en 1 L de agua destilada. Esterilizar por filtración.
Metanol 10x	Mezclar 5 mL de metanol con agua destilada hasta 100 mL. Esterilizar por filtración.
Glicerol 10x	Mezclar 100 mL de glicerol con 900 mL de agua destilada. Esterilizar en autoclave.
Tampón TAE 50 x (ADN o ARN)	Mezclar 242 g de Tris base en ácido acético glacial 57,1 mL; EDTA 0,5 M pH 8 100 mL, H ₂ O 1 L.
Tampón de carga (SDS-PAGE)	1,2 mL Tris-HCl 0,5 M pH 6,8; 2 mL SDS 10%, 1 mL glicerol, azul de bromofenol 0,5 % en agua 0,5 mL; H ₂ O Mili-Q 4,8 mL. En el momento de su uso se añaden 50 µL de β-mercaptoetanol por cada 1 mL de tampón.
Tampón de electrodos	Disolver 3 g de Tris base, 14 g de glicina, 10 mL de SDS 10%, agua destilada hasta 1 L. Comprobar que el pH 8,1-8,5 (sin ajustar).
Solución de Coomasie	Azul de Coomasie 0,1%; metanol 40%; ácido acético 10%.
Solución de desteñido	Metanol 20%; ácido acético 7%.
Solución Desnaturalizante	NaOH 0,5 M, NaCl 1,5 M.
Solución Neutralizante	NaCl 3 M, Tris-HCl 1 M pH 7,5.
SSC 20 x	NaCl 3 M, Citrato Sódico 0,3 M pH 7
Tampón Maleico	Ácido maleico 0,1 M, NaCl 0,15 M pH 7,5.

3.1.4 Enzimas

Las enzimas que se emplearon en el presente trabajo aparecen en la **Tabla 12**.

Tabla 12. Listado de enzimas utilizadas.

Nombre	Casa Comercial
ARNasa	Roche Molecular Biochemicals (Mannheim, Alemania)
Taq polimerasa	Roche Molecular Biochemicals (Mannheim, Alemania)
<i>Pfu</i> Turbo®	Stratagene (La Jolla, C.A., EE.UU)
Fosfatasa alcalina de camarón	Promega Co. (Madison, Wisconsin, EE.UU)
Enzimas de restricción	Promega Co. (Madison, Wisconsin, EE.UU)
Klenow	Roche Molecular Biochemicals (Mannheim, Alemania)
Ligasa de T4	Roche Molecular Biochemicals (Mannheim, Alemania)
Proteinasa K	Roche Molecular Biochemicals (Mannheim, Alemania)
Endoglicosidasa H	Roche Molecular Biochemicals (Mannheim, Alemania)
Mutazyme™	Stratagene (La Jolla, C.A., EE.UU)

3.2 Microorganismos

3.2.1 Cepas Bacterianas

• *Escherichia coli* TOP 10 F⁺: Genotipo: F⁺{*lac* I^q, Tn 10(Tet^R)}, *mcr* A Δ (*mrr*-*hsd*RMS- *mcr*BC), Φ80*lac*ZΔM15 Δ*lac*X74 *deo*R *rec*A1 *ara*D139 Δ(*ara* – *leu*)7697 *gal*U *gal*K *rps*L (Str^R) *end*A1 *nup*G. Cepa empleada para la obtención de células electrocompetentes. Fue utilizada para la obtención de los plásmidos pBT69, pBT70

y pBT155.

- *Escherichia coli* TOP10 (One Shot®): Genotipo: F⁻ *mcrA* Δ (*mrr*- *hsdRMS*-*mcrBC*), Φ80*lacZ*Δ*M15* Δ*lacX74* *recA1* *araD139* Δ(*ara* – *leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* (Str^R) *endA1* *nupG*. Células competentes (Invitrogene) con una eficiencia de transformación >1x10⁸ transformantes por μg de ADN. Fue utilizada en la construcción de la colección de variantes del gen *lipI* de *Galactomyces geotrichum* BT107.

- *Escherichia coli* XL1-Blue MRF': Genotipo: Δ(*mcrA*) 183 Δ(*mcrCB*-*hsdSMR*-*mrr*)173 *endA1* *supE44* *thi-1* *recA1* *gyrA96* *relA1* *lac* {F' *proAB* *lac I* ^q ZΔ*M 15* Tn 10(Tet^R)}. Células electrocompetentes (Stratagene) con una eficiencia de transformación >1x10¹⁰ transformantes por μg de ADN. Fue utilizada para la obtención del plásmido pBT158.

3.2.2 Cepas fúngicas

- *Galactomyces geotrichum* BT107: cepa aislada en nuestro laboratorio a partir de alpeorujos. Su identificación se realizó en los laboratorios de la colección alemana de cultivos tipo (DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GMBH, Braunschweig).

- *Pichia pastoris* X-33 (Mut⁺): (Invitrogene). La cepa fue utilizada como organismo hospedador para llevar a cabo la expresión heteróloga del gen *lipI* de *G. geotrichum* BT107 y de sus variantes.

- *Saccharomyces cerevisiae* BJ5465: Genotipo: MATa *ura3-52* *trp1* *leu2-delta1* *his3-delta200* *pep4::HIS3* *prb1-delta1.6R* *can1*. Cepa deficiente en proteasas, cedida por Dr. Miguel Alcalde (Grupo de Biocatálisis Aplicada, Dpto. de Biocatálisis, Instituto de Catálisis y Petroleoquímica, CSIC). Fue utilizada para llevar a cabo la expresión heteróloga del gen *lipI* de *G. geotrichum* BT107.

3.3 Vectores plasmídicos

En la **Tabla 13** se muestran los plásmidos utilizados en la presente memoria y sus características más relevantes.

Tabla 13. Nombres y características esenciales de los plásmidos utilizados.

Nombre	Tamaño (kb)	Marcador	Características	Fuente
pUC19	2,686	Ampicilina	Vector de clonación en <i>E. coli</i> . Selección por α complementación en presencia de IPTG y X-gal.	Invitrogene™
pPICZ α A	3,620	Zeocina	Plásmido bifuncional. La expresión en <i>P. pastoris</i> está controlada por el promotor del gen AOX1. Contiene el péptido señal del factor α de <i>S. cerevisiae</i> para la secreción de la proteína heteróloga.	Invitrogene™
pPICZ α B	3,624	Zeocina	Plásmido bifuncional. Igual que pPICZ α A excepto las dianas presentes en el <i>polylinker</i> .	Invitrogene™
pJROC30	12,337	Ampicilina URA3	Plásmido bifuncional. La expresión en <i>S. cerevisiae</i> está regulada por el promotor del gen <i>GAL1</i> .	Dr. Miguel Alcalde (Dpto. Biotocatálisis, I.C.P., CSIC)
pBT69	4,341	Ampicilina	pUC19 portando el gen <i>lipI</i> de <i>Galactomyces geotrichum</i> BT107 clonado en <i>SmaI</i> .	Este trabajo
pBT70	5,169	Zeocina	pPICZ α B portando el gen <i>lipI</i> de <i>G. geotrichum</i> BT107 clonado en <i>XhoI-XbaI</i> .	Este trabajo
pBT155	5,185	Zeocina	pPICZ α A conteniendo el gen <i>lipI</i> de <i>G. geotrichum</i> BT107 clonado en <i>EcoRI-NotI</i> .	Este trabajo
pBT158	12,367	Ampicilina	pJROC30 portando el péptido señal del factor α y el gen <i>lipI</i> de <i>G. geotrichum</i> BT107 en las posiciones <i>BamHI-NotI</i> .	Este trabajo
pBT137	4,401	Cloranfenicol	Contiene los sitios <i>attP</i> necesarios para la recombinación BP con un fragmento <i>attB</i> . Contiene los elementos de los plásmidos pPICZ α (excepto el promotor, el terminador y el péptido señal del factor α) y el gen suicida <i>ccdB</i> .	Dr. Oscar Bañuelos Dpto. Biotecnología, Puleva Biotech, S.A.

3.4 Medios de cultivo

3.4.1 Medios de cultivo para bacterias

Medio Terrific Broth (TB)

Bacto-triptona	12 g
Extracto de levadura	24 g
Glicerol	4 mL
Agua destilada hasta	0,9 L

Después de esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min añadir 100 mL de tampón fosfato potásico 1 M pH6.

Medio LB (Miller JH, 1972)

Bacto-triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
Na Cl	10 g
Agua destilada hasta	1 L

Para medio sólido se añade agar (20g/L). Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min.

Medio LB baja sal

Bacto-triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
Na Cl	5 g
Agua destilada hasta	1 L

Para medio sólido se añade agar (20g/L). Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min.

3.4.2 Medios de cultivo para levaduras

Medio YP

Extracto de levadura	10 g
Peptona	20 g
Agua destilada hasta	1 L

Para medio sólido se añade agar (20g/L). Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min.

Medio YP con sales

Medio para la producción de lipasas en *Galactomyces geotrichum*.

Extracto de levadura	10 g
Peptona	20 g
KH ₂ PO ₄	1 g
NaNO ₃	1 g
MgSO ₄	0,5 g
Agua destilada hasta	1 L

Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min.

Medio YPD

Extracto de levadura	10 g
Glucosa	20 g
Peptona	20 g
Agua destilada hasta	1 L

Para medio sólido se añade agar (20g/L). Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min.

Medio PDA (Potato Agar Dextrose)

Extracto de patata	4 g
Glucosa	20 g
Agar	15 g
Agua destilada hasta	1 L

El pH debe ajustarse a 5,6. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min. Habitualmente se preparó a partir de una mezcla comercial (referencia CM0139, Oxoid, Hampshire, U.K.). En este caso se añaden 39 g a 1 L de agua destilada. Se lleva a ebullición hasta disolución completa y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min

Medio BMGY

Medio para obtención de biomasa de *Pichia pastoris*.

Extracto de levadura	10 g
Peptona	20 g
Agua destilada hasta	700 mL

Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min Dejar enfriar a temperatura ambiente y añadir:

Tampón fosfato potásico 1 M pH 6	100 mL
Solución de Biotina 500x	2 mL
Solución de YNB 10x	100 mL
Solución de Glicerol 10x	100 mL

Medio BMMY

Medio para la inducción de la expresión en *P. pastoris*. Igual composición que para el medio BMGY pero sustituir el glicerol por metanol. Añadir 100 mL de una disolución de Metanol 10x.

Medio YPAD

Medio para obtención de biomasa de *Saccharomyces cerevisiae* BJ5465.

Extracto de levadura	10 g
Peptona	20 g
Glucosa 200 g/L	100 mL
Adenina hemisulfato	100 mg
Agua destilada hasta	1L

Medio Mínimo

Medio para la selección de transformantes de *Saccharomyces cerevisiae* BJ5465.

Rafinosa 200 g/L	200 mL
L-His 2,5 g/L	20 mL
L-Trp 2,5 g/L	20 mL
L-Leu 2,5 g/L	20 mL
Adenina Hemisulfato 2,5 g/L	40 mL
YNB 67 g/L	100 mL
Agua destilada hasta	1 L

Para medio sólido se añade agar (15 g/L). Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min.

Medio Expresión

Medio para la expresión en *Saccharomyces cerevisiae* BJ5465.

YP (1.55x)*	812,5 mL
Tampón fosfato potásico 1 M pH 6	62,5 mL
Galactosa 200 g/L	125 mL

3. Materiales y Métodos

*YP (1.55x): 10 g Extracto de levadura, 20 g de peptona, 650 mL de agua destilada.

Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min. Almacenar en oscuridad.

Medio Mínimo Agarizado

Medio para la selección de transformantes en medio sólido de *Saccharomyces cerevisiae* BJ5465.

YNB	6,7 g
L-His	50 mg
L-Trp	50 mg
L-Leu	50 mg
Adenina Hemisulfato	50 mg
Glucosa 200 g/L	100 mL
Agar	15 g
Sorbitol	182,1 g
Agua destilada hasta	1L

Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min. Almacenar protegido de la luz.

Medio de screening para *S. cerevisiae* BJ5465

Galactosa	12,5 g
Glucosa	10 g
YNB	6,7 g
L-His	50 mg
L-Trp	50 mg
L-Leu	50 mg
Adenina Hemisulfato	50 mg
Agar	15 g
Agua destilada hasta	1L

Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min. Enfriar hasta 50°C y antes de la solidificación del medio se añaden:

Trioleína/TriEPA	10 g
Rodamina B	0,01 g

Medio de screening para *P. pastoris*

Se prepara añadiendo a 1 L medio YP fundido, a una temperatura aproximada de 50°C y antes de que solidifique:

Metanol	10 mL
Rodamina B	0,01 g
Trioleína/TriEPA	10 g
Zeocina	25 µg/mL

Medio de screening para lipasas

Agua destilada	990 mL
Agar	20 g

Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min. Enfriar hasta 50°C y antes de la solidificación del medio se añaden 10 mL de aceite (oliva/ROPUFA®).

3.5 Cultivo y mantenimiento de las cepas

3.5.1 Cepas bacterianas

Las cepas de *E. coli* se incubaron a 37°C durante 16-18 h, en diferentes medios de cultivo según el protocolo. Los cultivos en medio líquido se realizaron en el matraces sin indentaciones incubando a 37°C y 250 rpm de agitación. En el caso de se cultivaron clones resistentes a antibióticos los medios se suplementaron con las concentraciones de antibióticos que se muestran en la **Tabla 10**.

La conservación de las cepas se realizó en placas Petri, selladas con parafilm, a 4°C (2-3 semanas) o en suspensiones en glicerol al 20%, a -80°C (años).

3.5.2 Cepas fúngicas

Para cultivar *G. geotrichum* BT107 se creció en matraces de 500 mL conteniendo 50 mL de medio YPD inoculado con 100 µL de una suspensión de esporas del hongo en glicerol al 30%. Los cultivos se incubaron a 28°C y 250 rpm.

P. pastoris X-33 se creció en matraces de 500 mL conteniendo 100 mL de medio YPD inoculado con una colonia. Los matraces se incubaron a 28 °C y 250 rpm de agitación. En el caso de las cepas transformadas con plásmidos derivados de los pPICZα a se les añadió zeocina a los medios a una concentración final de 100 µg/mL (**Tabla 10**).

S. cerevisiae BJ5465 se creció en matraces conteniendo 100 mL de medio YPAD inoculado con una colonia e incubados a 28°C y 250 rpm de agitación. En el caso de las cepas transformadas con plásmidos derivados del pJROC30, el crecimiento se lleva a cabo en medio mínimo líquido incubando a 28°C y 250 rpm, durante 4-5 días.

La conservación de las cepas se realizó en placas Petri, selladas con parafilm, a 4°C (2-3 semanas) o en suspensiones en glicerol al 20%, a -80°C (años).

3.6 Manipulación de ácidos nucleicos

3.6.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La mezcla de reacción estándar para la amplificación de fragmentos de ADN se realizó en tubos Eppendorf de 200 µL añadiendo los siguientes componentes, en el orden indicado:

Compuesto	Volumen	Concentración final
Agua Mili-Q estéril	hasta 50 µL	
Tampón de la polimerasa (MgCl ₂ 15 mM)	5 µL	1,5 mM
Cebador 1 (100 µM)	0,2 µL	1 µM
Cebador 2 (100 µM)	0,2 µL	1 µM
dNTPs (10mM de cada uno)	1 µL	200 µM
Molde		10-50 ng
Polimerasa		2,5 U

Una vez preparada la mezcla de reacción se selecciona y se desarrolla el programa de amplificación.

El esquema general de una PCR consta de tres pasos:

1. **Desnaturalización:** 94-96°C, 30-60 s. En este punto se desnaturaliza completamente el ADN molde, haciéndolo accesible para la unión de los cebadores a sus zonas complementarias.
2. **Hibridación:** 37-70°C, 30-60 s. La disminución de la temperatura favorece la unión de los cebadores a sus zonas complementarias en el ADN molde. La temperatura de renaturalización se establece generalmente 5°C por debajo de la temperatura de fusión (T_m) de los cebadores, calculada

empíricamente por su composición nucleotídica.

3. **Extensión o elongación:** 68-72°C. El tiempo de elongación dependerá del tamaño del fragmento de ADN que se quiera amplificar. Las polimerasas que se han utilizado para la realización de este trabajo tenían una velocidad de síntesis de 0,5-2 kb/min.

El conjunto de estos tres pasos constituye un ciclo de PCR. Las reacciones completas pueden constar de entre 20 y 40 ciclos, duplicándose, teóricamente, la cantidad de ADN correspondiente al fragmento a amplificar en cada ciclo. Adicionalmente se suele realizar un paso inicial de desnaturalización, a 94-96°C durante 2-3 min, para asegurarse de que en el primer ciclo todo el ADN molde se encuentre completamente desnaturalizado.

Igualmente, después de finalizar el último ciclo de PCR se puede programar un paso de extensión, a 68-72°C durante 5-10 min, en el que se permite que la polimerasa termine de sintetizar todas las hebras que no hubiera completado.

El procedimiento experimental seguido se realizó utilizando un termociclador iCycler™ (BioRad, California, EE.UU)

Finalizado el programa, una alícuota o todo el volumen de la reacción se carga en un gel de agarosa y, en caso necesario, se aísla la banda de interés.

3.6.2 Tratamiento con enzimas de restricción

Los componentes de la mezcla de reacción son: los tampones de digestión (específicos para cada endonucleasa), el ADN, agua Mili-Q hasta completar el volumen final, y, por último, las unidades necesarias de enzima de restricción. De forma optativa, también se pueden añadir BSA (0,1 mg/mL) y/o ARNsa (100 µg/mL).

En la digestión de minipreps se utilizan de 100 ng a 2 µg de ADN en un volumen final de 20 µL. En el caso de vectores digeridos para la subclonación se emplean de 2 a 5 µg de ADN plasmídico que se digieren en 50-100 µL de volumen final. Las digestiones preparativas para la recuperación de fragmentos de geles se realizan con 10-20 µg de ADN en 100-200 µL de reacción. Las digestiones parciales

se realizan variando la concentración de enzima a tiempo fijo o variando el tiempo de incubación para una concentración fija de enzima (**Sambrook J et al.**, 1989).

La incubación de estas reacciones de digestión es de 1-2 h para las minipreps y de 2-4 h en digestiones preparativas, aunque en algunos casos las reacciones se pueden incubar durante más de 12 h. Como norma general se ajusta el tiempo de incubación y el número de unidades de enzima en función de la estabilidad de cada enzima y del tipo y cantidad de ADN.

3.6.3 Relleno de extremos 5' protuberantes

El relleno de extremos 5' protuberantes en fragmentos de ADN se llevó a cabo utilizando el fragmento *Klenow* de la ADN polimerasa I de *E. coli*. El procedimiento fue el siguiente:

1. Se purifica el ADN digerido mediante el kit "NucleoSpin^R Extract" (Macherey-Nagel, Düren, Alemania) y resuspender el ADN en 30 µL de agua Mili-Q.
2. El relleno con Klenow se realizó en un volumen de 50 µL y se preparó añadiendo los 20 µl del ADN purificado, 5 µL del tampón de la enzima, los desoxinucleótidos trifosfato (hasta 25 µM) y dos unidades de enzima. Se completó el volumen hasta 50 µL con agua Mili-Q.
3. La reacción se incubó 15-30 min a 37°C.
4. El ADN se volvió a purificar con el kit "NucleoSpin^R Extract".

3.6.4 Desfosforilación de extremos 5' de fragmentos de ADN

La desfosforilación del ADN se realiza para prevenir la recircularización y religación del vector de ADN linearizado eliminando los grupos fosfato de los extremos 5'.

La desfosforilación se combinó con la reacción de restricción. Para ello, se añadieron 10 unidades de SAP (*Shrimp Alkaline Phosphatase*, Fosfatasa Alcalina de Camarón) en un volumen final de 30-50 µL. Se incubó a 37°C durante 15 min. A continuación, se inactivó la enzima a 65°C durante 15 min y se procedió a la purificación del ADN.

3.6.5 Ligación de moléculas de ADN

El ligamiento de fragmentos de ADN se realiza en volúmenes de reacción de 5-20 μL . La reacción se realizó de la siguiente forma:

1. Se mezclan previamente las cantidades necesarias de inserto y vector, calentando la mezcla unos segundos a 65°C .
2. Posteriormente se añaden: agua Mili-Q para completar los 10 μL finales, 1 μL de tampón de ligasa (10x), y 0,5 unidades de enzima (ligasa del bacteriófago T4). La mezcla se prepara en un tubo Eppendorf colocado en hielo.
3. La reacción se incuba de 8-10 h a 4°C si se trata de extremos romos y 2 h a 37°C ó 8-12 h a 12°C si se trata de extremos cohesivos.

Al preparar estas reacciones es necesario tener en cuenta la relación molar entre el ADN “inserto” y el vector. En el caso en que los extremos del fragmento a ligar sean diferentes entre sí se utilizará una relación equimolar vector:inserto. Si los extremos son iguales entonces la relación molar vector:inserto debe ser 1:2 para extremos cohesivos y 1:5 para extremos romos. En el caso de utilizar vectores fosforilados se utiliza la mitad de inserto de lo anteriormente indicado.

3.6.6 Purificación de ácidos nucleicos

3.6.6.1 Purificación de ADN

La purificación de ADN procedente de reacciones enzimáticas (PCR, restricciones, etc) se realizó empleando el “NucleoSpin® Extract Kit” (Macherey-Nagel). Mediante este procedimiento, el ADN se une a una membrana de sílica en presencia de sales caotrópicas que contiene componentes adicionales que permiten disolver los fragmentos de agarosa. Después de este paso la mezcla se carga directamente en la columna de sílica. Las contaminaciones como sales y componentes macromoleculares solubles se eliminan mediante lavados con un tampón conteniendo etanol. El ADN purificado es posteriormente eluido bajo condiciones de baja fuerza iónica y un pH ligeramente alcalino (Tris-HCl 5 mM, pH 8,5).

3.6.6.2 Purificación de ADN plasmídico de bacterias

3.6.6.2.1 Lisis alcalina

Se utilizó el protocolo descrito por **Holmes DS** y col., (1981) que permite obtener ADN plasmídico de un gran número de colonias en poco tiempo.

1. Se inoculan, a partir de colonias aisladas, tubos Eppendorf con 1 mL de medio TB suplementado con el antibiótico apropiado y se incuban durante 8-12 h a 37°C y con agitación (250 rpm).
2. Se recogen las células por centrifugación durante 10 min a 10.000 rpm y temperatura ambiente. Se elimina el sobrenadante y se resuspende el precipitado en 300-350 µL de STET mediante agitación fuerte.
3. Se añaden 10 µL de una solución de lisozima alcalina en agua (10 mg/mL) y se incuba 45 s con agitación fuerte.
4. Se incuban las reacciones en agua hirviendo durante 45 s (se provoca la coagulación de los restos celulares, ADN cromosómico y proteínas). Centrifugar durante 15 min a 14.000 rpm. El precipitado formado por los componentes celulares se retira del fondo de los tubos con un palillo.
5. El sobrenadante obtenido se mezcla con 40 µL de acetato sódico 3M pH 5,2 y 400 µL de 2-propanol, precipitando con este procedimiento el ADN plasmídico. Dicho ADN se recoge por centrifugación durante 10 min a 14.000 rpm y una vez descartado el sobrenadante, se lava con etanol al 70% en agua.
6. El precipitado se seca al aire y se resuspende en 30-40 µL de TE, almacenándose a 4°C o a temperatura ambiente.

3.6.6.2.2 “NucleoSpin® Plasmid Kit”

Mediante este método el ADN plasmídico contenido en las cepas hospedadoras de *E. coli* es liberado mediante lisis alcalina. Posteriormente, el lisado resultante se neutraliza y se crean las condiciones apropiadas para la unión del ADN plasmídico a una membrana de silica. Las posibles contaminaciones con sales, metabolitos y componentes celulares macromoleculares se retiran mediante un lavado de la

membrana con etanol al 70%. El plásmido purificado es finalmente eluido bajo unas condiciones iónicas bajas con un tampón ligeramente alcalino (Tris HCl 5 mM pH 8,5).

3.6.6.2.3 Preparaciones de ADN plasmídico a gran escala

La obtención a gran escala de ADN plasmídico (>5µg) se llevó a cabo empleando el “Nucleobond® PC Kit” (Macherey-Nagel). La membrana que se utiliza en este kit (NucleoBond® AX) es una resina de silica con un intercambiador aniónico (Metiletilamina). Una vez equilibrada la membrana, con un tampón adecuado, el ADN plasmídico queda unido a la resina, siendo posteriormente eluido, tras varios lavados. Después de la precipitación con isopropanol del plásmido éste puede ser fácilmente resuspendido en tampón TE.

3.6.6.3 Purificación de ADN plasmídico de levaduras

La extracción de ADN plasmídico a partir de levaduras se realizó con el “Zymoprep® Yeast Plasmid Miniprep Kit” (Zymo Research, CA, EE.UU). Para ello se siguieron pasos indicados en el manual del proveedor.

Una vez realizadas todas las adiciones e incubaciones, el sobrenadante resultante se transfiere a un tubo limpio. Se adicionan 400 µL de isopropanol a cada tubo para precipitar el ADN, se mezcla bien y se centrifuga a 12.000 rpm durante 8 min. Se elimina el sobrenadante por aspiración y se seca bien el precipitado. El ADN se resuspende en 35 µL de tampón TE.

3.6.6.4 Purificación de ADN genómico de hongos filamentosos y levaduras

La obtención de ADN genómico de hongos filamentosos y levaduras se realizó con ayuda del “AquaPure DNA Isolation Kit” (BioRad). El protocolo utilizado fue el siguiente:

1. A partir de un cultivo en 10 mL de medio YPD crecido durante 48 h se toman 200 µL y se centrifugan a 13.000 rpm.

2. Se desecha el sobrenadante y se resuspenden las células en 300 μL del tampón “Cell Lysis Solution” añadiendo 1,5 μL de Proteinasa K (20 mg/mL).
3. A continuación, se añaden 200 μL de **perlas de vidrio acidificadas** y se agita con vortex durante 4 min. Se incuban las muestras a 50-55°C durante 1 h. Una vez enfriadas se añaden 1,5 μL de “RNAsa Solution”, se agita la mezcla y se dejan incubando a 37 °C durante 15 min.
4. Se dejan enfriar las muestras a temperatura ambiente y se añaden 100 μL de “Protein Precipitation Solution”. Se agita en vortex durante 30 s y se centrifuga a 13.000 rpm durante 3 min.
5. Se transfieren los sobrenadantes a un tubo Eppendorf limpio añadiendo 300 μL de isopropanol. Se mezcla varias veces por inversión, durante 1 min. Se centrifugan las muestras a 13.000 rpm durante 1 min, se elimina el sobrenadante y se añaden 300 μL de etanol al 70%, mezclando varias veces por inversión durante 1 min.
6. Se centrifugan las muestras a 13.000 rpm durante 1 min y se elimina el etanol. Se seca el precipitado al aire durante 15 min. Se añaden 50 μL de “DNA Hydration Solution”. Se resuspende el ADN incubando la muestra a 65 °C durante 1 h o bien durante toda la noche a temperatura ambiente.

Perlas de vidrio acidificadas: se mezclan las perlas de vidrio con ácido nítrico concentrado (realizar en campana de extracción), durante 1 h, lavando extensivamente con agua y secando en un horno.

3.6.7 Determinación espectrofotométrica de la cantidad de ADN o ARN

La cuantificación de la cantidad de ADN o ARN de una muestra se realizó según el procedimiento descrito por **Sambrook J** y col., (1989) basado en la medida de la absorbancia de una muestra, en un espectrofotómetro y en cubeta de cuarzo, a 260 y 280 nm. La lectura a 260 nm permite determinar la concentración de ácido nucleico en la muestra mientras que la medida a 280 nm indica la cantidad de proteínas. De esta forma, una D.O. de 1 corresponde, aproximadamente, a 50 $\mu\text{g/mL}$ de ADN de doble cadena, 40 $\mu\text{g/mL}$ de ADN monohebra y ARN, y a 20 $\mu\text{g/mL}$ de oligonucleótidos de cadena sencilla. La relación entre las medidas a 260 nm y a 280 nm ($\text{DO}_{260}/\text{DO}_{280}$) proporciona información de la pureza del ácido

nucleico. Preparaciones puras de ADN o ARN tienen valores de 1,8 y 2, respectivamente.

3.6.8 PCR mutagénica

La generación de variabilidad genética se realizó mediante la utilización del kit *GeneMorph® PCR mutagenesis* (Stratagene, La Jolla, C.A., EE.UU.).

El método se basa en la utilización de la enzima Mutazyme™, una ADN polimerasa que introduce un amplio rango de mutaciones con mayor frecuencia que la *Taq* polimerasa. La frecuencia de mutación deseada se logra variando la cantidad de molde en la reacción, de manera que cantidades menores de ADN se duplican más veces que cantidades mayores acumulando por tanto más mutaciones.

Con el fin de lograr entre 1 y 2 mutaciones por kb, se utilizaron 100 ng de molde y el programa utilizado en el termociclador fue el siguiente:

Segmento	Nº de ciclos	Temperatura	Duración
1	1x	95°C	1 min
2	30x	95°C	1 min
		Primer T _m -5°C	1 min
		72°C	1 min ó 1min/kb
3	1x	72°C	10 min

Finalizada la reacción, se analizó en un gel de agarosa y, una vez aislada la banda, se clonó en un vector apropiado y se realizó la transformación. De las colonias obtenidas se seleccionaron 10 clones al azar para secuenciar el fragmento con el fin de comprobar la frecuencia de mutación obtenida.

3.6.9 Construcción de una colección de variantes en *P. pastoris*

Con el fin de obtener una colección de variantes del gen *lipI*, obtenidas mediante PCR mutagénica, expresadas en *P. pastoris*, se llevó a cabo una estrategia basada en el sistema de clonación “Gateway® Technology” (Invitrogen, Carlsbad, EE.UU). Esta tecnología se basa en el sistema de recombinación específica de sitio del fago λ en *E. coli*. Las reacciones Gateway® son versiones *in vitro* de las reacciones de integración y excisión, empleando las mismas proteínas implicadas en los procesos lítico y lisogénico del fago λ . Este sistema permite la inserción de fragmentos de ADN, manteniendo la orientación y el marco de lectura de los mismos, reemplazando el uso de enzimas de restricción y de ligasa. Debido a ello, esta estrategia presenta una elevada eficiencia en la clonación/subclonación de fragmentos de ADN.

El fundamento de este proceso se muestra en la **Figura 8A**. El gen de interés, localizado entre dos sitios de integración *attB* (presentes en *E. coli*), se hace reaccionar con un plásmido conteniendo el gen *ccdB* (gen que codifica para una proteína que interfiere con la ADN girasa de *E. coli*, impidiendo el crecimiento de la célula) flanqueado por los sitios de integración *attP* (presentes en el fago λ). Tanto los sitios de integración *attP* como *attB* poseen dominios de unión para proteínas que median en el proceso de recombinación, la integrasa y el factor de integración del hospedador, respectivamente. Cuando se produce la recombinación mediante una reacción BP (**Figura 8A**), se obtienen dos nuevos productos: un plásmido conteniendo el gen de interés flanqueado por dos sitios *attL* y un subproducto portando el gen letal *ccdB* rodeado por dos sitios *attR*.

Una modificación de este sistema se utilizó para realizar directamente la clonación de las variantes del gen *lipI* de *G. geotrichum* BT107, obtenidas mediante PCR mutagénica, en vectores de expresión de *P. pastoris* (**Figura 8B**)

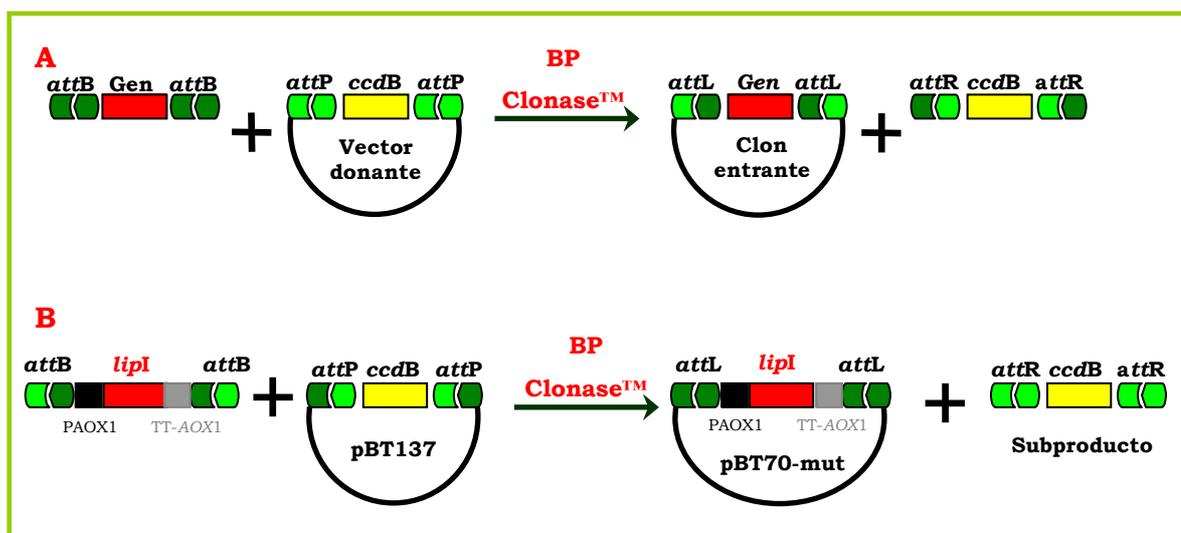


Figura 8. Gateway® Technology. **A)** La recombinación entre un sustrato *attB* (producto de PCR-*attB* o un clon de expresión linealizado-*attB*) con un sustrato *attP* (vector donante), genera un clon entrante con un sitio *attL* (catalizado por la mezcla de enzimas BP Clonase™). **B)** Obtención de una colección de variantes del gen *lipI* en vectores de expresión de *P. pastoris*.

En primer lugar, y utilizando el plásmido pBT69 como molde, se obtuvieron variantes mediante PCR mutagénica usando como cebadores los oligonucleótidos GATE-B1-D y GATE-B2-R, que portan las secuencias *attB* y el extremo 5' del promotor *AOX1* y las secuencias *attB* y el extremo 3' del terminador *AOX1*, respectivamente (**Tabla 9**).

La composición de la mezcla de reacción fue la siguiente:

Compuesto	Volumen	Concentración final
Agua Mili-Q	41,5 µL	
Tampón 10X Mutazyme	5 µL	
Mezcla dNTPs	1 µL	200 µM
Mezcla cebadores	0,5 µL	250 ng/µL
Mutazyme	1 µL	2,5 U
pBT149	1 µL	10-100 ng de diana

El fragmento amplificado con estas condiciones se recombinó mediante una reacción BP (**Figura 8B**), cuya composición fue la siguiente:

Producto PCR (variantes gen <i>lipI-attB</i>)	10 µL
pBT137 (<i>donor vector</i>)	2 µL
Tampón clonasa 5x	4 µL

BP Clonase™ Enzyme Mix

4 µL

La reacción se incubó a 25°C durante la noche. Transcurrido este tiempo se añadieron 2 µL de Proteinasa K y se incubó a 37°C durante 10 min.

Como producto de esta reacción *in vitro* se obtuvo una colección de plásmidos, denominada pBT70-mut, que se utilizaron para transformar células de *E. coli* (“One Shot® TOP 10 Chemically Competent”, Invitrogen) que se sembraron en placas de LB conteniendo zeocina.

3.7 Transferencia, marcaje e hibridación de ADN

3.7.1 Transferencia

La transferencia de ADN de geles de agarosa a membranas de nylon Hybond N+ (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Reino Unido) se realizó mediante un sistema de transferencia a vacío (Vacuum Blotter System, BioRad). El método fue el siguiente:

1. Una vez visualizado el gel de agarosa, se incuba 15 min en ácido clorhídrico 0,25 M con agitación suave. Se elimina el ácido y se lava el gel con agua destilada.
2. Se añade solución desnaturalizante y se incuba 30 min con agitación suave. Se elimina, se lava con agua destilada y se añade solución neutralizante. Se incuban 30 min
3. Se coloca un filtro de nylon sobre la placa porosa de la cubeta de transferencia. Sobre el filtro se coloca una lámina de plástico que cubra toda la placa porosa y que posea una apertura rectangular en el centro, de un tamaño ligeramente inferior al filtro.
4. Se coloca el gel sobre el filtro y se conecta la bomba de vacío (Hydrotech™ Vacuum Pump, BioRad).
5. Se cubre el gel con SSC 20x. Se mantiene la transferencia durante, al menos, 2 h. Una vez transcurrido el tiempo, se apaga el sistema de vacío, se retira el gel, se recoge el filtro y se fija el ADN a la membrana mediante luz ultravioleta (UV Stratalinker® 1800, Stratagene).

3.7.2 Marcaje

Los fragmentos de ADN utilizados como sondas se marcaron con digoxigenina 11-dUTP utilizando el “DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I” (Roche, Manheim, Alemania).

1. El proceso de marcaje se realizó mediante “random priming” utilizando entre 10 ng–3 µg de ADN (diluidos hasta un volumen final de 16 µL de agua MilliQ estéril) que se hirvieron durante 10 min y se dejaron enfriar rápidamente en un baño de hielo.
2. A continuación, se añade 4 µL del reactivo “DIG-high prime” (conteniendo la enzima Klenow) al ADN desnaturalizado. Mezclar y centrifugar brevemente.
3. Incubar 20 h a 37°C. Detener la reacción añadiendo 2 µL de EDTA 0,2 M pH 8,0 o calentando a 65°C durante 10 min.

3.7.3 Hibridación

3.7.3.1 Prehibridación e hibridación

Ambos procesos se realizaron siguiendo las indicaciones del “DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I” (Roche).

1. Se precalienta un volumen apropiado de “DIG easy Hyb” (10 mL/100 cm² membrana) a la temperatura de hibridación (37-42°C). Prehibridar la membrana durante 30 min.
2. Se añade la sonda previamente desnaturalizada a un volumen apropiado de “DIG easy Hyb” precalentado (3,5 mL/100 cm² membrana) y se mezcla bien evitando la formación de burbujas.
3. Se elimina la solución de prehibridación y se añade la solución de hibridación (conteniendo la sonda) a la membrana. Se incuba durante la noche con agitación suave a 42°C.
4. Se elimina la solución de hibridación y se lava la membrana con 2x SSC, 0,1% SDS a temperatura ambiente bajo constante agitación (2 x 5 min).
5. Se repiten los lavados con 0,5x SSC, 0,15% SDS (precalentado a la

temperatura de lavado) a 65-68°C bajo constante agitación (2 x 15 min).

3.7.3.2 Detección inmunológica

1. Después de realizar los lavados, se enjuaga la membrana durante 1-5 min en “Washing buffer” (Tampón maleico, 0,3% (v/v) Tween 20).
2. Se incuba durante 30 min en 100 mL de “Blocking solution” (preparar una solución 1x diluyendo 1:10 la solución stock del kit, con tampón maléico). Preparar fresca.
3. Se incuba 30 min en 20 mL de “Antibody solution” que contiene el anticuerpo anti-DIG (digoxigenina) ligado a una fosfatasa alcalina (se diluye 1:5000 en “Blocking solution”).
4. Se lava dos veces 15 min con 100 mL de “Washing buffer”.
5. Se equilibra 2-5 min con 20 mL de “Detection buffer” (0,1 M Tris-HCl, 0,1 M NaCl, pH 9,5).
6. Se incuba la membrana con 10 mL de “color substrate solution” (se añade 0,2 mL de solución stock NBT/BCIP a 10 mL de “Detection buffer”) en oscuridad.
7. La reacción se detiene lavando la membrana durante 5 min con 50 mL de agua Mili-Q o con TE.

3.8 Transformación

3.8.1 Preparación de células electrocompetentes

3.8.1.1 *Escherichia coli*

Mediante este procedimiento se preparan las células de *E. coli* para alcanzar un estado de “competencia” que permita introducir varias copias de un vector plasmídico (**Sambrook J** y col., 1989), y una alta eficiencia de transformación (hasta 10^9 - 10^{10} transformantes por μg de ADN).

1. Se inoculan 100 mL de medio LB con una colonia aislada de *E. coli* TOP 10 F' y se incuba a 37°C y 250 rpm hasta una D.O. a 550 nm de 0,75.
2. Se recogen las células por centrifugación a 5.000 rpm y 4°C durante 10 min.

3. Se elimina el sobrenadante y se resuspenden las células en 100 mL de glicerol helado al 10% en agua Mili-Q.
4. Se recogen las células, de nuevo, por centrifugación. Se desecha el sobrenadante y se resuspenden de nuevo en 100 mL de glicerol al 10%.
5. Se recogen las células por centrifugación y se resuspenden en 330 μ L de glicerol al 10%. Se utilizan inmediatamente o se reparten en alícuotas de 40 μ L y se almacenan a 80°C.

3.8.1.2 Levaduras

Se siguió el protocolo de **Becker DM** y **Guarente L** (1991) utilizándose como cepas hospedadoras *P. pastoris* X-33 y *S. cerevisiae* BJ5465. La electroporación en *P. pastoris* es el método de transformación idóneo cuando interesa obtener transformantes con múltiples copias del gen de interés. La frecuencia de inserción de multicopias varía entre un 1%-10%.

1. Una colonia aislada de levadura se inocula en 5 mL de medio YPD y se incuba a 30°C y 250 rpm durante toda la noche.
2. Se inoculan 500 mL de medio YPD, en un matraz Erlenmeyer de 2 L, con 0,1-0,5 mL del cultivo anterior e se incuba hasta que la DO_{600nm} este entre 1,3-1,5 (durante toda la noche).
3. Se recogen las células por centrifugación a 1500 x g y 4°C, durante 5 min. Se desecha el sobrenadante y se resuspenden las células en 500 mL de agua helada estéril.
4. Se centrifugan como en el paso anterior y se desecha el sobrenadante. Las células se resuspenden en 250 mL de agua helada estéril.
5. Se vuelve a centrifugar y a eliminar el sobrenadante. Se resuspenden las células en 20 mL de sorbitol helado 1 M.
6. Se centrifugan de nuevo, se desecha el sobrenadante y se resuspenden las células en 1 mL de sorbitol helado 1 M. Se mantienen en hielo y se utilizan en ese mismo momento.

3.8.2 Electrotransformación

3.8.2.1 *E. coli*

El protocolo de electroporación que se ha utilizado fue el siguiente:

1. Se descongelan 40 μL de suspensión de células competentes en hielo y se mezclan con 1-5 μL de ADN.
2. Se transfiere la mezcla a una cubeta de electroporación (0,2 cm) previamente enfriada en hielo.
3. Se seca bien el exterior de la cubeta y se coloca en el soporte, previamente enfriado a -20°C , del aparato de electroporación.
4. Se ajustan las condiciones de electroporación (10 μF , 2.500 V y 600 Ω) en el Micropulser™ (BioRad). La duración del pulso debe ser de 4-5 milisegundos para obtener una buena eficiencia de transformación.
5. Se añade 1 mL de medio LB y se incuba a 37°C con agitación (250 rpm).
6. Se siembran en placas de medio de selección apropiado.

3.8.2.2 Levaduras (*P. pastoris* y *S. cerevisiae*)

1. Se mezclan 80 μL de células electrocompetentes con 5-10 μg de ADN linearizado (en 5-10 μL de agua estéril) y se transfiere la mezcla de células y ADN a una cubeta de electroporación de 0,2 cm previamente enfriada en hielo.
2. Se incuba la cubeta con la mezcla 5 min en hielo.
3. Se ajustan las condiciones de electroporación en el electroporador (10 μF , 2.500 V y 600 Ω).
4. Se añade inmediatamente 1 mL de sorbitol helado 1 M a la cubeta. Se transfiere el contenido de la cubeta a un tubo estéril de 15 mL y se incuban las células a 30°C sin agitación, durante 1 h.
5. Transcurrido este tiempo, se añade 1 mL de YPD y se incuba a 30°C durante 1 h y 250 rpm de agitación.

6. Se siembran en placas de medio YPDS conteniendo 100µg/mL de zeocina, en el caso de *P. pastoris*, o en placas de medio selectivo sin uracilo conteniendo sorbitol 1 M para *S. cerevisiae*. Se incuba a 30°C durante 2 ó 3 días.

3.8.3 Transformación de células competentes químicas

3.8.3.1 *E. coli*

El protocolo de transformación seguido esta detallado en el kit “One Shot®” (Invitrogene). Estas células debido a su elevada eficiencia se utilizaron para la transformación con las reacciones obtenidas mediante la modificación del sistema de recombinación Gateway® en vectores de *P. pastoris*.

1. Se descongela, en hielo, una alícuota de 50 µL de células competentes One Shot®.
2. Se añade 1-5 µL de la reacción de recombinación y mezclar suavemente con las células, sin pipetear.
3. Se incuba el vial en hielo durante 30 min.
4. Se incuba la mezcla 30 s en un baño de agua a 42°C. No mezclar ni agitar. Se deposita el vial en hielo.
5. Se añaden 250 µL de medio S.O.C. (suministrado por el kit) e incubar a 37°C y 225 rpm durante 1 h.
6. Se siembran alícuotas de 20-200 µL por placa de medio LB agar con el antibiótico apropiado. Incubar a 37°C 14-20 h.

3.8.3.2 *S. cerevisiae*

Se utilizó “Yeast Transformation Kit” (Sigma Chemical, Munich, Alemania). Las células de levadura se incuban en una solución tamponada de cloruro de litio, y a continuación la transformación se realiza mediante la incubación de las células competentes con el ADN transformante y el *DNA carrier* (ADN de testículos de salmón) en una solución que contiene polietilen glicol (PEG).

1. Se inocula una colonia en 20 mL de medio YPD líquido en un matraz de 100

- mL.
2. Se incuba a 30°C y 200-250 rpm durante toda la noche. El cultivo debe alcanzar la fase de crecimiento estacionario (D.O.a 600nm>2).
 3. Se diluye el cultivo hasta 100 mL en un matraz de 500 mL, de manera que la D.O.a 600nm final sea aproximadamente de 0,3. Se incuba a 30°C con agitación durante 3-6 h. La D.O.a 600 nm del cultivo debería duplicarse al menos una vez y no pasar de 1,5.
 4. Se recogen las células por centrifugación a 5000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente. Se elimina el sobrenadante y se resuspenden las células en 50 mL de agua destilada estéril.
 5. Se centrifugan de nuevo las células como en el paso anterior y se elimina el sobrenadante. Se resuspenden las células en 1 mL de *transformation buffer*. Las células pueden almacenarse una semana a 4°C o se puede añadir glicerol al 15% y mantener las células a -70°C.
 6. Se toman 10 µL de *DNA carrier* (ADN de testículos de salmón) (10 mg/mL) y 0,1 µg de ADN, y se añaden a 100 µL de células competentes. Se mezcla con vortex.
 7. Se añaden 600 µL de *Plate buffer* y se mezcla con vortex. Se incuba a 30°C con agitación durante 30 min
 8. Se añaden 71 µL de DMSO y se aplica un golpe de calor a 42°C durante 15 min en un baño o un bloque calefactor.
 9. Se centrifugan las muestras durante 3 s y se elimina el sobrenadante.
 10. Se resuspenden las células en 500 µL de agua estéril. Se siembran 100 µL en placas de selección y se incuba a 30°C durante 2-3 días hasta que aparezcan las colonias.

3.9 Electroforesis de macromoléculas

3.9.1 Electroforesis de ADN

La separación de moléculas de ADN se realizó utilizando agarosa (“Agarose D-1 Low EEO”, Pronadisa, España) con diferentes porcentajes dependiendo del tamaño

de los fragmentos de ADN a separar y utilizando TAE como tampón de electroforesis.

Las muestras de ADN se mezclaron con 0,2 volúmenes de tampón de carga ("Blue/Orange 6X Loading Dye", Roche). Una vez cargadas las muestras, la electroforesis se desarrolló aplicando una diferencia de potencial de 80-100 V durante 1-2 h. Una vez finalizada, los geles se tiñeron sumergiéndolos en una solución de bromuro de etidio durante 15-20 min. Los geles se observaron sobre un transiluminador (UVT-20 M/W, Herolab, Watford Herts, U.K.) y se analizaron mediante un sistema de imagen (GeneGenius™, Syngene Frederick, EE.UU.).

3.9.2 Electroforesis de proteínas

3.9.2.1 Condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE)

El método seguido para la realización de este tipo de electroforesis fue el descrito por **Laemmli** (1970), utilizándose un sistema discontinuo basado en la utilización de dos geles: uno concentrante y otro separador, con diferentes características de porosidad, pH y fuerza iónica. Todo ello favorece una mayor resolución de las bandas proteicas en el gel separador.

La preparación de los geles y el desarrollo de la electroforesis se realizó con el sistema Mini-Protean II (BioRad). Se utilizaron geles con un 10-12%, de poliacrilamida útiles para separar proteínas con un peso molecular comprendido entre 30 y 100 kDa.

La solución del gel separador contenía:

Agua Mili-Q	3,35 mL
Tris HCl 1,5 M pH 8,8	2,5 mL
Acrilamida/Bisacrilamida 30%(BioRad)	4,0 mL
SDS 10%	0,1 mL

La mezcla se desgasifica mediante vacío durante 10 min y se añaden 50 µL persulfato amónico (10% p/v) y 5 µL de TEMED. Se agita suavemente y se introduce la mezcla con una pipeta entre los cristales de la cubeta. Una vez cargado el gel se cubre con 2-butanol para evitar el contacto con el aire y formar un frente recto. Se

deja polimerizar durante 45-60 min, a temperatura ambiente.

La solución del gel concentrante contenía:

Agua Mili-Q	3,35 mL
Tris HCl 1,5 M pH 8,8	2,5 mL
Acrilamida/Bisacrilamida 30%(BioRad)	4,0 mL
SDS 10%	0,1 mL

La mezcla se desgasifica mediante vacío durante 10 min y se añaden 50 μ L persulfato amónico (10% p/v) y 10 μ L de TEMED. Se agita suavemente, se carga una vez retirado el butanol, y se coloca el peine para formar los pocillos. Dejar polimerizar durante 15 min, a temperatura ambiente.

1. Las muestras se diluyen con 2 volúmenes de tampón de carga SDS-PAGE y se hierven durante 5 min
2. Se monta la cámara de electroforesis, llenando las cubetas superior e inferior con tampón de electrodos. Se cargan las muestras y se realiza la electroforesis a 100-150 V durante 50-60 min
3. Finalizada la electroforesis, se desmonta el gel, se tiñe con solución Coomassie durante 30 min y se destiñe con solución de desteñido durante 2-3 h.

El tamaño de las bandas se asignó por comparación con marcadores de peso molecular comerciales (BioRad).

3.9.2.2 Condiciones nativas (PAGE)

En este tipo de electroforesis se persigue que las proteínas mantengan su estructura terciaria (o cuaternaria) activa, por lo que se introducen una serie de modificaciones en el protocolo anteriormente descrito. En primer lugar, la electroforesis se desarrolla en ausencia de SDS en los geles, en tampón de carga y en el de electrodos. No se añade β -mercaptoetanol al tampón de carga y las muestras no se hierven antes de ser cargadas en el gel.

3.10 Métodos de Proteínas

3.10.1 Determinación de la concentración

La concentración de proteínas presentes en una solución o medio de cultivo se determinó según el método de **Bradford MM**, (1976). El procedimiento se basa en la formación de un complejo entre el colorante, Brilliant Blue G, y las proteínas presentes en la solución. El complejo formado entre el colorante y las proteínas provoca un cambio en el máximo de absorción del colorante de 465 a 595 nm. El valor de la absorbancia es proporcional a la cantidad de proteína existente (dentro de un rango lineal).

Se construye una curva patrón utilizando BSA (albúmina sérica bovina, Sigma) se prepara una solución 1-2 mg/mL en agua Elix. A partir de la misma, preparar diluciones conteniendo 0, 25, 50, 75, 100, 150, 200 y 250 µg/mL.

La reacción se lleva a cabo mezclando 20 µL- 100 µL de muestra (o patrón) con 200 µL-1000 µL de reactivo de Bradford (Sigma). Las muestras se incuban al menos 5 min, a temperatura ambiente y se mide la absorbancia a 595 nm. La medida de las muestras es estable durante 45 min.

3.10.2 Ultrafiltración

La proteína total obtenida tras la inducción se concentró por ultrafiltración para llevar a cabo las reacciones de hidrólisis de lípidos. Para ello, la solución de proteína(sobrenadante del medio de inducción o proteína purificada por intercambio aniónico) se filtró a través de una membrana de 30 kDa de tamaño de poro (YM-30, Millipore) previamente lavada con agua Elix 30 min. El sistema utilizado fue una unidad de ultrafiltración con agitación (Millipore 8200) utilizando nitrógeno a una presión de 0,5 bar.

3.10.3 Digestión de restos glucídicos con Endoglicosidasa H

La enzima Endoglicosidasa H hidroliza preferentemente N-glicanos de alto contenido en manosa. La tasa de desglicosilación puede ser incrementada por la desnaturalización de las proteínas. Además esta desnaturalización extiende la

hidrólisis también a las cadenas laterales ricas en manosa que no son hidrolizadas en condiciones nativas.

La reacción se lleva a cabo tomando 94 μ L de la solución de proteína en tampón citrato sódico 50 mM pH 5,5. A continuación, se añaden 5 μ L de SDS 10% y 1 μ L de β -mercaptoetanol y se hierven las muestras durante 10 min. Por último, se añaden 12,5 mU de endoglicosidasa H y se incuba la reacción 12 h a 37°C.

3.10.4 Determinación de la actividad lipasa

3.10.4.1 Colorimetría

La medida de actividad lipasa de forma colorimétrica se realizó con ayuda del kit “LIP test color” (Roche). Como sustrato se utiliza la 1,2-dilauril-rac-glicero-3-ác. glutárico-(6-metilresorufina)-éster que contiene un enlace éster en posición *sn*-3 y dos enlaces éter en las otras dos posiciones de la molécula. Cuando este sustrato se somete a la acción de la lipasa, ésta actúa sobre el único enlace éster de la molécula liberando ácido glutárico-(6-metilresorufina). Éste compuesto, en una solución alcalina, se descompone en ácido glutárico y metilresorufina. La liberación de esta última produce una coloración rojo-violeta que puede medirse a 595 nm.

Para poder relacionar los valores de absorbancia con las unidades de actividad fue necesario determinar el valor del coeficiente de extinción molar de la metilresorufina. Sin embargo, debido a que no existe metilresorufina comercial, se utilizó resorufina que presenta un máximo de absorción a una longitud de onda ligeramente diferente que la que presenta la metilresorufina (570 nm en lugar de 595nm).

El cálculo del coeficiente de extinción molar se realizó a partir de una recta patrón construida con disoluciones sucesivas de una solución concentrada conteniendo resorufina 0,27 mM disuelta en Tris HCl 41 mM pH 8,1, tampón Tris HCl 41 mM pH 8 y tampón tartrato 1,6 mM pH 4 (**Figura 9**).

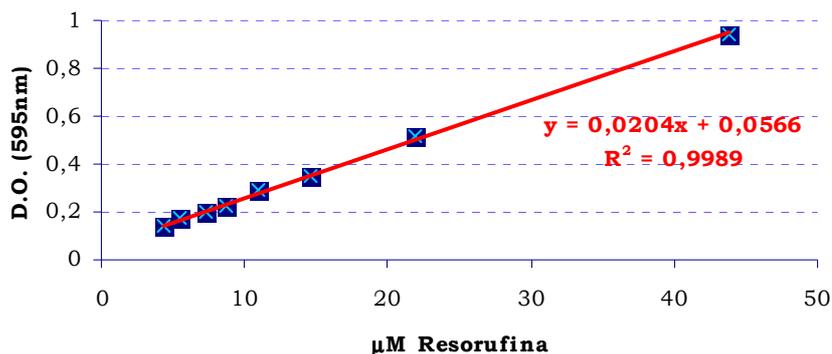


Figura 9. Recta patrón de la resorufina.

El coeficiente de extinción molar se calculó mediante la Ley de Lambert-Beer a partir de la expresión:

$$A = \epsilon \times c \times d$$

donde:

A= absorbancia

ϵ = coeficiente de extinción molar

c= concentración en mol/L

d= 1 cm

Por lo tanto, el valor de ϵ se corresponde con la pendiente de la recta obtenida al representar diferentes concentraciones de resorufina frente a sus correspondientes medidas de absorbancia.

La reacción enzimática se realizó en placas microtiter mezclando 80 μ L del reactivo R1, 48 μ L del reactivo R2, conteniendo el sustrato, y 20 μ L de muestra del medio de fermentación. A continuación, medir la absorbancia a 595 nm.

La Unidad de Actividad Enzimática se definió la cantidad de enzima que es capaz de hidrolizar 1 nmol de metilresorufina equivalente a los nmol de resorufina liberados en un minuto de reacción a 37°C.

3.10.4.2 Valoración ácido-base

La forma más convencional para realizar la medida de actividad lipasa es mediante titulación utilizando un titrino (pH-Stat, Metrohn, Suiza). En este método

se cuantifican los equivalentes del ácido graso liberados por acción de la lipasa en un intervalo de tiempo, a través de los equivalentes de base (NaOH) necesarios para su neutralización.

La mezcla sustrato se preparó en un volumen final de 20 mL, y contenía:

Goma arábica	1 g
Tampón Tris HCl 1mM pH7, NaCl 0,1 M	20 mL
Triglicérido	20 mM

Esta mezcla se homogenizó con agitación durante 10 min y, a continuación, en la mezcla sustrato se introdujeron la sonda de temperatura así como la bureta de adición de NaOH. La reacción de hidrólisis se llevó a cabo a una temperatura de 37°C y 300 rpm. El pH inicial fue 7 y se mantuvo durante la hidrólisis mediante la adición de NaOH 0,01 N. El tiempo de reacción fue 30 min.

La unidad de actividad se definió como la cantidad de enzima que libera 10 miliequivalentes de ácido por minuto. La actividad específica se obtuvo tras dividir las unidades obtenidas por los mg de proteína total en la reacción.

3.11 Síntesis de tri-EPA

3.11.1 Obtención del ácido graso libre

Para llevar a cabo la síntesis del triglicérido triEPA fue necesario, en primer lugar, obtener el ácido graso libre. Ello se realizó a partir del metil éster comercial con una pureza del 95% (EPA Methyl Ester, Larodan, Malrnö, Suecia). La reacción consistió en una hidrólisis alcalina en presencia de hidróxido sódico, EDTA y etanol.

En un matraz de fondo redondo de 250 mL se añadieron 4,8 g de NaOH y 67 g de EDTA. Se adicionaron 46 mL de agua y se agitó hasta lograr su completa disolución. A continuación, se añadieron 46 mL de etanol y se dejó agitando durante 1 h cerrándose el matraz con un tapón con septum. La solución se desgasificó con argón, a través de una cánula, para desplazar el oxígeno presente en la mezcla.

En un matraz de tres bocas se acopló un refrigerante de reflujo por una de las

bocas mientras las otras dos se cerraron, una con un tapón con septum y la otra con un tapón de vidrio y una anilla. Se añadieron 20 g de metil-EPA. A continuación se pasó argón por todo el sistema purgando a través del septum del refrigerante, dejando todo el sistema en atmósfera de este gas.

A través de una cánula conectada a una de las bocas y por diferencia de presión, se pasó la solución conteniendo NaOH, EDTA, agua y etanol. La reacción se dejó en un baño de aceite a 70°C durante 1 h, con agitación máxima.

Transcurrido el tiempo de reacción, se tomó una muestra de 50 µL de la reacción a la que se añadió tres gotas de HCl 1,2 N para neutralizar, mediante la adición de protones, el ácido graso libre, y se mezclaron con vortex. Se añadieron 200 µL de hexano y se agitó de nuevo. Por último, se tomó una muestra de la fase superior y se analizó, junto con el metil-EPA, por cromatografía en capa fina. El desarrollo de la placa se lleva a cabo con la mezcla Hexano:Acetato de etilo (9:1).

Una vez confirmado que la reacción de hidrólisis había transcurrido con éxito, se detuvo enfriando el matraz hasta alcanzar 4°C aproximadamente. Con el fin de neutralizar el ácido graso liberado, se añadió HCl 1,2 N hasta que el pH se situó entre 3 y 4.

La mezcla neutralizada se vertió en un embudo de decantación y se eliminó la fase inferior (acuosa). A la fase remanente (orgánica) se le añadió un poco de Na₂SO₄ anhidro sólido para eliminar el agua, se agitó y se filtró a través de una placa filtrante para eliminar la sal.

En un matraz, previamente tarado, se recogió el filtrado y con ayuda de un rotavapor se eliminó el hexano. Finalmente, se dejó la mezcla con vacío para eliminar cualquier traza de disolvente.

3.11.2 Reacción de síntesis

La reacción se llevó a cabo haciendo reaccionar el EPA con glicerol (relación 3:1) utilizando Hidrocloruro de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDCI) y 4-Dimetilaminopiridina (DMAP) como catalizadores (**Haraldsson A** y col., 2000). En un matraz de 500 mL se pesaron 1,8 g de glicerol, 17,38 g de EDCI y 3,6 g de DMAP. A continuación se añadió el EPA obtenido en la hidrólisis anterior, y un poco

de tamiz seco para que absorbiera las trazas de agua que pudieran existir. El matraz se cerró con un tapón con septum y se sometió a vacío (1 torr) durante varias horas. A través de una cánula y por diferencia de presión, se añadió el disolvente, 250 mL de Diclorometano (DCM). La reacción llevó a cabo a temperatura ambiente y con agitación, en atmósfera de argón, durante 24 h. Transcurrido este tiempo se tomó una muestra de la reacción y se analizó en placas de cromatografía en capa fina (TLC) utilizando como fase móvil hexano:acetato de etilo (7:1).

3.11.3 Extracción

Una vez que se retiró el argón y el tapón de septum al matraz, la reacción se filtró para eliminar los tamices. Se recogió bien toda la reacción utilizando para ello DCM, y se depositó en un embudo de decantación de 1 L. Con la finalidad de eliminar el EDCI y la DMAP, la reacción se lavó primero con HCl 1,2 N, a continuación, con NaHCO₃ saturado y finalmente con salmuera (NaCl a saturación).

En cada paso de lavado se eliminó la fase superior (acuosa). A la fase orgánica resultante se le añadió Na₂SO₄ anhidro (sólido) para eliminar el agua, se agitó y se filtró para eliminar la sal, lavando el embudo con DCM, el cual fue eliminado con ayuda de un rotavapor y con vacío durante 15 minutos. La fase cruda así obtenida se almacenó a -20°C en atmósfera de argón.

3.11.4 Purificación

La purificación del triEPA a partir del crudo se realizó empleando una columna de silica gel 60Å (Sigma) disuelto en hexano. El volumen de columna fue de, aproximadamente, 1 L. Tanto en la parte superior como inferior de la columna se añadió una capa de 1 cm de espesor de arena de mar con el fin de obtener un frente uniforme.

El crudo se añadió sobre la columna con ayuda de hexano y un poco de acetato de etilo. Como fase móvil se utilizó hexano:acetato de etilo (12:1) recogiéndose 16 fracciones de 100 mL.

En una placa TLC se analizaron pequeñas muestras de las fracciones recogidas, seleccionándose aquellas donde apareció el triEPA. Las fracciones

seleccionadas se mezclaron y se evaporó el disolvente con un rotavapor. Para eliminar cualquier traza de disolvente se sometió la muestra a vacío durante 15 min. El triEPA obtenido se almacenó a -20°C en atmósfera de argón.

3.12 Determinación de la especificidad de sustrato por HPLC-MS

El análisis por HPLC-MS (*High Performance Liquid Chromatography Mass*, Cromatografía Líquida de alta resolución con detector de masas) permite determinar, de forma cuantitativa, la concentración del ácido graso libre (EPA u oleico) y triglicérido (triEPA o trioleína) en las muestras y, de forma cualitativa, la presencia de monoglicéridos y diglicéridos. Ello es posible empleando distintos modos de ionización (**Robert C** y col., 2001). Así, se utilizan las condiciones ESI (*Electrospray Ionization*, ionización por electro spray) para los monoglicéridos y ácidos grasos, y las condiciones APCI (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*, Ionización Química a Presión Atmosférica) para los diglicéridos y triglicéridos.

El equipo utilizado fue un HPLC 2695 Waters (Massachussets, EE.UU), provisto de un detector de ultravioleta (PDA) y un detector de masas tipo cuadrupolo (ZQ). El análisis se realizó bajo las condiciones cromatográficas y de detección que se muestran, respectivamente, en las **Tablas 14** y **15**.

El patrón de EPA utilizado se obtuvo mediante hidrólisis de metilEPA comercial y el patrón de triEPA fue sintetizado en el laboratorio con una pureza $> 99\%$ (ver apartado 3.11). Los patrones de ácido oleico y de trioleína (pureza $>99\%$) fueron comerciales (Sigma).

La cuantificación de las muestras se realizó mediante interpolación de los resultados obtenidos frente a rectas patrón obtenidas a partir de soluciones madre con una concentración de 10 mg/mL preparadas en acetato de etilo. Las disoluciones se conservaron a -20°C para evitar la evaporación del disolvente. A partir de estas soluciones madre se prepararon diluciones con diferentes concentraciones (100, 50 y 10 mg/L) para obtener la curva de calibrado correspondiente para cada compuesto (**Figura 10 A-D**).

3. Materiales y Métodos

Tabla 14. Condiciones de la separación cromatográfica de triglicéridos (trioleína y triEPA) y ácidos grasos (oleico y EPA) en HPLC-MS.

Fase estacionaria	Trigl.: Waters Spherisorb ODS-2, 4,6 x 250 mm 5 μ m Ác. Grasos: Waters Atlantis dC 18, 3,0 x 150 mm 3 μ m
Fase móvil (isocráticas)	Fase A: MeOH Fase B: Acetona Fase C: Acido Fórmico 0,1% Fase D: Acetato Amónico 1 mM Flujo 0,8 mL/min para APCI y 0,25 mL/min para ESI Modo de análisis (isocrático 0-10 min) TriEPA y trioleína: 58% A, 40% B, 2% C EPA y oleico: 90% A, 10% D
Inyección	Vinyección (μ L):10 Profundidad de la Aguja: 3 mm Tcarrusel muestra ($^{\circ}$ C): 25,0 \pm 5,0 Tcolumna ($^{\circ}$ C): 40,0 \pm 5,0

Tabla 15. Condiciones de detección de triglicéridos (trioleína y triEPA) y de ácidos grasos (oleico y EPA) en HPLC-MS.

Modo APCI + (triEPA, trioleína)	Modo ESI (EPA, oleico)
Corona: 2,70 μ A	Capilar: 2,5 kV
Cono: 25 V	Cono: 37 V
Extractor: 3 V	Extractor: 3 V
RF Lens: 0,5	RF Lens: 0,5 V
T _{Fuente} : 120 $^{\circ}$ C	T _{Fuente} : 120 $^{\circ}$ C
T _{cono} : 20 $^{\circ}$ C	T _{cono} : 20 $^{\circ}$ C
T _{Desolvatación} : 400 $^{\circ}$ C	T _{Desolvatación} : 250 $^{\circ}$ C
Gas Cono:71 L/h	Gas Cono: 58 L/h
Gas Desolvatación: 360 L/h	Gas Desolvatación: 298 L/h
Resolución: 15/15	Resolución: 15,0/ 15,0
EM: 600 V	EM: 650 V
Función SIR: APCI +	Función SIR: ESI -
Centroide	Centroide
0,3 s scan time	0,3 s scan time
0,1 s interscan time	0,1 s interscan
945 (span 2) masa, triEPA	301,2 (span 2), masa EPA
885,9 (span 3) masa, trioleína	281,5 (span 2) masa Oleico
0,5 Dwell time	0,5 Dwell time
t _r (triEPA) = 18,0 min	t _r (EPA) = 10,48 min
t _r (trioleína) = 25,0 min	t _r (Oleico) = 14,29 min
Modo de medida: área	Modo de medida: área

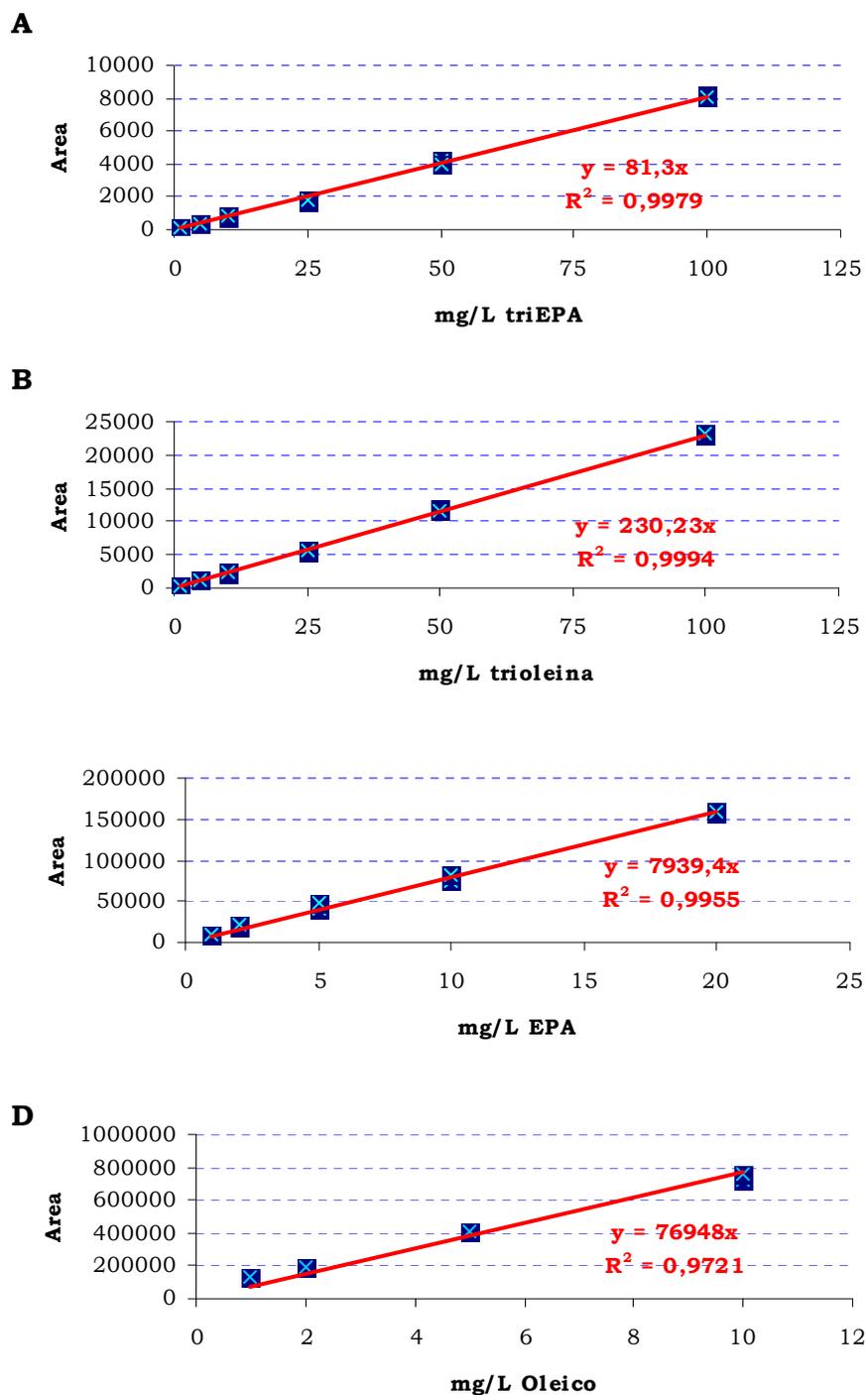


Figura 10. Rectas de calibrado. **A:** triEPA; **B:** trioleina; **C:** EPA; **D:** oleico.

3. Materiales y Métodos

La preparación de las muestras se realizó en tubos “Culture tube 16 x 100 sul scre”, Pyrex®. La composición de las mezclas de hidrólisis fue la siguiente:

Sustrato (triEPA/trioleína/EUPOLY-EPA)	17 mg
Colato sódico 2,3 mM	243 µL
CaCl ₂ 1,5 M	0,1 mL
Tris HCl 0,1 M pH 8	hasta 1,5 mL

La muestra se agitó en vortex unos segundos y, a continuación, se añadió la enzima resuspendida en tampón Tris HCl 0,1M pH 8. Se volvió a agitar unos segundos y se repartió en alícuotas de 0,4 mL que se incubaron en un baño a 40°C, con agitación fuerte. La reacción se paró añadiendo 0,13 mL de HCl 6 N.

Los productos de la reacción se extrajeron a los tiempos 0, 30 y 60 min añadiendo 3 mL de mezcla hexano:clorofomo (9:1), se agitó en vortex 90 segundos y se centrifugó a 4.000 rpm durante 5 min. La fase superior (orgánica) se retiró a un tubo limpio. La extracción se realizó una segunda vez en las mismas condiciones.

A partir de la fase orgánica extraída (aproximadamente 6 mL) se preparó una dilución 1/10 en acetato de etilo a un volumen final de 1,5 mL. Se mezcló bien, se dejó reposar en oscuridad durante una hora y, finalmente, se inyectaron en el HPLC-MS.

4. Resultados

4.1 Aislamiento de la cepa *Galactomyces geotrichum* BT107

A partir de una muestra de alpeorujó se prepararon varias diluciones en agua Elix estéril. Cien μL de estas diluciones se sembraron en placas de PDA y se incubaron a 28°C durante cinco días. En estas condiciones se observó el crecimiento de varias especies fúngicas que se aislaron mediante cultivos sucesivos en placas de PDA.

Con la finalidad de identificar aquellos microorganismos que producían lipasas entre los aislados en alpeorujó, se realizó una selección en placas conteniendo agar al 2% y, como única fuente de carbono, aceite de oliva o aceite ROPUFA® (DSM, Heerlen, Holanda) con un 30% de PUFAs, en presencia de rodamina B. Este último es un compuesto fluorescente que en presencia de ácidos grasos incrementa su fluorescencia al exponerlo a la luz u.v.

Sobre estas placas de selección se colocaron tacos de agar con los hongos aislados del alpeorujó y como control positivo se utilizó *Aspergillus oryzae*. Tras 48 horas de incubación a 28°C aparecieron en las placas halos fluorescentes alrededor de tres tacos indicando la posible presencia de actividad lipasa.

Uno de los microorganismos que producía estos halos fue identificado como *Galactomyces geotrichum* y a la cepa aislada se le llamó *G. geotrichum* BT107. A partir de cultivos crecidos en PDA se prepararon suspensiones de esporas en glicerol al 30% y se almacenaron a -80°C .

4.2 Producción de lipasas en la cepa *G. geotrichum* BT107

Con la finalidad de confirmar la producción de lipasas por parte de *G. geotrichum* BT107, se intentó forzar la inducción de la expresión de los genes implicados en medio YP con sales suplementado con un 1% de aceite de oliva o un 1% de aceite ROPUFA®.

En todas las muestras analizadas (0-144 h) se observó la existencia de actividad lipasa, aunque se apreciaban notables diferencias según el tipo de aceite utilizado como fuente de carbono (**Figura 11**). Así, al utilizar ROPUFA® sólo se detectó

4. Resultados

actividad lipasa después de 48 h de fermentación y ésta resultó ser, aproximadamente, 5 veces inferior a la obtenida en presencia de ácido oleico. Sin embargo, todas las muestras de los cultivos conteniendo aceite de oliva mostraron actividad y ésta se incrementó, especialmente, a partir de las 120 h, lo que podría confirmar la inducción, por parte de este sustrato, de la expresión de los genes responsables de dicha actividad.

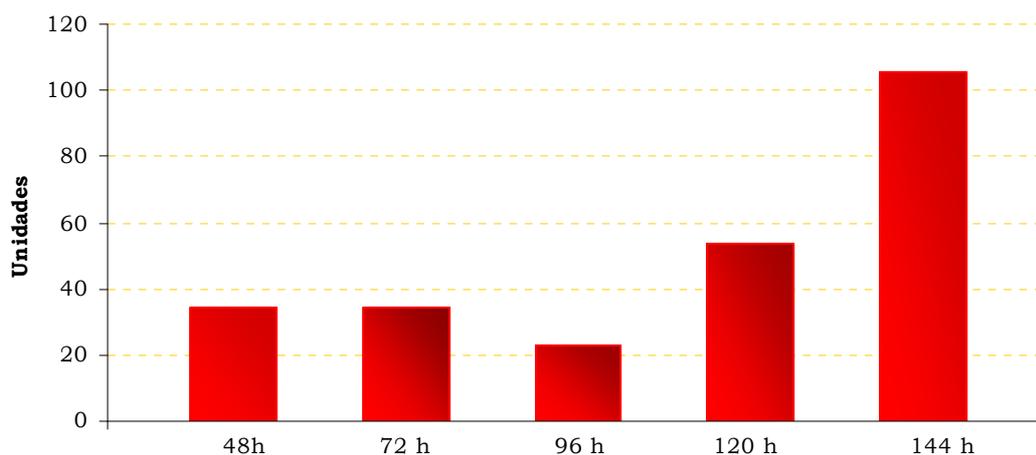


Figura 11. Actividad lipasa en cultivos de *G. geotrichum* BT107 utilizando como única fuente de carbono aceite de oliva al 1% (v/v).

4.3 Clonación y secuenciación del gen *lipI* de *G. geotrichum* BT107

Una vez confirmada la presencia de actividad lipasa en *G. geotrichum* BT107 y a la vista de los datos conocidos sobre las lipasas de esta especie, se planteó la clonación del gen *lipI*, su secuenciación y la caracterización de la proteína GGLIP 1, ya que esta lipasa muestra una elevada especificidad frente a ácidos grasos monoinsaturados y baja actividad sobre PUFAs.

Dado que el gen *lipI* carece de intrones, éste se amplificó por PCR utilizando como molde ADN genómico del hongo. El diseño de oligonucleótidos específicos (GCLip-F3 y GCLip1-R1) se realizó a partir de dos secuencias (E02678 y X78032) depositadas en GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) de forma que no se

amplificase la secuencia correspondiente al péptido señal propio de la proteína.

La amplificación se realizó con una ADN-polimerasa “proof-reading”, (*Pfu* Turbo polimerase, Stratagene) con el objetivo de minimizar la posible generación de mutaciones durante la amplificación.

El producto resultante, una banda de ADN de 1.635 pb, se purificó y ligó con el vector *pUC19* digerido con *Sma*I. A partir de ligación se transformaron células electrocompetentes de *E.coli* TOP 10 F' que se seleccionaron sobre placas de LB conteniendo ampicilina, X-gal e IPTG.

Las colonias blancas resultantes se utilizaron para inocular tubos Eppendorf conteniendo 1 mL de medio TB con ampicilina para realizar minipreparaciones de ADN plasmídico. Una vez obtenido, se realizaron digestiones con *Xho*I y *Xba*I para determinar la orientación el inserto. El plásmido que contenía el gen *lipI* de *G. geotrichum* BT107 en la orientación correcta se denominó pBT69 (**Figura 12**).

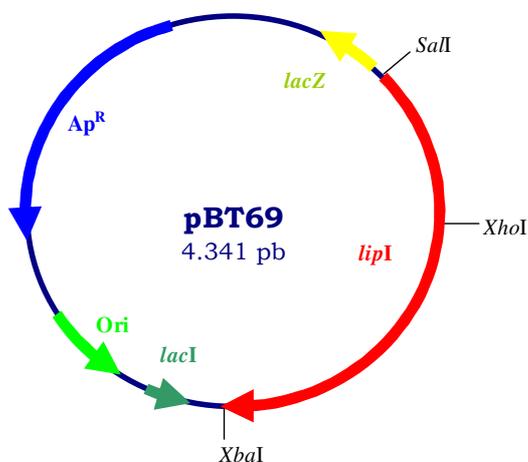


Figura 12. Plásmido pBT69.

Para confirmar la naturaleza del fragmento clonado se procedió a su secuenciación (**Figura 13**). El gen *lipI* de *G. geotrichum* BT107 contiene 1.634 pb y presenta una elevada homología con las secuencias existentes, oscilando entre un 80% con la secuencia de GenBank X78032 correspondiente a la cepa *G. geotrichum* CBS 772.71 (**Phillips A** y col., 1995) y un 98,7% con la secuencia U02622 de la

cepa *G. geotrichum* ATCC 34614 (**Bertolini MC** y col, 1994).

La secuencia de la proteína GGLIP 1 codificada por el gen *lipI*, tiene 544 aminoácidos y presentó una elevada homología (entre un 84-99%) con las otras secuencias depositadas en las bases de datos (**Figura 14**).

La triada catalítica se localiza en las posiciones Histidina (His) 143, Glutámico (Glu) 354 y Serina (Ser) 217. Este último aminoácido se localiza en una zona totalmente conservada que responde a la secuencia Gly-X-Ser-X-Gly, donde X puede ser cualquier aminoácido, formando una estructura característica β -giro- α llamada “codo nucleofílico” (**Figura 14**). El polipéptido presenta dos sitios de N-glicosilación, localizados en las posiciones 283 y 364, y que responden a la secuencia Asn-X-Thr (siendo X cualquier aminoácido). También se distinguen dos puentes disulfuro localizados, uno en la *tapadera peptídica* (Cys61-Cys105) y otro en las posiciones Cys276-Cys288. No se encontró ningún cambio en estas posiciones críticas al comparar las secuencias aminoacídicas.

La región de la proteína correspondiente a la *tapadera peptídica* comprende desde los aminoácidos Met62 hasta Asp104 (**Figura 14**). En esta zona de la proteína se observaron diferencias entre la lipasa GGLIP 1 y la mayoría de las secuencias analizadas. Así, no se observó ningún cambio con la secuencia S41091 y una sola variación (Leu83Ile) con las secuencias P17573 y S41090. Con respecto a la proteína CAA57316, se encontraron diferencias en tres residuos (Asn81, Thr98 y Ser102). La mayor divergencia se observó en el caso de la proteína 1 THG encontrándose hasta 13 cambios (Ala69Ser, Ile70Leu, Ser71Thr, Val76Ala, Val77Leu, Gly80Ala, Ile82Val, Leu83Ile, Asp85Glu, Asn86Glu, Leu87Phe, Gln96Lys, Ser98Thr) en esa zona, a pesar de que la homología global de GGLIP 1 y 1 THG es de un 84%.

CAA	ACC	CCC	ACG	GCC	GTT	CTT	AAT	GGC	AAC	GAA	GTC	ATC	TCT	GGT	GTC	CTT	GAG	GGC	AAG	GTT	GAT	ACC	TTC	AAG	GGA	ATC	CCA	TTT	GCT	GAC	CCT	CCT	GTT	GGT	GAC
Q	T	P	T	A	V	L	N	G	N	E	V	I	S	G	V	L	E	G	K	V	D	T	F	K	G	I	P	F	A	D	P	P	V	G	D
TTG	CGG	TTC	AAG	CAC	CCC	CAG	CCT	TTC	ACT	GGA	TCC	TAC	CAG	GGT	CTT	AAG	GCC	AAC	GAC	TTC	AGC	TCT	GCT	TGT	ATG	CAG	CTT	GAT	CCT	GGC	AAT	GCC	ATT	TCT	TTG
L	R	F	K	H	P	Q	P	F	T	G	S	Y	Q	G	L	K	A	N	D	F	S	S	A	C	M	Q	L	D	P	G	N	A	I	S	L
CTT	GAC	AAA	GTC	GTG	GGC	TTG	GGA	AAG	ATT	CTT	CCT	GAT	AAC	CTT	AGA	GGC	CCT	CTT	TAT	GAC	ATG	GCC	CAG	GGT	AGT	GTC	TCC	ATG	AAT	GAG	GAC	TGT	CTC	TAC	CTT
L	D	K	V	V	G	L	G	K	I	L	P	D	N	L	R	G	P	L	Y	D	M	A	Q	G	S	V	S	M	N	E	D	C	L	Y	L
AAC	GTT	TTC	CGC	CCC	GCT	GGC	ACC	AAG	CCT	GAT	GCT	AAG	CTC	CCC	GTC	ATG	GTT	TGG	ATT	TAC	GGT	GGT	GCC	TTT	GTG	TTT	GGT	TCT	TCT	GCT	TCT	TAC	CCT	GGT	AAC
N	V	F	R	P	A	G	T	K	P	D	A	K	L	P	V	M	V	W	I	Y	G	G	A	F	V	F	G	S	S	A	S	Y	P	G	N
GGC	TAC	GTC	AAG	GAG	AGT	GTG	GAA	ATG	GGC	CAG	CCT	GTT	GTG	TTT	GTT	TCC	ATC	AAC	TAC	CGT	ACC	GGC	CCC	TAT	GGA	TTC	CTA	GGT	GGT	GAT	GCC	ATC	ACC	GCT	GAG
G	Y	V	K	E	S	V	E	M	G	Q	P	V	V	F	V	S	I	N	Y	R	T	G	P	Y	G	F	L	G	G	D	A	G	N	T	N
GGC	AAC	ACC	AAC	GCT	GGT	CTG	CAC	GAT	CAG	CGC	AAG	GGT	CTC	GAG	TGG	GTT	AGC	GAC	AAC	ATT	GCC	AAC	TTT	GGT	GGT	GAT	CCC	GAC	AAG	GTC	ATG	ATT	TTC	GGT	GAG
A	G	L	H	D	Q	R	K	G	L	E	I	T	A	E	W	V	S	D	N	I	A	N	F	G	G	D	P	D	K	V	M	I	F	G	E
TCC	GCT	GGT	GCC	ATG	AGT	GTT	GCT	CAC	CAG	CTT	GTT	GCC	TAC	GGT	GGT	GAC	AAC	ACA	TAC	AAC	GGA	AAG	CAG	CTT	TTC	CAC	TCT	GCC	ATT	CTT	CAG	TCT	GGC	GGT	CCT
S	A	G	A	Q	L	V	A	Y	G	G	D	N	T	Y	N	G	K	Q	M	S	V	A	H	L	F	H	S	A	I	L	Q	S	G	G	P
CTT	CCT	TAC	TTT	GAC	TCT	ACT	TCT	GTT	GGT	CCC	GAG	AGT	GCC	TAC	AGC	AGA	TTT	GCT	CAG	TAT	GCC	GGA	TGT	GAC	GCC	AGC	GCC	GGT	GAC	AAT	GAA	ACT	CTG	GCT	TGT
L	P	Y	F	D	S	T	S	V	G	P	E	A	Q	Y	A	G	C	D	A	S	A	G	D	N	E	T	S	A	Y	S	R	F	L	A	C
CTC	CGC	AGC	AAG	TCC	AGC	GAT	GTC	TTG	CAC	AGC	GCC	CAG	AAC	TCG	TAC	GAT	CTC	AAG	GAC	CTG	TTT	GGC	CTG	CTC	CCT	CAA	TTC	CTT	GGA	TTT	GGT	CCC	AGA	CCC	GAC
L	R	S	K	S	S	D	V	L	H	S	A	Q	N	S	Y	D	L	K	D	F	L	G	F	G	P	R	P	D	G	N	I	I	P	D	L
GGC	AAC	ATT	ATT	CCC	GAT	GCC	GCT	TAT	GAG	CTC	TAC	CGC	AGT	GGT	AGA	TAC	GCC	AAA	GTT	CCC	TAC	ATT	ACT	GGT	AAC	CAG	GAG	GAT	GAG	GTA	CTA	TTC	TTG	CCC	CCG
F	G	L	L	P	Q	A	A	Y	E	L	Y	R	S	G	R	Y	A	K	V	P	Y	I	T	G	N	Q	E	D	E	G	T	I	L	A	P
TTG	CTA	TTA	ATG	CTA	CCA	CTA	CTC	CCC	ATG	TTA	AGA	AGT	GGT	TGA	TGT	CGC	TCT	ACC	CCG	GCT	CTT	GGT	CGG	AGG	GTG	CGC	CAT	TCC	GCA	CTG	GTA	TTC	TTA	ATG	CTC
V	A	I	N	A	T	T	T	P	H	V	K	K	W	L	L	S	L	Y	P	G	S	W	S	E	G	A	P	F	R	T	G	I	L	N	A
TGA	CCC	CTC	AGT	TCA	AGC	GCA	TTG	CTG	CCA	TTT	TCA	CTG	ATT	TGC	TGT	TCC	AGT	CTC	CTC	GTC	GTG	TTA	TGC	TTA	ACG	CTA	CCA	AGG	ACG	TCA	ACC	GCT	GGA	CTT	ACC
T	D	L	L	F	Q	S	P	R	R	V	M	L	N	A	T	K	D	V	N	R	W	T	Y	L	T	P	Q	F	K	R	I	A	A	I	F
TTG	CCA	CCC	AGC	TCC	ATA	ACC	TCG	TTC	CAT	TTT	TGG	GTA	CTT	TCC	ATG	GTA	GTG	ATC	TTC	TTT	TCC	AGT	ACT	ACG	TGG	ACC	TTG	GCC	CAT	CTT	CTG	CTT	ACC	GCC	GCT
L	A	T	Q	L	H	N	L	V	P	F	L	G	T	F	H	G	S	D	L	L	F	Q	Y	Y	V	D	L	G	P	S	S	A	Y	R	R
ACT	TTA	TCT	CGT	TTG	CCA	ACC	ACC	ACG	ACC	CCA	ACG	TTG	GCA	CCA	ACC	TGA	AAC	AGT	GGG	ATA	TGT	ACA	CTG	ATG	CAG	GCA	AGG	AGA	TGC	TTC	AGA	TTC	ATA	TGA	TTG
Y	F	I	S	F	A	N	H	H	D	P	N	V	G	T	N	L	K	Q	W	D	M	Y	T	D	A	G	K	E	M	L	Q	I	H	M	I
GTA	ACT	CTA	TGA	GAA	CTG	ACG	ACT	TTA	GAA	TCG	AGG	GAA	TCT	CGA	ACT	TTG	AGT	CTG	ACG	TTA	CTC	TCT	TCG	GTT	AA										
G	N	S	M	R	T	D	D	F	R	I	E	G	I	S	N	F	E	S	D	V	T	L	F	G											

Figura 13. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos del gen *lipI* de *G. geotrichum* BT107. En cajas de color morado aparece destacada la secuencia correspondiente a la *tapadera peptídica* y en las de color rojo, los nucleótidos/aminoácidos del centro activo.

4. Resultados



Figura 14. Comparación entre secuencias de la lipasa 1 de *G. geotrichum*. Las letras en color verde marcan las diferencias aminoácidas. Destacado en diferentes colores están: en rojo los aminoácidos del centro activo, en morado los aminoácidos de la tapadera peptídica, en amarillo las cisteínas de los puentes disulfuro, en azul los sitios de N-glicosilación y en gris el oxianión. Rodeados por una caja naranja se muestran los aminoácidos conservados alrededor de la serina del centro activo, denominado codo nucleofílico.

4.4 Expresión del gen *lip I* en *Pichia pastoris* X-33

P. pastoris es uno de los sistemas de expresión heteróloga más eficientes para genes eucariotas. La utilización del promotor del gen de la alcohol oxidasa 1 (PAOX1), fuertemente inducible en presencia de metanol, así como la integración del gen de interés, incluso en múltiples copias, permite lograr elevados niveles de expresión intra/extracelulares. Con el objetivo de producir cantidades suficientes de lipasa GGLIP 1 para realizar diferentes ensayos, se procedió a clonar y expresar el gen *lipI* de *G. geotrichum* BT107 en esta levadura.

4.4.1 Construcción del plásmido de expresión

La clonación del gen *lipI* en el vector de expresión pPIC α B se realizó de modo que la secuencia del gen formase un marco de lectura abierto con la secuencia del péptido señal del factor α de *Saccharomyces cerevisiae* para lograr la secreción de la proteína recombinante al medio de cultivo.

Para ello, el oligonucleótido GCLip-F3 (ver apartado 4.3), utilizado para amplificar el gen *lipI*, se diseñó de manera que tuviese una “cola” incluyendo la secuencia de corte *Sa*II y la secuencia que codifica la señal de reconocimiento de la peptidasa KEX2. Esta secuencia es necesaria para el correcto procesamiento de la proteína en el proceso de secreción.

Así, el plásmido pBT69 se digirió con *Sa*II y *Xba*I y, en paralelo, el plásmido pPIC α B se cortó con las enzimas *Xho*I y *Xba*I. La ligación de los extremos compatibles *Sa*II del inserto (gen *lipI*) y *Xho*I del vector produce un cambio de Glutámico (GAG) por Aspártico (GAC) provocando la pérdida de los sitios de corte de ambas enzimas de restricción, pero manteniéndose el marco de lectura.

Diferentes cantidades de esta ligación se utilizaron para transformar células electrocompetentes de *E. coli* TOP 10 F'. La selección de clones se realizó en placas de LB bajo en sal suplementado con zeocina.

De los clones obtenidos se realizaron minipreparaciones de ADN plasmídico, que se cortaron con *Xho*I y *Xba*I para comprobar que la orientación del gen era la correcta. El plásmido resultante se llamó pBT70 (**Figura 15**).

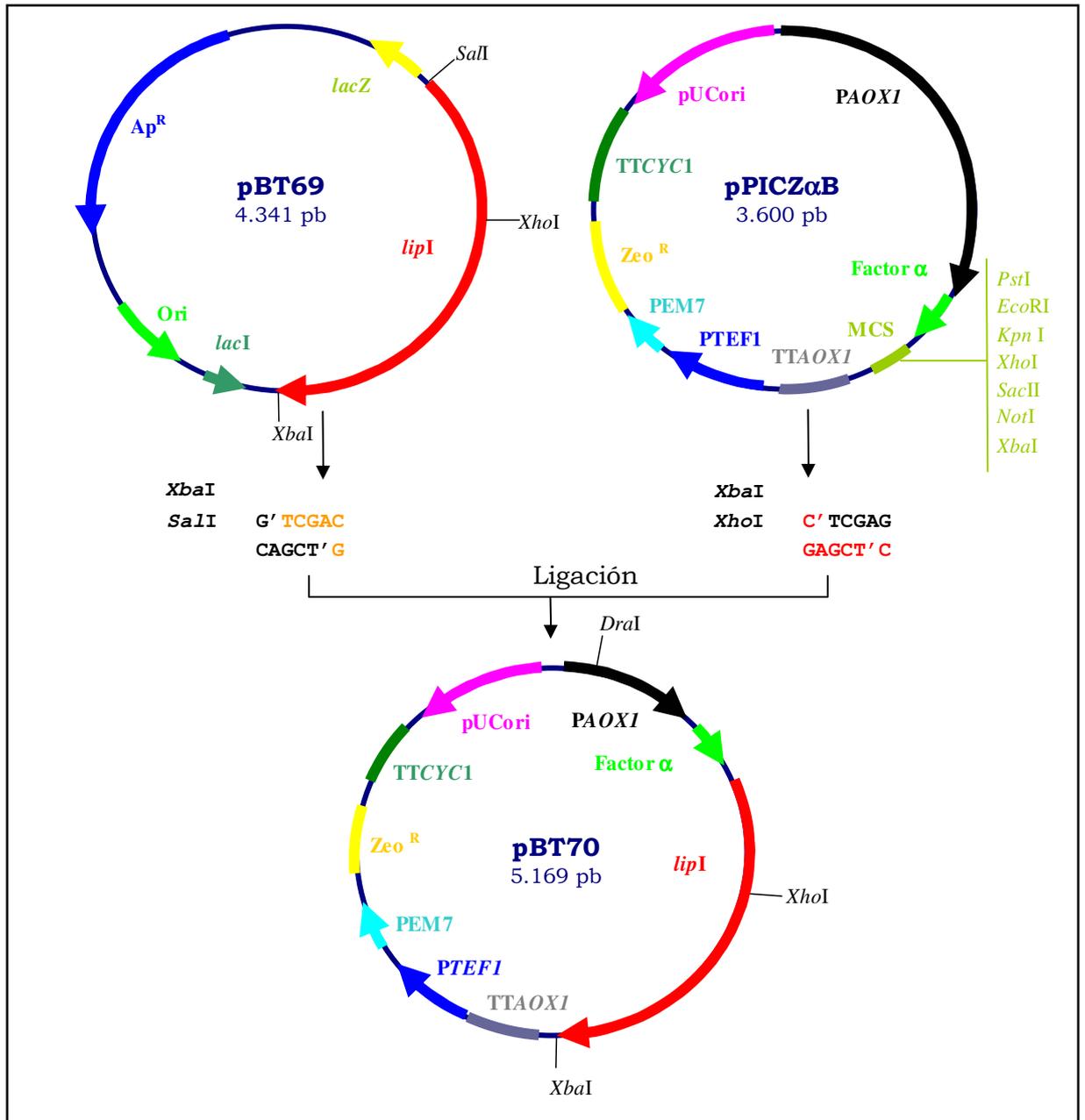


Figura 15. Construcción del plásmido pBT70.

Con la finalidad de obtener transformantes que tuviesen integradas en el genoma varias copias del plásmido pBT70, *P. pastoris* X-33 se transformó por electroporación. Para ello, previamente, el plásmido pBT70 se cortó con *DraI* con el fin de dirigir su integración en el locus del promotor *AOX1* en el genoma de la levadura (**Figura 16**). La mezcla de electroporación (en total 2 mL) se sembró en placas de YPDS con zeocina, obteniéndose aproximadamente 2.000 transformantes,

tras 72 h de incubación a 28°C.

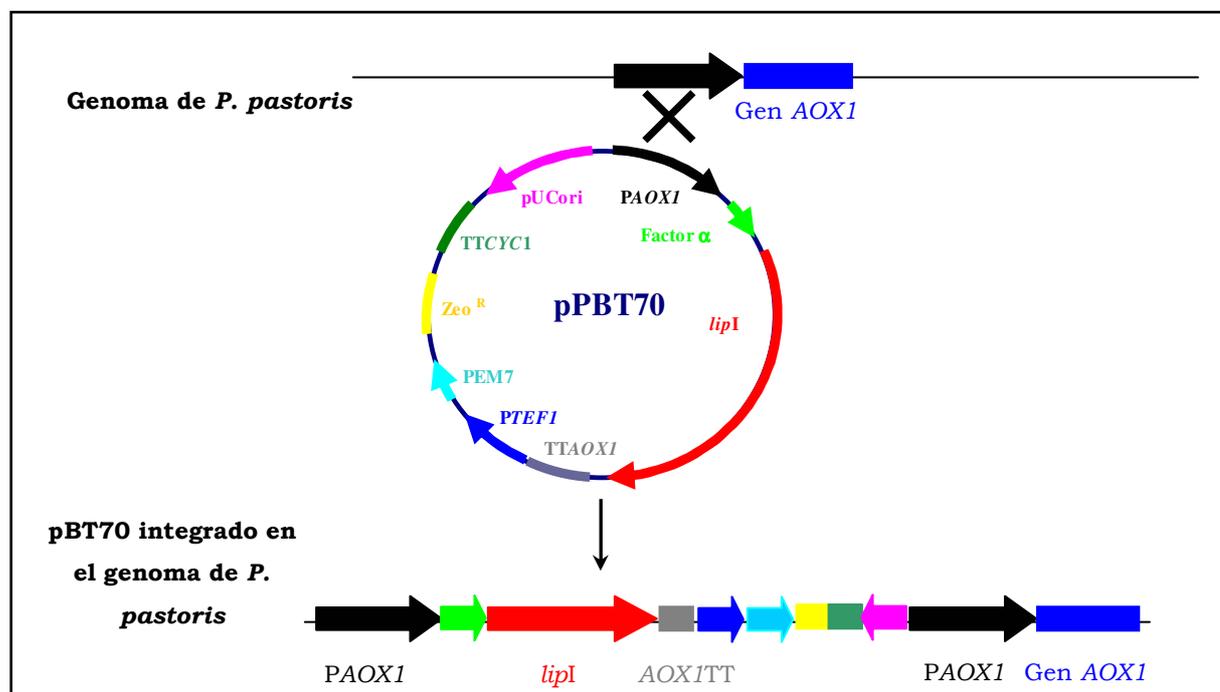


Figura 16. Integración dirigida del plásmido pBT70 en el genoma de *P. pastoris*.

4.4.2 Screening y análisis molecular de los transformantes

4.4.2.1 Selección de los mejores transformantes

Los transformantes de *P. pastoris* X-33 obtenidos se sometieron a un *screening* rápido en placas microtiter *Deep well* (1 mL) donde, en primer lugar, las células se crecieron en 400 µL medio BMGY durante 24 h, 250 rpm a 28°C. Posteriormente se transfirieron 20 µL de cada uno de estos cultivos a otras placas que contenían medio BMMY, incubándose durante 48 h.

La presencia de actividad lipasa se determinó en los sobrenadantes libres de células mediante un ensayo por colorimetría. Como controles negativos se utilizaron un blanco (medio de cultivo no inoculado) y un cultivo de la cepa hospedadora sin transformar.

Se analizaron un total de 378 transformantes de los cuales se seleccionaron los tres que presentaban una mayor actividad enzimática, clones n° 126, 163 y 171

(Figura 17).

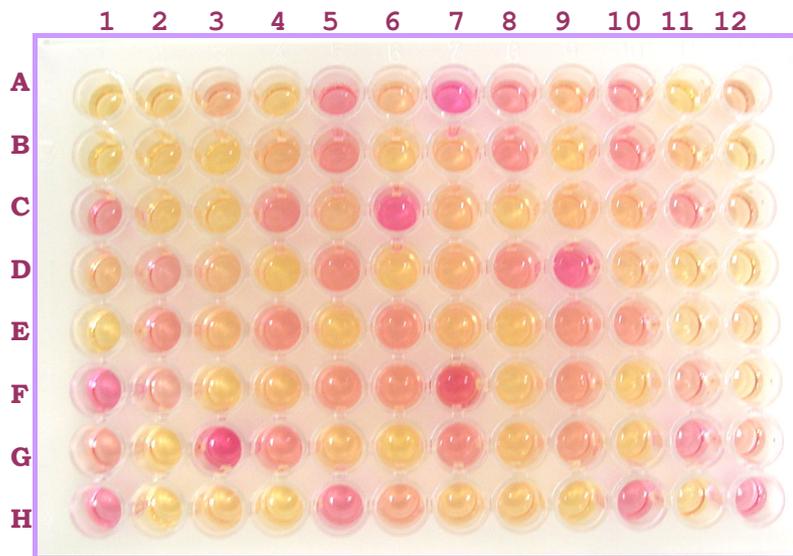


Figura 17. Ensayo de la actividad lipasa en placas microtiter. **A1:** *P. pastoris* X-33 sin transformar, **B1:** blanco, **C6:** clon n°126, **F7:** clon n° 163, **G3:** clon n°171.

Para poder analizar con más precisión la capacidad de producción de GGLIP 1 en los tres clones seleccionados se realizaron varias inducciones en matraz. Para ello, las células crecidas en medio BMGY se resuspendieron en 50 mL de medio BMMY. La inducción con metanol se mantuvo durante 72 h y se analizó la cantidad de proteína y la actividad lipasa presente en los sobrenadantes.

Como se muestra en la **Figura 18**, la cantidad de proteína secretada al medio de cultivo BMMY se incrementó a lo largo del tiempo de inducción. Los clones 126 y 171 mostraron unos valores muy similares alcanzando, aproximadamente, 250 mg/L de proteína total a las 72 h de incubación. El clon 163 fue capaz de secretar la mayor cantidad de proteína total, aproximadamente 275 mg/L y, además, presentó una actividad específica próxima a las 85 U/mg de proteína, un 5-10% más elevada que los clones 126 y 171 (**Figura 19**).

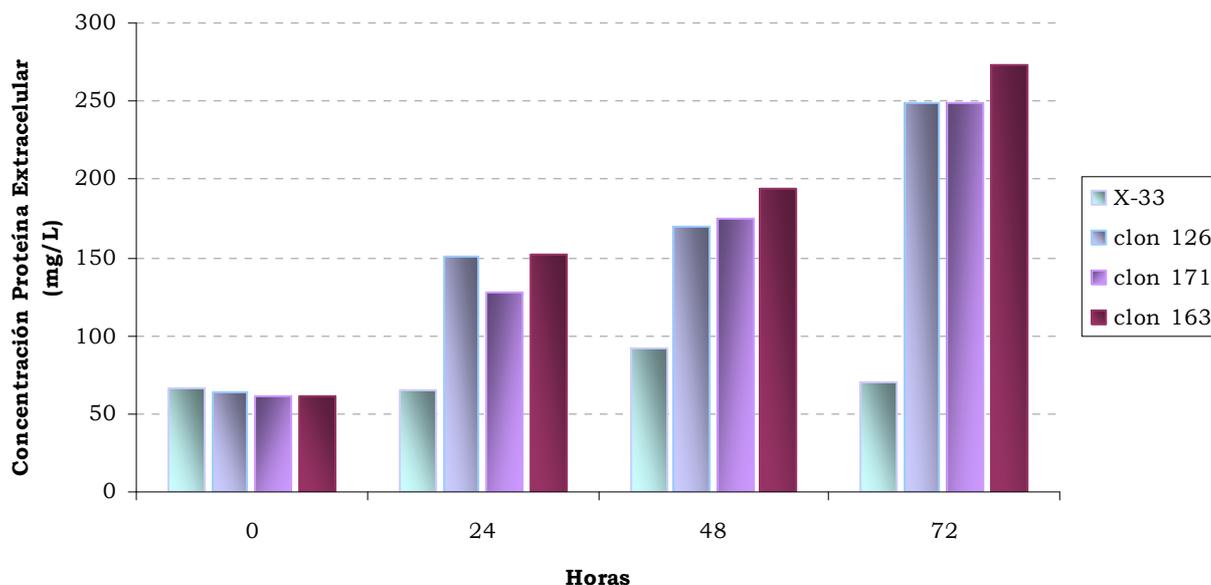


Figura 18. Proteína total secretada por los tres transformantes seleccionados. La inducción se mantuvo durante 72 h mediante la adición de metanol (0,5% volumen final) cada 24 h.

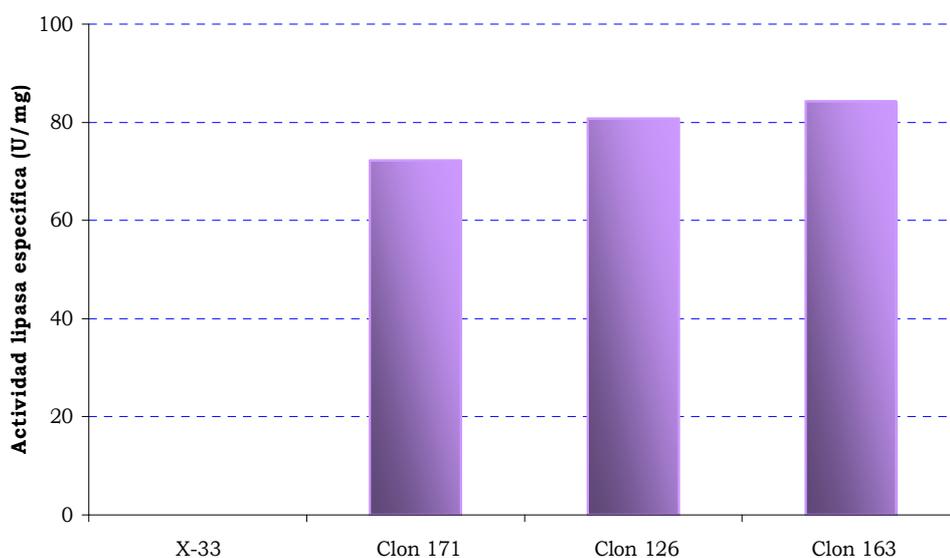


Figura 19. Actividad lipasa específica en los sobrenadantes de cultivos de los clones seleccionados.

La proteína GGLIP 1 secretada por tBT70-163 se analizó, en primer lugar, en un gel SDS-PAGE al 10%. Este análisis reveló la existencia de una banda mayoritaria de, aproximadamente, 63 kDa cuya intensidad aumentaba a medida que se incrementaba el tiempo de inducción y que se correspondía con el tamaño esperado

para la proteína GGLIP 1 (**Figura 20**).

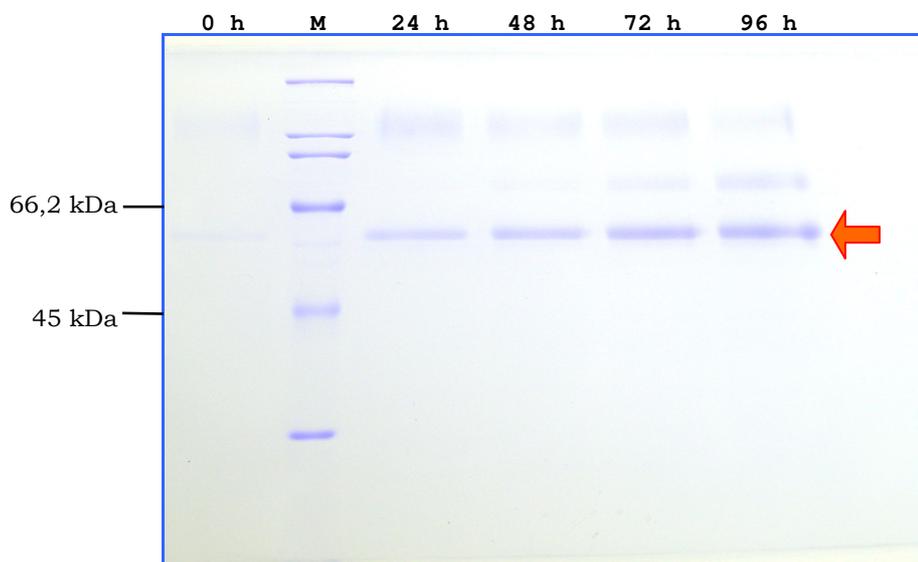


Figura 20. Muestras (15 μ L) procedentes de los sobrenadantes del transformante tBT70-163 en medio BMMY. **M:** Marcador de peso molecular de amplio rango. La flecha indica la banda correspondiente a la proteína GGLIP 1 (~ 63 kDa).

4.4.2.2 Análisis del número de copias integradas

En el proceso de transformación de *P. pastoris* por electroporación pueden integrarse varias copias del plásmido en el genoma de la levadura. Existen varios ejemplos en los que la integración de un elevado número de copias integradas permitió obtener elevados niveles de expresión (**Romanos MA** y col., 1992; **Romanos MA** y col., 1998). El número de copias integradas del plásmido pBT70 en los tres clones seleccionados, se determinó mediante la hibridación del ADN genómico utilizando una sonda específica del promotor *AOX1* de 932 pb marcada con digoxigenina 11-dUTP.

Para ello, el ADN total de los tres transformantes se cortó con *KpnI* y, posteriormente, fue transferido a una membrana de nylon sobre la que se llevó a cabo la hibridación. La hibridación del ADN de la cepa control sin transformar mostró una banda del tamaño esperado de 2,3 kb (**Figura 21**, carril 2), mientras en el caso de los transformantes el tamaño de las bandas obtenidas fue proporcional al número de copias integradas del plásmido. De esta forma, los transformantes con una sola copia integrada de pBT70 mostrarían una banda de 7,4 kb

correspondiente a la suma del tamaño del plásmido (5,16 kb) y 2,3 kb de la banda control (**Figura 21**, carril 3). Sucesivas integraciones conllevan bandas con incrementos de 5,16 kb proporcionales al número de copias.

Los tres transformantes tBT70-126, tBT70-163 y tBT70-171 mostraron el mismo resultado, apareciendo una banda con un tamaño igual ó mayor de 23 kb, lo que indicaba la presencia de cuatro o más copias del plásmido pBT70 integradas en su genoma (**Figura 21**, carril 4).

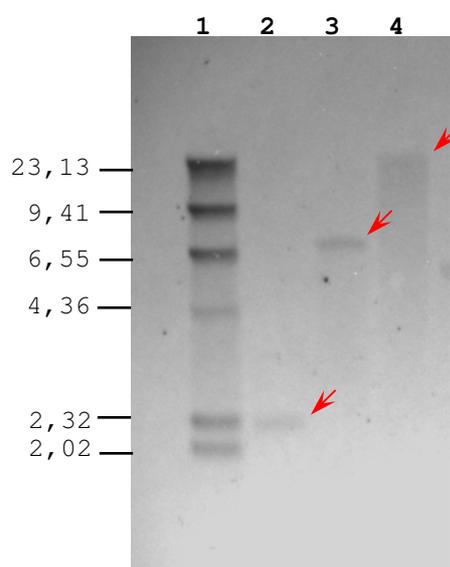


Figura 21. Hibridación de los transformantes de *P. pastoris* X-33. Como sonda se utilizó un fragmento del promotor *AOX1* marcado con UTP-digoxigenina (932 pb). Con una flecha roja se destacan las bandas de hibridación. **1:** λ *Hind* III, **2:** *P. pastoris* X-33 sin transformar, **3:** Transformante con una sola copia integrada, **4:** Transformante tBT70-163 (4 ó más copias integradas).

Debido a que el clon tBT70-163 secretaba una cantidad de proteína ligeramente superior con respecto a los clones tBT70-126 y tBT70-171, y tras comprobar que todos ellos aparentemente eran multicopia, se seleccionó este transformante para realizar posteriores ensayos.

4.5 Caracterización de la lipasa GGLIP 1 recombinante

4.5.1 Purificación por Cromatografía de Intercambio Aniónico

P. pastoris no secreta prácticamente ninguna proteína endógena, por lo que durante la secreción extracelular, la proteína heteróloga recombinante es mayoritaria en el medio de cultivo (**Higgins** y col., 1995). Sin embargo, este medio de expresión (BMMY) contiene sales, pequeños péptidos o aminoácidos por lo que es aconsejable realizar una purificación de la proteína de interés. La cromatografía de intercambio iónico suele ser la técnica de elección ya que es independiente de la concentración de la muestra y permite cargar grandes volúmenes en la columna a flujos elevados.

De esta forma, 250 mL de sobrenadante procedente de un cultivo de la cepa tBT70-163 crecida en medio BMMY durante 120 h se ultrafiltró a través de una membrana de 30 kDa. El retenido se resuspendió en el mismo volumen de tampón Tris HCl 100mM pH 8.

Veinte mL de la muestra concentrada se sometieron a cromatografía de intercambio aniónico en una columna HiPrep™ 16/10 Q FF (Amersham Biosciences) acoplada a un equipo FPLC Äktaexplorer™ (Amersham Biosciences). La elución de la proteína se llevó a cabo con un gradiente de concentración de NaCl de 0 a 0,5 M en tampón Tris HCl 100 mM pH 8.

Se detectó actividad lipasa por colorimetría en 10 fracciones de 5 mL. Estas fracciones se combinaron y se concentraron por ultrafiltración a través de membranas de 10 kDa.

En la **Tabla 16** se muestran los resultados obtenidos durante el proceso de purificación de la proteína GGLIP 1. El factor de purificación obtenido fue de 1,7 veces con respecto a la muestra cruda, lo que indica que la proteína GGLIP 1 era mayoritaria en el caldo de cultivo y, además, tenía una elevada pureza (ver **Figura 20**).

Tabla 16. Purificación de la proteína GGLIP 1. **A.E.:** actividad lipasa específica.

Muestra	Proteína Total (%)	Unidades Totales (%)	A.E.	Factor purificación
Crudo	100	100	99,8	1
Ultrafiltración 30kDa	77,1	97,5	126,2	1,2
Fracciones CI Aniónico	38	42	167,4	1,7

4.5.2 Determinación del peso molecular

Para realizar una estimación más precisa del peso molecular de la lipasa GGLIP 1 se realizó una cromatografía de exclusión molecular utilizando una columna Superosa™ 12 HR (Amersham Biosciences). Se preparó una curva de calibración (**Figura 22**), empleando patrones comerciales y se calculó un volumen muerto (V_0) para la columna de 8,84 mL mediante el análisis del volumen de elución de una molécula de elevado peso molecular (Azul Dextrano, 2.000.000 Da).

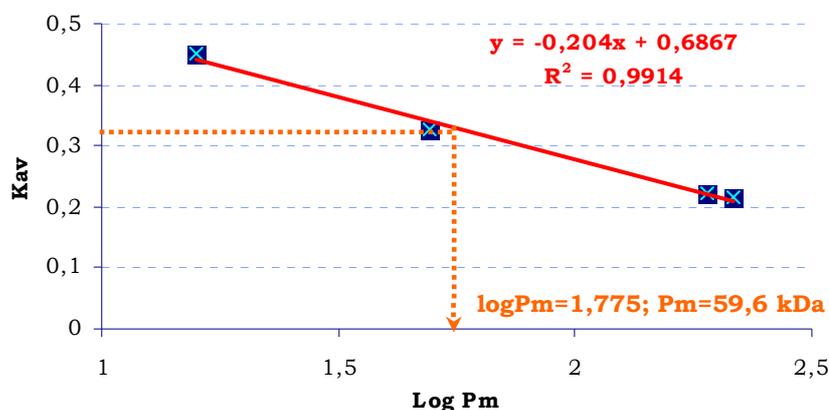


Figura 22. Determinación del peso molecular de la lipasa GGLIP 1 mediante cromatografía de exclusión molecular. Patrones: catalasa (215 kDa), aldolasa (191 kDa), ovoalbúmina (49,4 kDa) y ribonucleasa A (15,8 kDa). K_{av} : $(\text{Volumen}_{\text{elución}} - V_0) / (\text{Volumen}_{\text{columna}} - V_0)$, Log Pm : logaritmo decimal del peso molecular.

La proteína, previamente purificada mediante cromatografía de intercambio aniónico, se concentró mediante ultrafiltración, inyectándose en la columna de exclusión molecular 0,5 mg de proteína total. La elución se llevó a cabo en tampón fosfato sódico 50 mM 0,15 M NaCl pH 7 recogiendo fracciones de 0,5 mL en las que se midió la actividad lipasa por colorimetría. El cromatograma resultante reveló la presencia de un solo pico con actividad lipasa y un volumen de elución de 13,76 mL, correspondiéndole un valor de K_{av} de 0,32454. Tras extrapolar este valor en la recta de calibración, el peso molecular estimado para la proteína fue de 59,6 kDa.

El análisis mediante SDS-PAGE confirmó el tamaño obtenido en la cromatografía de exclusión molecular. El análisis de muestras de la proteína GGLIP 1 sin tratar y tratadas con Endoglicosidasa H mostraron una diferencia de tamaño entre ambas. De forma que mientras que la proteína glicosilada tenía un tamaño de 63 kDa (ver **Figura 20**), la proteína desglicosilada presentó un tamaño aproximado de 59 kDa. Esta diferencia de, aproximadamente, 4 kDa podría deberse a la incorporación de unas 20 unidades de manosa (PM manosa = 181,32 Da) entre los dos sitios de N-glicosilación presentes en la proteína (ver **Figura 14**).

4.5.3 Análisis de la especificidad de sustrato

4.5.3.1 pH-STAT

La actividad de la proteína GGLIP 1 se ensayó mediante una valoración titrimétrica frente a diferentes sustratos: trioleína, tripalmitina, tributirina y triEPA. Como se muestra en la **Figura 23** la actividad frente a trioleína fue muy elevada en comparación con respecto a los dos sustratos saturados de cadena más corta, tributirina y tripalmitina.

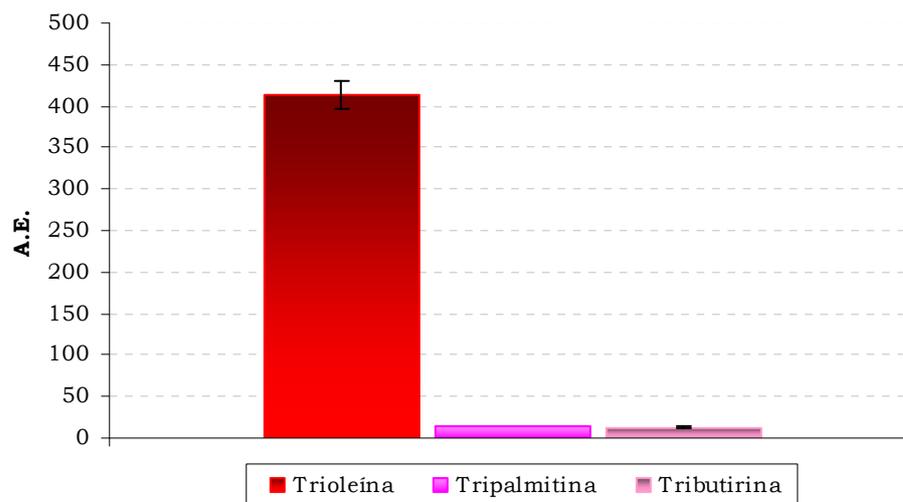


Figura 23. Actividad específica (A.E.) de la lipasa GGLIP 1 medida con el pH-STAT.

Debido al coste y a la complejidad para obtener triEPA, no fue posible obtener resultados fiables con este método al utilizar cantidades más pequeñas de este sustrato y, por lo tanto, fue necesario desarrollar otra metodología de análisis que fuera muy sensible y permitiese utilizar bajas concentraciones de triEPA. Dicho análisis fue posible mediante la puesta a punto de un método por HPLC-MS.

4.5.3.2 Síntesis de triEPA

Debido a la complejidad de los aceites de pescado e, incluso, de concentrados comerciales enriquecidos en PUFAs ω -3, la utilización de ambos como posibles sustratos, tanto para el desarrollo de un método de selección como de un método analítico, fue descartada. Como alternativa, se decidió sustituir estas mezclas heterogéneas por un triglicérido esterificado con tres moléculas de un PUFA. Aunque pueden adquirirse en el mercado tanto DHA como EPA esterificados en forma de metil-éster, se decidió utilizar este último en base a una, teóricamente, relativa mayor estabilidad del EPA con respecto al DHA y al interés comercial del EPA como ingrediente de alimentos funcionales para adultos.

En la **Tabla 17** se muestran las cantidades y el rendimiento alcanzado en cada uno de los pasos de la síntesis. El primer paso se realizó a partir del éster metil-EPA

mediante hidrólisis alcalina en presencia de hidróxido sódico, EDTA y etanol (ver Materiales y Métodos apartado, 3.11), obteniéndose 17,9 g de ácido graso libre (EPA). A partir del EPA se realizó la síntesis del triglicérido, haciéndolo reaccionar con glicerol (relación 3:1) utilizando EDCI y DMAP como catalizadores.

Finalmente, tras su purificación en columna de silica, se recuperaron 14,458 g de triEPA (15,3 mmol). El rendimiento global de la síntesis fue del 77,45%.

La pureza del producto resultante fue del 99%, determinada tras su análisis por HPLC-MS.

Tabla 17. Cantidades de productos y rendimientos durante la síntesis química de triEPA.

Producto	Cantidad (g)	mmoles	Rendimiento (%)
Metil-EPA	20	62,60	
EPA	17,91	59,21	94,58
TriEPA	14,46	15,30	77,45

4.6 Evolución dirigida

4.6.1 Creación de variabilidad genética

Las condiciones de amplificación mediante PCR mutagénica utilizadas en este trabajo fueron seleccionadas para alcanzar un rango de mutación bajo con el fin de obtener diversidad mutacional sin destruir la actividad, aumentando así la posibilidad de encontrar variantes mejoradas. La secuenciación de 10 clones conteniendo variantes del gen *lipI*, seleccionados al azar, confirmaron que la tasa de mutación obtenida bajo estas condiciones fue de 1,2 mutaciones/kb.

4.6.2 Evolución dirigida en *Saccharomyces cerevisiae*

En primer lugar, se abordó la posibilidad de llevar a cabo el proceso de evolución dirigida de la lipasa GGLIP 1 en *S. cerevisiae* mediante procesos de recombinación homóloga *in vivo*.

4.6.2.1 Clonación y expresión del gen *lipI* en *S. cerevisiae* BJ 5465

El primer paso para poder realizar la evolución dirigida de la proteína GGLIP 1 fue la obtención de una cepa control conteniendo un plásmido de expresión que portase el gen *lipI* de *G. geotrichum* BT107.

La estrategia llevada a cabo para la clonación del *cassette* constituido por el factor α de *S. cerevisiae* y el gen *lipI* en el plásmido pJROC30 se muestra en la **Figura 24**. La clonación no podía realizarse en la posición *Bam*HI del vector ya que esta enzima cortaba al gen y, además, por otro lado, se necesitaba una diana *Not*I en el extremo 3' de la secuencia del gen, que en el plásmido pBT70 no existía.

El gen *lipI* se amplificó a partir del plásmido pBT69 con oligonucleótidos específicos (GCLip1-F4 y GCLip1Not-R) obteniéndose un fragmento de 1.642 pb, que posteriormente fue clonado en el plásmido de expresión de *P. pastoris* pPICZ α A dando lugar al plásmido pBT155.

El plásmido pBT155 se digirió con *Csp*45I y *Not*I y el plásmido de expresión en *S. cerevisiae* pJROC30 se cortó con *Bam*HI y *Not*I. Los extremos se rellenaron con Klenow y los fragmentos resultantes se ligaron dando origen al plásmido pBT158 (**Figura 24**).

Las células de *S. cerevisiae* BJ5465 se transformaron por electroporación con el plásmido pBT158 y se seleccionaron en placas de medio mínimo. Las colonias capaces de crecer en este medio se cultivaron en placas microtiter conteniendo 25 μ L de medio mínimo durante 24 h. A continuación, se añadieron 80 μ L de medio de expresión y se incubaron durante otras 24 h. La presencia de actividad lipasa en los cultivos se determinó por colorimetría, confirmando que la proteína GGLIP 1 estaba presente en los sobrenadantes. De todas las colonias obtenidas, se eligió como cepa control el transformante tBT158-19.

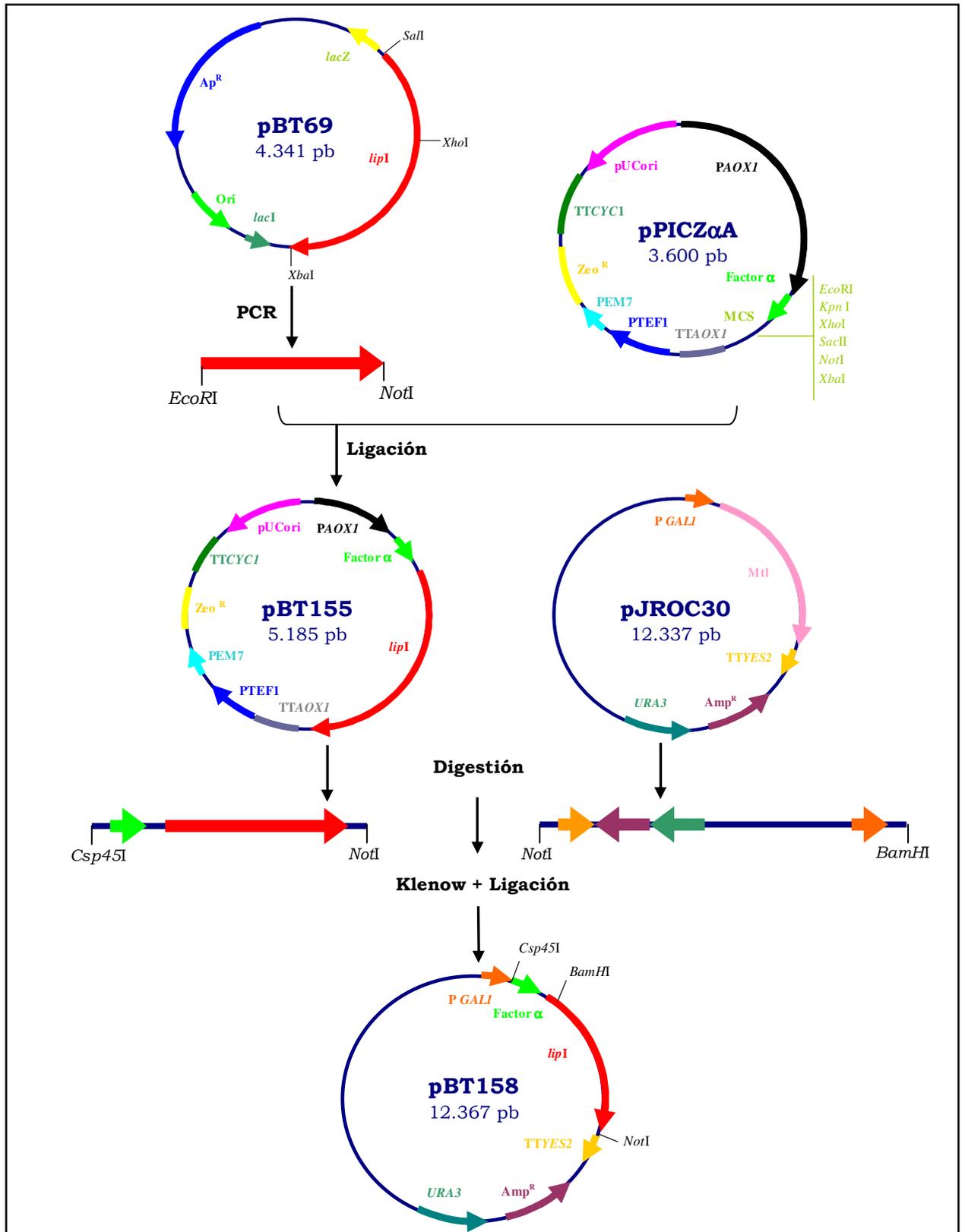


Figura 24. Construcción del plásmido pBT158.

4.6.2.2 Selección

Debido a que en un proceso de evolución dirigida es imprescindible contar con un método de selección robusto, rápido y sencillo, se desarrolló un método por el cual la actividad lipasa podía ser detectada directamente en las colonias sin necesidad de llevar a cabo procesos de inducción en medio líquido.

Así, después de diversos ensayos, se determinó que al sembrar colonias de la cepa control (tBT158-19) en medio de selección conteniendo trioleína como sustrato y, tras 72 h de incubación a 28°C, se detectaba la presencia de actividad lipasa debido a la aparición de un halo fluorescente alrededor de las colonias al ser éstas expuestas a luz ultravioleta. Tanto la cepa hospedadora sin transformar como transformada con el plásmido pJROC30, no mostraron actividad lipasa en estas condiciones.

4.6.2.3 Construcción de colecciones de variantes

La construcción de una colección de variantes en *S. cerevisiae* se realizó aprovechando la facilidad que presenta este microorganismo para llevar a cabo procesos de recombinación *in vivo* (Orr-Weaver TL y col., 1981; Ma H y col., 1987) que permiten la ligación entre fragmentos de ADN que posean, tan sólo, 30 pb homólogos. Este hecho ha sido utilizado para lograr la ligación entre fragmentos de ADN y plásmidos linearizados al cotransformar la levadura.

La construcción de una colección de variantes se realizó como se muestra en la **Figura 25**. La creación de variabilidad genética se llevó a cabo utilizando como molde la secuencia del gen *lipI* clonada en el plásmido pBT158. Los oligonucleótidos que se emplearon fueron el 158PCRMUT-F1 y el RMLC, los cuales fueron diseñados de manera que el fragmento obtenido por PCR tuviese 34 pb homólogas en el extremo 5' y 65 pb en el extremo 3' con respecto al vector pBT158 cortado con *XhoI*. Para evitar la posible religación del plásmido en la levadura, el vector linearizado fue desfosforilado.

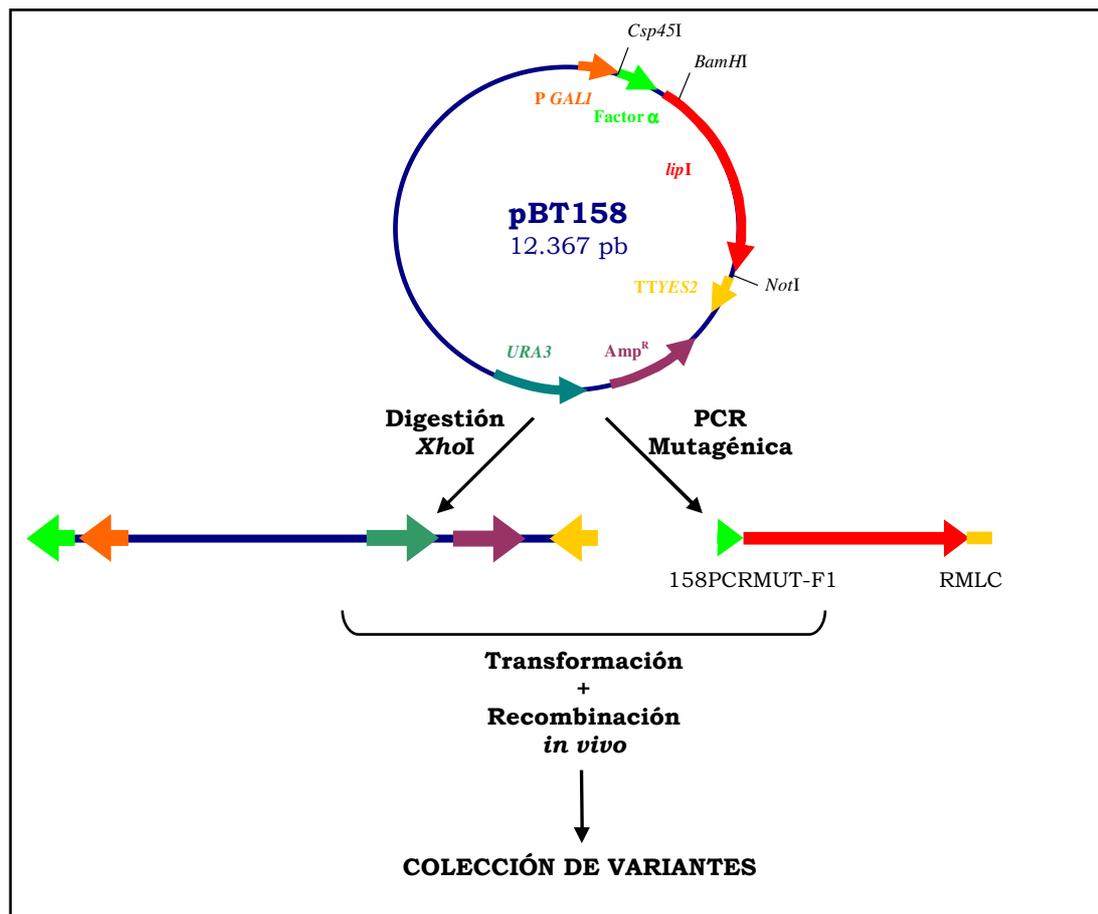


Figura 25. Construcción de una colección de variantes en *S. cerevisiae* BJ5465.

La transformación de *S. cerevisiae* BJ5465 se realizó por vía química. Para llevar a cabo la recombinación *in vivo* se ajustó la relación vector:inserto (1:4), determinando la cantidad de ADN espectrofotométricamente con el fin de que ésta fuera lo más exacta posible. En cada transformación se pusieron dos controles, uno con el vector linearizado y otra transformación únicamente con los fragmentos de PCR.

La transformación con la colección de variantes obtenida, se sembró en medio de selección con trioleína y tras 120 h de incubación a 28°C se obtuvieron numerosos transformantes (1800-2300/placa). En las placas se observaron colonias con actividad lipasa que mostraban un aspecto rosado y emitían fluorescencia al ser expuestas a la luz ultravioleta. También aparecieron colonias de color blanco (aproximadamente un 25%) que no mostraban fluorescencia indicando la ausencia de actividad lipolítica.

Las colonias que mostraron actividad se picaron de nuevo en placas conteniendo trioleína o triEPA como sustratos. Las colonias mostraron la fluorescencia característica en las placas con trioleína pero no se detectó ninguna actividad en las placas con triEPA. Para aumentar la sensibilidad del ensayo, algunas colonias se sembraron en extensiones más grandes (1 cm²) y en este caso sí se observó la presencia de halos fluorescentes. Por lo tanto, el sistema de selección desarrollado no era lo suficientemente sensible y fiable para identificar los clones sin actividad frente a triEPA al sembrar las colonias directamente sobre las placas de selección.

4.6.3 Evolución dirigida en *Pichia pastoris* X-33

Debido a que se descartó la utilización de *S. cerevisiae* para llevar a cabo la evolución molecular por los bajos niveles de proteína heteróloga secretados en las placas de selección, se decidió intentar realizar este proceso en la levadura *P. pastoris*. Esta levadura permite obtener elevados niveles de expresión de genes heterólogos y su cultivo y manipulación son muy similares a los de *S. cerevisiae*.

4.6.3.1 Selección

Tal y como se hizo con *S. cerevisiae*, se desarrolló un sistema que permitiera analizar la actividad lipasa directamente en las colonias crecidas sobre las placas de selección. Para ello, se sembraron colonias de la cepa tBT70-163 sobre placas conteniendo como única fuente de carbono trioleína. Tras 72 h de incubación se pudo observar la presencia de grandes halos fluorescentes indicando la actividad lipolítica (**Figura 26**). Este mismo procedimiento se realizó utilizando placas con triEPA como sustrato. En esta ocasión, a diferencia de lo que ocurría con los transformantes de *S. cerevisiae*, sí fue posible observar claramente la presencia de halos fluorescentes alrededor de las colonias, aunque éstos eran de menor tamaño que en el caso de utilizar trioleína como sustrato (**Figura 26**).

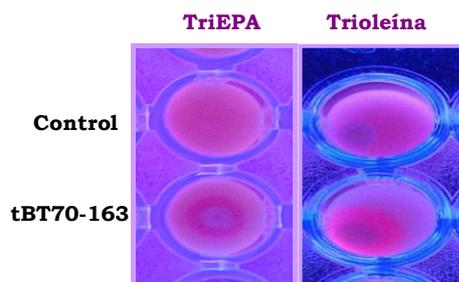


Figura 26. Actividad lipasa frente a triEPA y a trioleína. Control: *P. pastoris* X-33 sin transformar. Las placas se incubaron a 28°C durante 72 h.

4.6.3.2 Obtención de transformantes monocopia

La capacidad de dar lugar a transformantes en los que se integran varias copias del gen de interés es una de las ventajas de la expresión en *P. pastoris*. Sin embargo, a la hora del planteamiento de una estrategia de evolución dirigida el hecho de que los transformantes obtenidos puedan ser multicopia presenta el problema de que en un mismo clon puedan existir diferentes variantes mutadas del gen integradas en el genoma de la levadura.

Por este motivo, fue necesario, en primer lugar, establecer aquellas condiciones de transformación que permitieran obtener clones con una única copia integrada del gen *lipI*. Para ello, se transformó *P. pastoris* X-33 utilizando bajas cantidades del plásmido pBT70 (250, 500 ng) y realizando la selección en placas conteniendo bajas concentraciones de zeocina (25-50 ng/ μ L) con el fin de dificultar las integraciones múltiples (**Tabla 18**).

Tabla 18. Número de transformantes de *P. pastoris* X-33 obtenidos con bajas concentraciones de ADN y de zeocina.

ADN (ng)	Zeocina (ng/ μ L)	Nº Transformantes
500	25	1.251
	50	503
250	25	789
	50	286

Como se muestra en la **Tabla 18**, el número de transformantes obtenidos fue proporcional a la cantidad de ADN utilizado, siendo éstos, aproximadamente, el doble al utilizar la concentración más elevada de ADN. De forma opuesta, al incrementar dos veces la concentración de zeocina en el medio de transformación, el número de clones obtenidos fue unas tres veces menor. Debido a que la capacidad de resistencia a la zeocina está directamente relacionada con el número de copias integradas (**Cereghino JL y Cregg JM, 2000**), la reducción observada podría indicar que la utilización de bajas cantidades de ADN y de zeocina facilitaría la selección de transformantes monocopia.

El análisis, mediante Southern-Blot, de un 20% de los clones obtenidos con 250 ng de ADN y en presencia de 25 µg/mL de zeocina reveló que el 84% eran monocopia (**Figura 27**, carriles 3-6). La mayoría de los clones la transformación obtenidos en las placas de medio de selección contenido trioleína, mostraban actividad lipasa apareciendo, ocasionalmente, alguna colonia blanca que no mostraba actividad. En todos los casos analizados esta ausencia de actividad era debida a problemas de inserción del plásmido en el genoma de esos clones (**Figura 27**, carriles 1 y 2). Como control monocopia para realizar el proceso de evolución molecular se eligió el clon tBT70-399.

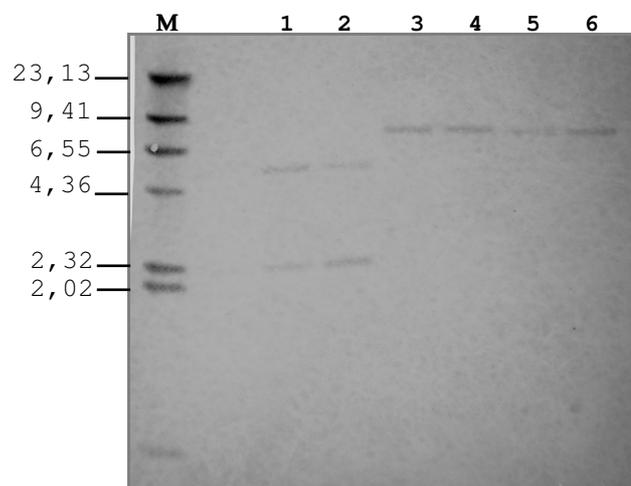


Figura 27. Hibridación de transformantes de *P. pastoris*. Como sonda se utilizó un fragmento del promotor *AOX1* marcado con UTP-digoxigenina (932 pb). **M:** λ HindIII Carriles **1** y **2:** colonias sin actividad lipasa. Carriles **3-6:** transformantes monocopia con actividad lipasa.

4.6.3.3 Construcción de una colección de variantes del gen *lipI* en *P. pastoris*

La obtención de una colección de variantes del gen *lipI* se realizó utilizando una modificación del sistema de clonación Gateway® (Invitrogen). En la **Figura 28** se resume la estrategia seguida para realizar la clonación en plásmidos de expresión de *P. pastoris*.

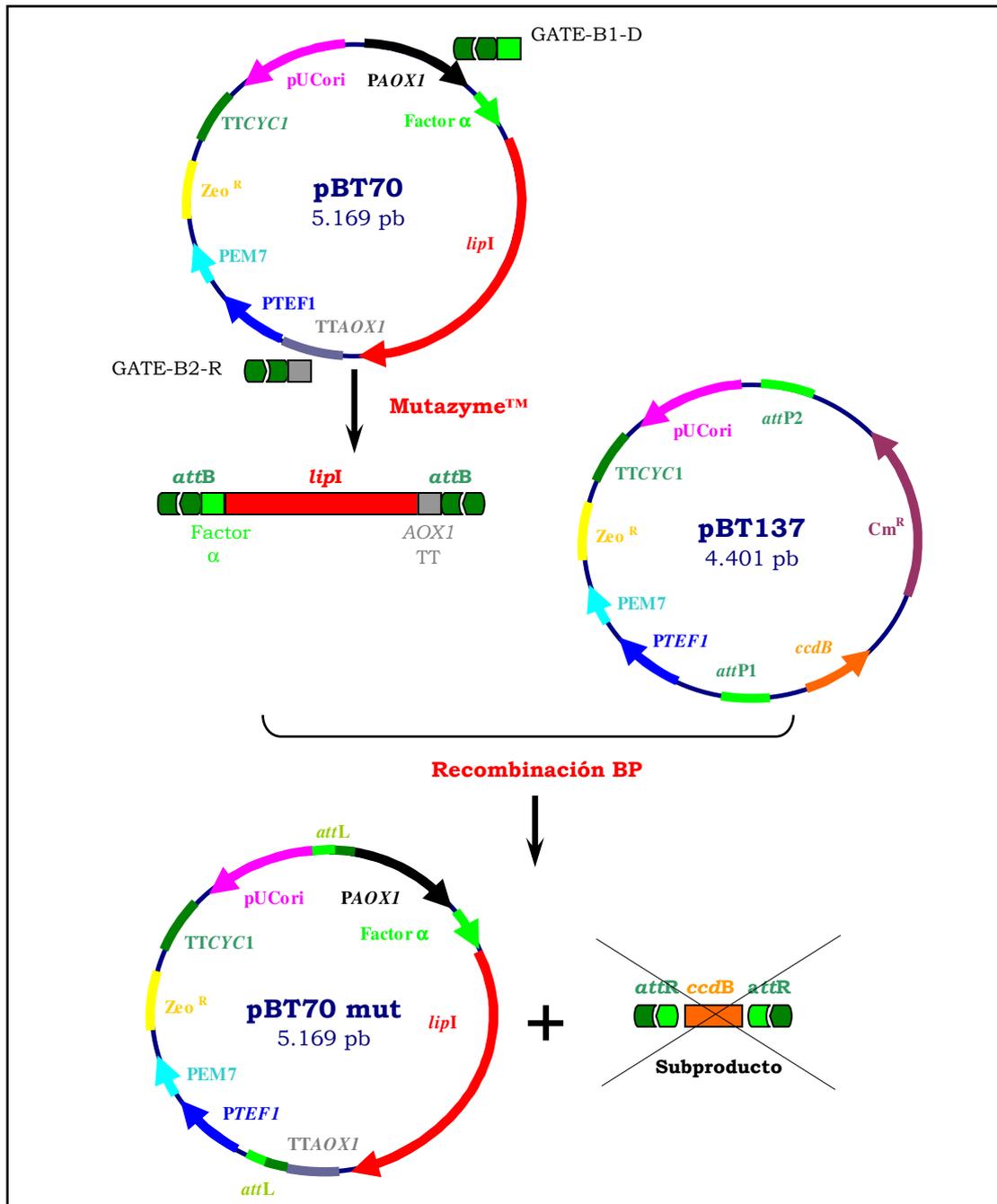


Figura 28. Estrategia para la construcción de una colección de variantes del gen *lipI* en plásmidos de expresión de *P. pastoris*.

Las variantes del gen *lipI* obtenidas, mediante PCR mutagénica, contenían sitios de recombinación *attB* (ver Materiales y Métodos, apartado 3.6.12) que se recombinaron con sitios *attP* presentes en el plásmido pBT137.

De esta manera se originó una colección donde cada plásmido resultante, denominados genéricamente pBT70-mut, portaba, en teoría, una variante diferente del gen *lipI*.

Mediante este método de clonación se obtuvieron 3.629 colonias de *E. coli* que se recogieron en glicerol al 30%.

A partir de una alícuota de la suspensión en glicerol al 30% se realizó la extracción, a gran escala, de los plásmidos pBT70-mut. El ADN purificado se utilizó para transformar *P. pastoris* X-33 en las condiciones para obtener un elevado porcentaje de clones monocopias. Se hicieron cuatro transformaciones obteniéndose un total de 900 transformantes de los cuales un 10% no mostraron actividad al no producir halos fluorescentes en las placas de selección (**Figura 29**).

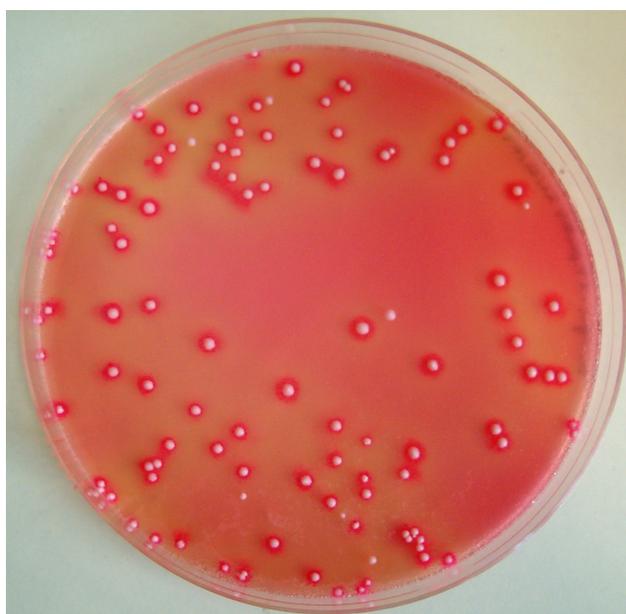


Figura 29. *Screening* de la colección de variantes del gen *lipI* en *P. pastoris*. Las células se sembraron en placas conteniendo trioleína se incubaron a 28°C durante 5 días. La mayoría de las colonias mostraron actividad lipolítica (halo de color más intenso a su alrededor), mientras que otras carecían de actividad (no halo).

4. Resultados

Los clones positivos se picaron, de nuevo, en placas de medio de selección y, una vez reconfirmada la actividad sobre trioleína, los clones positivos se picaron en placas conteniendo triEPA como sustrato. Al igual que se hizo con las placas de trioleína, en cada placa de medio de selección con triEPA se picaron controles negativos y positivos para confirmar la validez de los resultados.

Tras 96 h de incubación a 28°C se seleccionaron 16 variantes de entre, aproximadamente, 800 clones analizados, que no mostraban actividad frente a triEPA (**Figura 30**). Los transformantes seleccionados se picaron de nuevo en medio con trioleína para comprobar cuales de ellos mostraban mayor actividad (**Figura 31**), seleccionándose finalmente 6 transformantes: n° 79, 97, 126, 425 y 747.

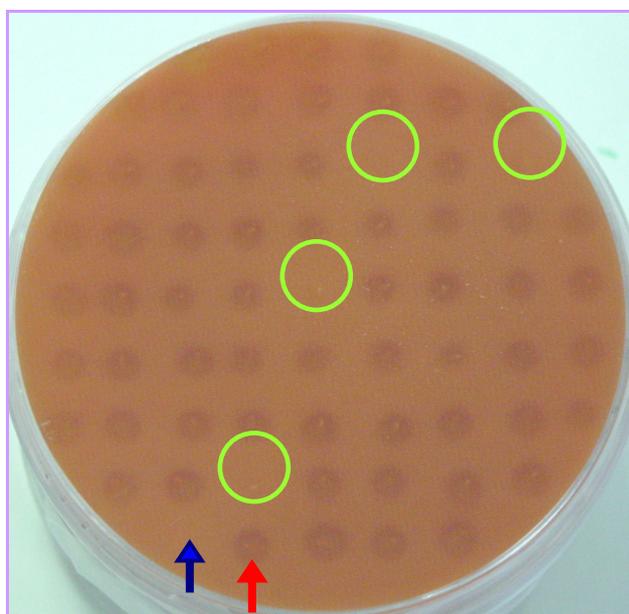


Figura 30. *Screening* de actividad frente a triEPA. Control negativo, flecha azul; Control positivo, tBT70-399, flecha roja. Rodeados por un círculo se muestran, como ejemplos, algunos de los clones seleccionados sin actividad frente a este triglicérido.

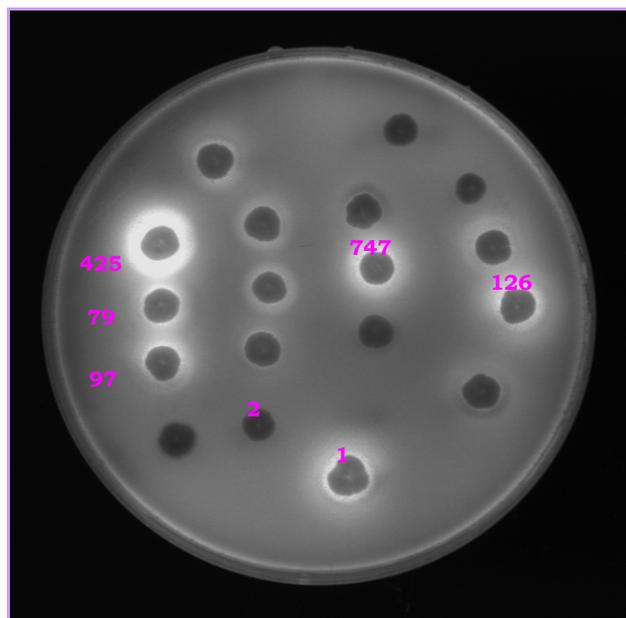


Figura 31. Actividad de los clones seleccionados frente a trioleína. **1:** Control positivo (tBT70-399), **2:** control negativo (transformante sin actividad).

4.7 Análisis de las variantes mejoradas

4.7.1 Análisis a nivel molecular

Una vez seleccionadas las variantes con actividad frente a trioleína y una actividad muy baja o nula frente a triEPA, se llevó a cabo la secuenciación del gen *lipI* que portaban. Para ello, se extrajo el ADN genómico a tres clones de cada variante y se amplificó el gen utilizando oligonucleótidos específicos (GCLip-F3 y GCLip1-R) así como una ADN-polimerasa *proof-reading*.

Los productos resultantes, un fragmento de ADN de 1.635 pb, se purificaron y se secuenciaron. La comparación entre las secuencias obtenidas y el gen *lipI* confirmó la existencia de mutaciones (1-2/ kb) que originaron cambios en la secuencia de aminoácidos (**Tabla 19**).

4. Resultados

Tabla 19. Mutaciones y sustituciones presentes en los cinco clones seleccionados.

Clon	Posición ADN (pb)	Mutación	Sustitución Aminoácido	Localización	Observaciones
79	310	G→A	Asp104Asn	<i>tapadera peptídica</i>	Se modifica la carga electrostática en esta zona ya que Asp (carga negativa) y Asn (carga positiva)
97	238 239	G→A G→A	Gly80Lys	<i>tapadera peptídica</i>	Lys posee carga positiva y una cadena lateral más larga
126	56	G→A C→A	Gly19Asp	Extremo amino	Asp tiene carga negativa y posee una cadena lateral más larga
425	239	G→A	Gly80Glu	<i>tapadera peptídica</i>	Glu posee carga negativa y una cadena lateral
747	303	G→A	Met101Ile	<i>tapadera peptídica</i>	Cambio por un aminoácido hidrofóbico (Ile) con una cadena lateral de mayor tamaño que Met

El análisis de las secuencias reveló que la mayoría de los cambios, introducidos por PCR mutagénica, fueron transiciones (relación transiciones/transversiones de 2,3), así como una relación AT→GC/GC→AT de 0,1, siendo el cambio más frecuente G→A.

La mayoría de las sustituciones aminoácidas en las variantes se localizaron en la zona correspondiente a la *tapadera peptídica*, excepto en la variante 126 donde el cambio aparece antes de la secuencia correspondiente a esta estructura (**Figura 32**). Todas las sustituciones se localizaron en los primeros 104 aminoácidos, en el extremo N-terminal de la secuencia proteica.

Por otro lado, el análisis mediante Southern-Blot confirmó que todos los clones eran monocopia, mostrando una banda del tamaño esperado (7,469 kb) (**Figura 33**). Por lo tanto, las variantes de la proteína GGLIP 1 secretadas por cada uno de estos clones procedía de la expresión de un único gen.

Para llevar a cabo la caracterización enzimática de cada una de las variantes, se procedió a la purificación de las proteínas mediante cromatografía de intercambio aniónico, de la misma forma que se realizó con el control (ver apartado 4.5.1).

Secuencia GGLIP 1	QTPTAVLNGNEVISGVLEGGKVDTFKGI	PADPPVGD	LRFKHPQ	PFTGSYQGLKANDFSSACMQLD	PGNAISLLDKV
Variante 79	QTPTAVLNGNEVISGVLEGGKVDTFKGI	PADPPVGD	LRFKHPQ	PFTGSYQGLKANDFSSACMQLD	PGNAISLLDKV
Variante 97	QTPTAVLNGNEVISGVLEGGKVDTFKGI	PADPPVGD	LRFKHPQ	PFTGSYQGLKANDFSSACMQLD	PGNAISLLDKV
Variante 126	QTPTAVLNGNEVISGVLEGGKVDTFKGI	PADPPVGD	LRFKHPQ	PFTGSYQGLKANDFSSACMQLD	PGNAISLLDKV
Variante 425	QTPTAVLNGNEVISGVLEGGKVDTFKGI	PADPPVGD	LRFKHPQ	PFTGSYQGLKANDFSSACMQLD	PGNAISLLDKV
Variante 747	QTPTAVLNGNEVISGVLEGGKVDTFKGI	PADPPVGD	LRFKHPQ	PFTGSYQGLKANDFSSACMQLD	PGNAISLLDKV
<p>VGLSKILPDNLRGPLYDMAQGSVSMNEDCLYLNVFRPAGTKPDAKLPVMVWIYGGAFVFGSSASYPNGYVKESVEMGQPVVFSINRYRTGPGY</p> <p>VGLSKILPDNLRGPLYDMAQGSVSMNEDCLYLNVFRPAGTKPDAKLPVMVWIYGGAFVFGSSASYPNGYVKESVEMGQPVVFSINRYRTGPGY</p> <p>VGLSKILPDNLRGPLYDMAQGSVSMNEDCLYLNVFRPAGTKPDAKLPVMVWIYGGAFVFGSSASYPNGYVKESVEMGQPVVFSINRYRTGPGY</p> <p>VGLSKILPDNLRGPLYDMAQGSVSMNEDCLYLNVFRPAGTKPDAKLPVMVWIYGGAFVFGSSASYPNGYVKESVEMGQPVVFSINRYRTGPGY</p> <p>VGLSKILPDNLRGPLYDMAQGSVSMNEDCLYLNVFRPAGTKPDAKLPVMVWIYGGAFVFGSSASYPNGYVKESVEMGQPVVFSINRYRTGPGY</p> <p>VGLSKILPDNLRGPLYDMAQGSVSMNEDCLYLNVFRPAGTKPDAKLPVMVWIYGGAFVFGSSASYPNGYVKESVEMGQPVVFSINRYRTGPGY</p>					
<p>FLGGDAITAEGNTNAGLHDQRKGLEWVSDNIANFGGDPDKVMIFGESSAGAMSVAHQLVAYGGDNTYNGKQLFHSAILQSGGPLPYFDSTSVGPE</p> <p>FLGGDAITAEGNTNAGLHDQRKGLEWVSDNIANFGGDPDKVMIFGESSAGAMSVAHQLVAYGGDNTYNGKQLFHSAILQSGGPLPYFDSTSVGPE</p> <p>FLGGDAITAEGNTNAGLHDQRKGLEWVSDNIANFGGDPDKVMIFGESSAGAMSVAHQLVAYGGDNTYNGKQLFHSAILQSGGPLPYFDSTSVGPE</p> <p>FLGGDAITAEGNTNAGLHDQRKGLEWVSDNIANFGGDPDKVMIFGESSAGAMSVAHQLVAYGGDNTYNGKQLFHSAILQSGGPLPYFDSTSVGPE</p> <p>FLGGDAITAEGNTNAGLHDQRKGLEWVSDNIANFGGDPDKVMIFGESSAGAMSVAHQLVAYGGDNTYNGKQLFHSAILQSGGPLPYFDSTSVGPE</p> <p>FLGGDAITAEGNTNAGLHDQRKGLEWVSDNIANFGGDPDKVMIFGESSAGAMSVAHQLVAYGGDNTYNGKQLFHSAILQSGGPLPYFDSTSVGPE</p>					
<p>SAYSRFAQYAGCDASAGDNETLACLRSKSSDVLHSAQNSYDLKDLFGLLPQFLGFGPRPDGNIIPDAAYELYSRGRYAKVPYITGNQEDGTTIL</p> <p>SAYSRFAQYAGCDASAGDNETLACLRSKSSDVLHSAQNSYDLKDLFGLLPQFLGFGPRPDGNIIPDAAYELYSRGRYAKVPYITGNQEDGTTIL</p> <p>SAYSRFAQYAGCDASAGDNETLACLRSKSSDVLHSAQNSYDLKDLFGLLPQFLGFGPRPDGNIIPDAAYELYSRGRYAKVPYITGNQEDGTTIL</p> <p>SAYSRFAQYAGCDASAGDNETLACLRSKSSDVLHSAQNSYDLKDLFGLLPQFLGFGPRPDGNIIPDAAYELYSRGRYAKVPYITGNQEDGTTIL</p> <p>SAYSRFAQYAGCDASAGDNETLACLRSKSSDVLHSAQNSYDLKDLFGLLPQFLGFGPRPDGNIIPDAAYELYSRGRYAKVPYITGNQEDGTTIL</p> <p>SAYSRFAQYAGCDASAGDNETLACLRSKSSDVLHSAQNSYDLKDLFGLLPQFLGFGPRPDGNIIPDAAYELYSRGRYAKVPYITGNQEDGTTIL</p>					
<p>APVAINATTTPHVKKWLKYLICSEASDASLDRVLSLYPGSWSEGAPFRTGILNALTPQFKRIAAIFDILLFQSPRRVMLNATKDVNRWYLATQL</p> <p>APVAINATTTPHVKKWLKYLICSEASDASLDRVLSLYPGSWSEGAPFRTGILNALTPQFKRIAAIFDILLFQSPRRVMLNATKDVNRWYLATQL</p> <p>APVAINATTTPHVKKWLKYLICSEASDASLDRVLSLYPGSWSEGAPFRTGILNALTPQFKRIAAIFDILLFQSPRRVMLNATKDVNRWYLATQL</p> <p>APVAINATTTPHVKKWLKYLICSEASDASLDRVLSLYPGSWSEGAPFRTGILNALTPQFKRIAAIFDILLFQSPRRVMLNATKDVNRWYLATQL</p> <p>APVAINATTTPHVKKWLKYLICSEASDASLDRVLSLYPGSWSEGAPFRTGILNALTPQFKRIAAIFDILLFQSPRRVMLNATKDVNRWYLATQL</p> <p>APVAINATTTPHVKKWLKYLICSEASDASLDRVLSLYPGSWSEGAPFRTGILNALTPQFKRIAAIFDILLFQSPRRVMLNATKDVNRWYLATQL</p>					
<p>HNLVFFLGTFEGSDLLFYQYVDLGPSSAYRRYFISFANHHPNVGTNLKQWDMYTDAGKEMLQIHMIGNSMRTDDFRIEGISNFESDVTFLG</p> <p>HNLVFFLGTFEGSDLLFYQYVDLGPSSAYRRYFISFANHHPNVGTNLKQWDMYTDAGKEMLQIHMIGNSMRTDDFRIEGISNFESDVTFLG</p> <p>HNLVFFLGTFEGSDLLFYQYVDLGPSSAYRRYFISFANHHPNVGTNLKQWDMYTDAGKEMLQIHMIGNSMRTDDFRIEGISNFESDVTFLG</p> <p>HNLVFFLGTFEGSDLLFYQYVDLGPSSAYRRYFISFANHHPNVGTNLKQWDMYTDAGKEMLQIHMIGNSMRTDDFRIEGISNFESDVTFLG</p> <p>HNLVFFLGTFEGSDLLFYQYVDLGPSSAYRRYFISFANHHPNVGTNLKQWDMYTDAGKEMLQIHMIGNSMRTDDFRIEGISNFESDVTFLG</p> <p>HNLVFFLGTFEGSDLLFYQYVDLGPSSAYRRYFISFANHHPNVGTNLKQWDMYTDAGKEMLQIHMIGNSMRTDDFRIEGISNFESDVTFLG</p>					

Figura 32. Comparación de las secuencias de la proteína GGLIP 1 y las variantes seleccionadas. Los cambios aparecen reflejados en letras verdes incluidos en cajas de color naranja. Centro activo (rojo); *tapadera peptídica* (morado); Cisteínas de los puentes disulfuro (amarillo); Sitios de N-glicosilación (azul)

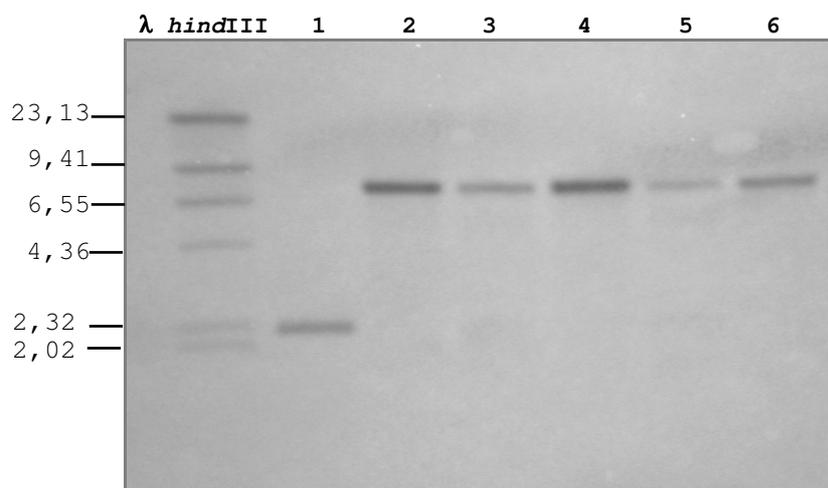


Figura 33. Hibridación de los transformantes seleccionados. Como sonda se utilizó un fragmento del promotor *AOX1* marcado con UTP-digoxigenina (932 pb). **1:** control sin transformar, **2-7:** clones 79, 97, 126, 425y 747.

4.7.2 Especificidad de sustrato

Aunque existen diferentes métodos de análisis por HPLC-MS que permiten identificar y cuantificar de una forma rápida, sensible y precisa los productos de las reacciones de hidrólisis (**Marcato B** y **Cecchin G**, 1996; **Morera Pons S** y col, 1998; **Han JJ** y col, 1999; **Murphy RC** y col., 2001; **López-López A** y col., 2001), ninguno de ellos nos permitió llevar a cabo una resolución adecuada tanto del triEPA como del EPA. El análisis de este tipo de grasas supone una dificultad añadida debido a la longitud de las cadenas hidrocarbonadas y al elevado número de insaturaciones que, además, complican la obtención de mezclas acuosas homogéneas en las reacciones de hidrólisis con la lipasa.

El análisis de triglicéridos puso de manifiesto que, tras 30 minutos, en la reacción control se hidrolizaba el 70% de trioleína y el 46% de triEPA (**Figura 34**). Las medidas a los 60 minutos de reacción no supusieron una mejora significativa en la hidrólisis de ambos sustratos, por lo que se prescindió de este tiempo para los sucesivos experimentos. Hay que tener en cuenta que dadas las características del ensayo éste presenta una gran variabilidad tanto para trioleína como para triEPA (desviación estándar $\pm 27\%$), por lo que los ensayos se realizaron, al menos, por duplicado.

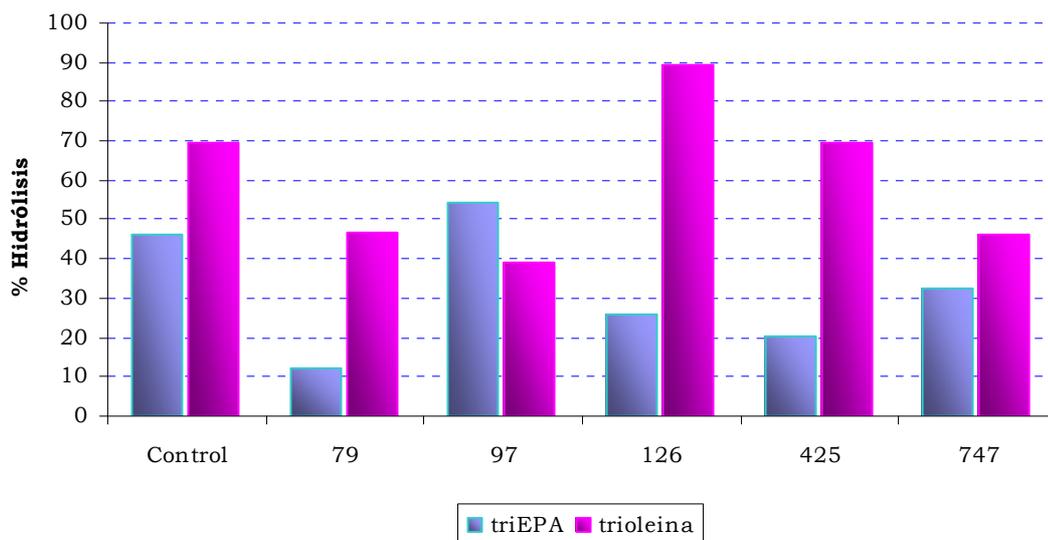


Figura 34. Porcentaje de hidrólisis de triglicéridos, triEPA y trioleína, a los 30 min de reacción. Los valores obtenidos se calcularon a partir de reacciones realizadas, al menos, por duplicado, con un mínimo de dos medidas por muestra.

Al utilizar trioleína como sustrato, únicamente la variante 425 mostró una actividad similar al control, mientras que las variantes 79, 97 y 747 mostraron una actividad un 33-43% menor. El clon 126 fue el único que mostró una actividad mayor que el control aunque esta variante presentó una desviación muy superior a la establecida para el control. En el caso del triEPA, todas las variantes, excepto la número 97, hidrolizaron este sustrato en menor medida que el control, siendo la actividad un 12-32% más baja (**Figura 34**).

Sin embargo, el análisis de los ácidos grasos libres, oleico y EPA, reveló una variabilidad de los resultados menor a la obtenida con los triglicéridos. La desviación estándar en las muestras del control fue de $\pm 19\%$ para el ácido oleico y de $\pm 14,2\%$ para el EPA (**Figura 35**). Teniendo esto presente, la medida de oleico en las muestras de hidrólisis mostró que las variantes 79, 97 y 126 hidrolizaban entre un 7-20% más que el control, mientras que las variantes 425 y 747 mostraban un comportamiento similar, resultando un 18% menor con respecto al control. En todos los casos, los valores se encontraron dentro del margen de desviación calculado para el control.

El análisis de EPA dió unos resultados muy parecidos a los obtenidos con el oleico. Así, las variantes 79, 97 y 126 mostraban una actividad muy similar al

control. Aunque en el caso de las variantes 79 y 126 los resultados obtenidos no coincidieron con los obtenidos a nivel de triglicéridos. Estas diferencias podrían deberse a la elevada variabilidad entre diferentes muestras obtenida en el análisis de triglicéridos, ya que éstos, principalmente el triEPA, son menos solubles que los ácidos grasos y podrían quedar “atrapados” a nivel de las micelas y, por lo tanto, dificultar, en algunos casos, su extracción con disolventes.

Por otra parte, las variantes 425 y 747 tuvieron un comportamiento significativamente diferente. Estas dos variantes hidrolizaron muy mal los ésteres formados por este ácido graso poliinsaturado liberando cantidades de EPA entre un 49,7% y un 56,6% más bajas que el control, respectivamente (**Figura 35**).

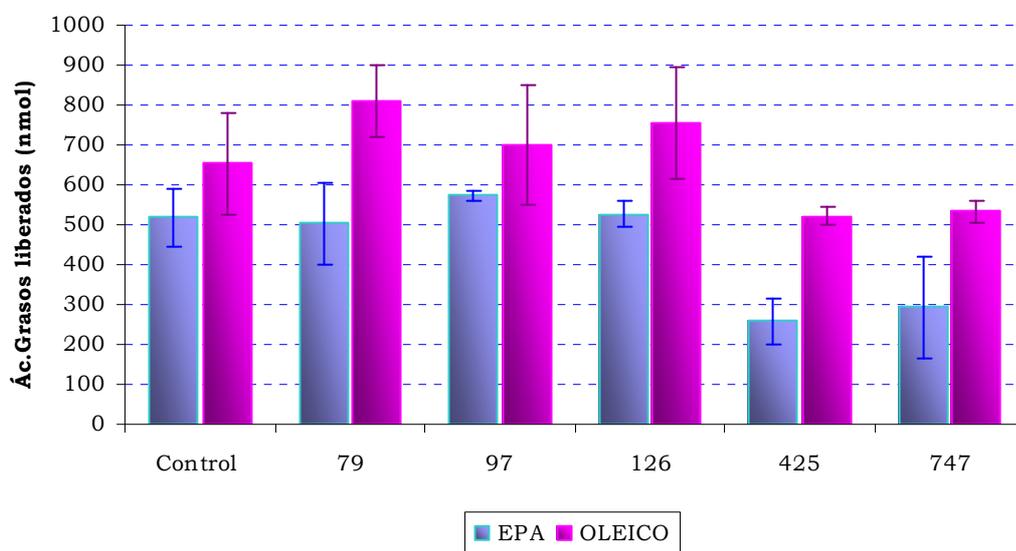


Figura 35. Cantidad (nmol) de ácidos grasos, EPA y oleico, liberados a los 30 min de reacción. Los valores obtenidos se calcularon a partir de muestras realizadas, al menos, por duplicado, con un mínimo de dos medidas por muestra.

La relación entre el porcentaje de actividad sobre EPA y el porcentaje de actividad sobre oleico de cada variante con respecto al control, se denominó *coeficiente de actividad*. El cálculo de este coeficiente determinó que las mejores variantes eran aquellas que provenían de los clones 425 y 747, mostrando unos valores de 0,45 y 0,46, respectivamente, siendo este coeficiente igual a 1 en el caso del control (**Figura 36**). A la variante del clon 126 le correspondió un coeficiente de

0,88, muy superior con respecto a las dos anteriores.

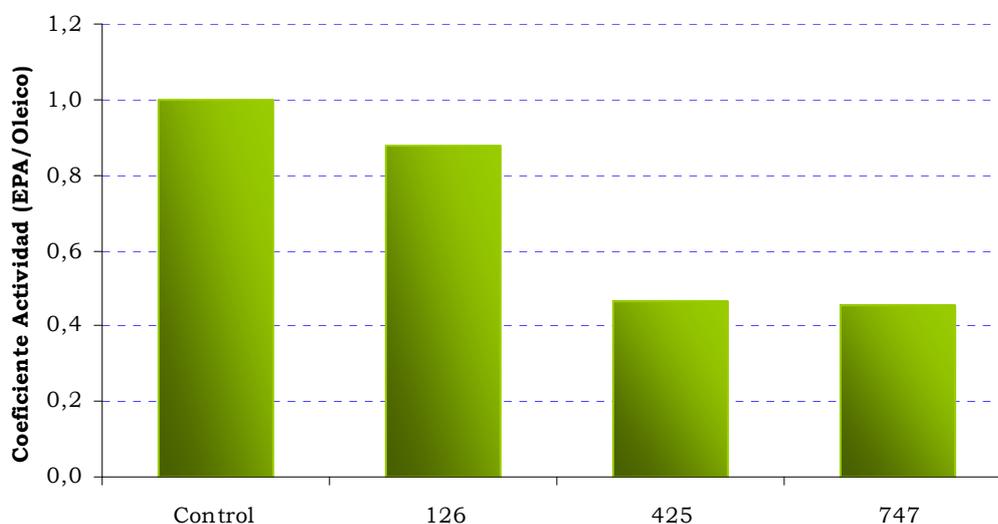


Figura 36. Coeficiente de actividad. El cálculo se realizó en base a la medida de ácidos grasos libres, EPA y oleico, con respecto al control.

Con el fin de determinar el comportamiento frente a un sustrato más complejo, las variantes de los clones 425 y 747 se utilizaron para realizar varios ensayos de hidrólisis utilizando como sustrato Eupoly-EPA® (Puleva Biotech, S.A). Este producto es un aceite enriquecido que contiene un 30% PUFAs, 20% de EPA y 10% de DHA, así como un 10,33% de ácido oleico.

El análisis de las muestras después de 30 minutos de hidrólisis reveló que ambas variantes enzimáticas liberaban entre un 14,5-24% menos ácido oleico que la enzima original (**Figuras 37 y 39**). Los resultados obtenidos al analizar la cantidad de EPA presente al final de la reacción confirmaron las expectativas surgidas a partir de los resultados obtenidos con los sustratos puros. Como se muestra en las **Figuras 38 y 39**, la cantidad de EPA hidrolizado por las variantes 425 y 747 fue de un 55,6% y un 43,7% más baja que el control, respectivamente.

4. Resultados

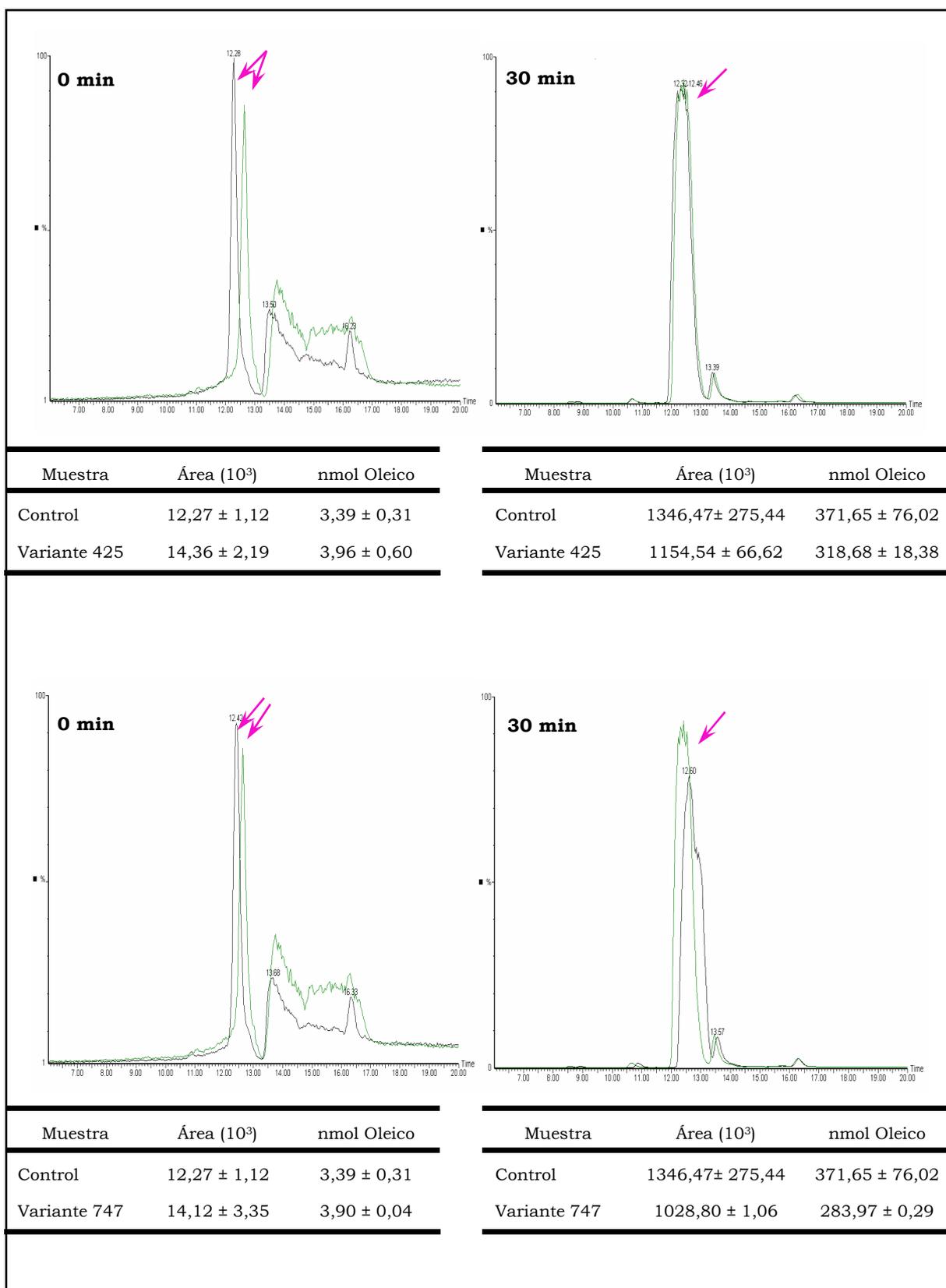


Figura 37. Análisis del ácido oleico por HPLC-MS. Los picos en color verde son los correspondientes al control y en negro corresponden a las variantes 425 y 747. Las flechas indican los picos correspondientes al ácido oleico. **A:** Variante 425, **B:** Variante 747.

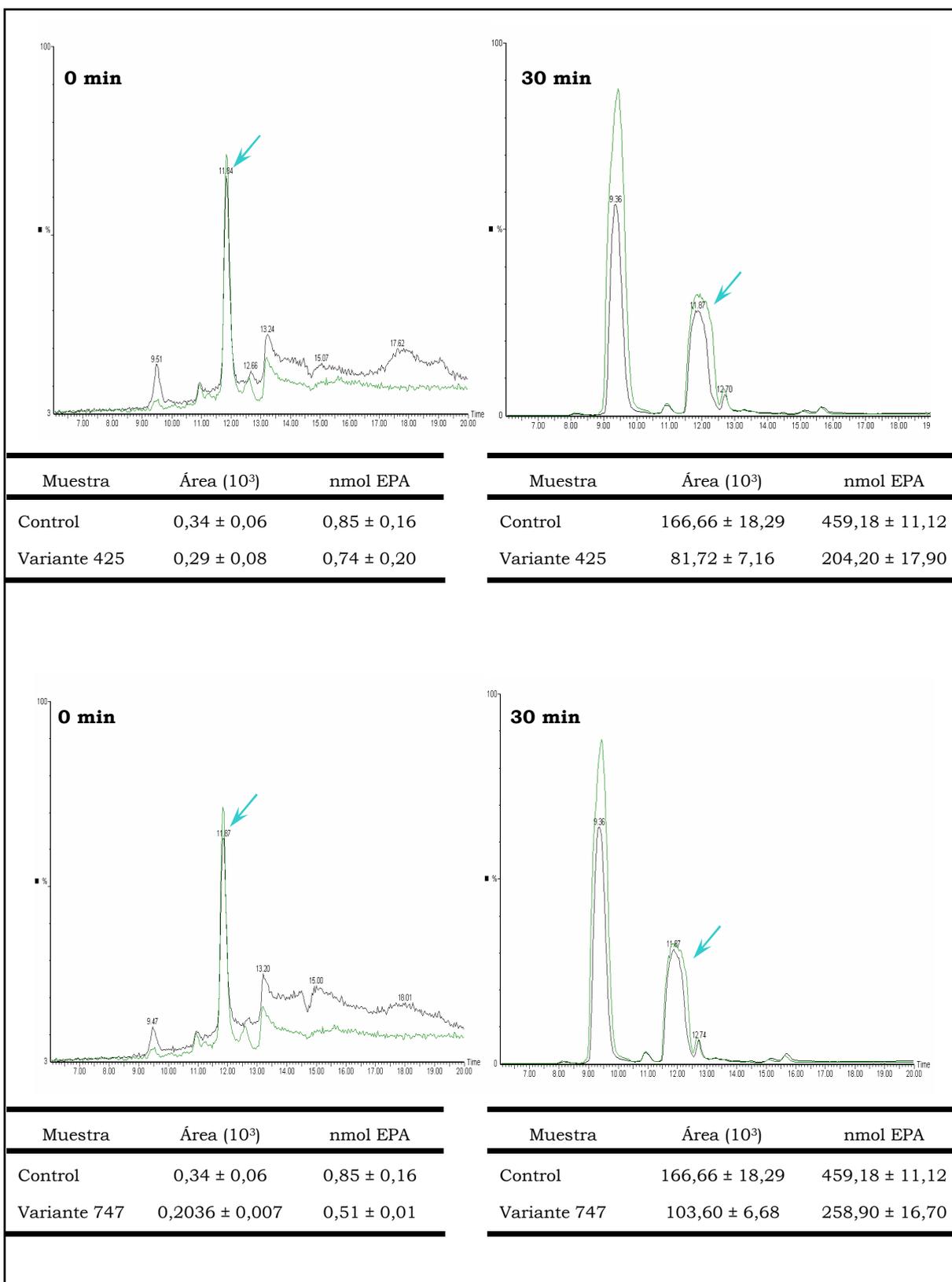


Figura 38. Análisis del ácido EPA por HPLC-MS. Los picos en color rojo corresponden al control y en negro a las variantes 425 y 747. Las flechas indican los picos correspondientes al EPA. **A:** Variante 425. **B:** Variante 747.

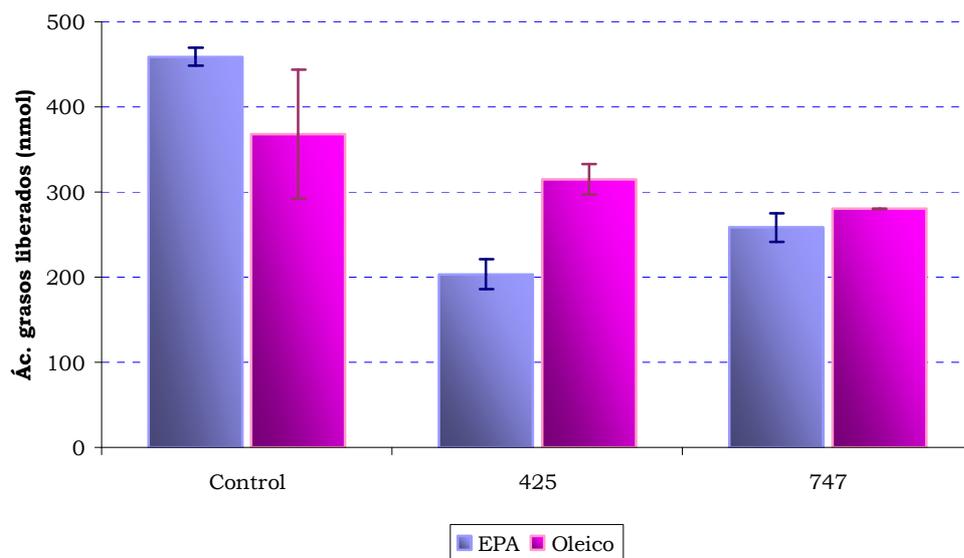


Figura 39. Cantidad de ácidos grasos, EPA y oleico, liberados tras la hidrólisis (30 min) de Eupoly-EPA®. Los valores obtenidos se calcularon a partir de muestras analizadas por HPLC-MS realizadas por duplicado, con un mínimo de dos medidas por muestra.

El cálculo del coeficiente de actividad (**Figura 40**) mostró un valor de 0,52 en el caso de la proteína del clon 425 y de 0,74 en el caso de la variante 747. Estos resultados confirmaron, sobre todo en el caso de la variante 425, la reducción de la actividad hidrolítica frente a triglicéridos conteniendo EPA, favoreciendo, por tanto, un mayor enriquecimiento de PUFAs esterificados en el sustrato hidrolizado.

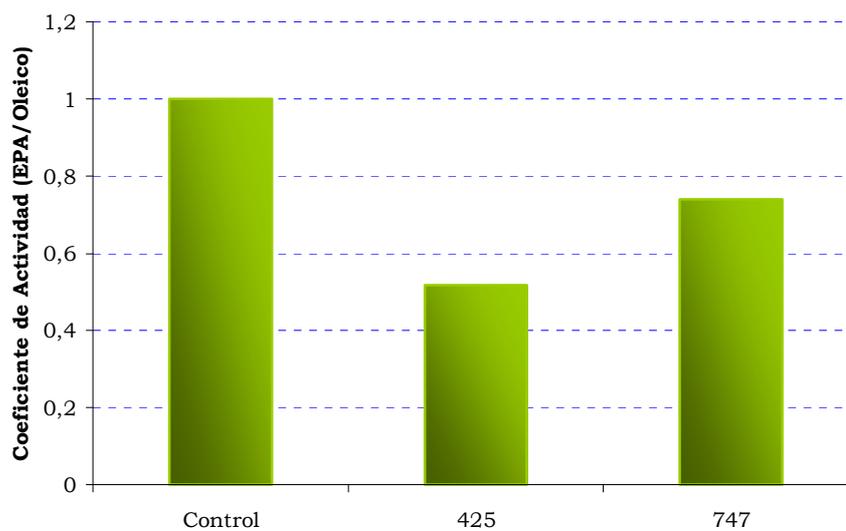


Figura 40: Coeficiente de actividad. La figura muestra los resultados, en porcentaje, de la medida de ácidos grasos liberados, tras la hidrólisis de Eupoly-EPA® (30 min), con respecto al control.

5. Discusión

5. Discusión

5.1 Aislamiento de *G. geotrichum* BT107. Clonación del gen *lipI*

Durante el proceso de extracción del aceite se genera un residuo, denominado alpeorajo, constituido por la pulpa y el hueso de la aceituna. Debido a que este subproducto tiene una elevada concentración de materia grasa residual, aquellos microorganismos capaces de crecer sobre él deben tener una notable actividad lipasa que les permita utilizar esta materia grasa como principal fuente de carbono.

Por ello, se decidió llevar a cabo un estudio de la microflora fúngica presente en este residuo y aislar de forma selectiva aquellas especies con alta producción de lipasas. Para ello, se realizó una selección específica utilizando placas que contenían aceite de oliva como única fuente de carbono y rodamina B. La rodamina B forma compuestos fluorescentes con los ácidos grasos libres originando halos fluorescentes, visibles a 350 nm, alrededor de las colonias productoras de lipasas (**Kouker G y Jaeger KE**, 1987; **Jaeger KE** y col., 1994). Debido a esta propiedad este compuesto ha sido ampliamente utilizado en el desarrollo de métodos de *screening* para determinar actividad lipolítica (**Kouker G y Jaeger KE**, 1987; **Jette JF y Ziomek E**, 1994; **Thomson CA** y col., 1999; **Henne A** y col., 2000; **Gupta R** y col., 2003).

Esta selección nos permitió aislar una cepa capaz de producir grandes halos fluorescentes, que se identificó posteriormente como *Galactomyces geotrichum* al que se asignó el código interno BT107. *G. geotrichum* es un hongo filamentoso que se encuentra en múltiples hábitats. Está presente como componente de la flora natural de la leche y se usa como un agente madurador de quesos suaves y fuertes. Sus lipasas y proteasas producen ácidos grasos y péptidos que pueden ser metabolizados por otras poblaciones microbianas promoviendo el desarrollo de diferentes aromas, entre otras propiedades. *G. geotrichum* produce dos lipasas extracelulares denominadas Lipasa I y Lipasa II, codificadas por los genes *lipI* y *lipII*, respectivamente. La lipasa I es muy específica frente a ácidos grasos insaturados de larga cadena como el oleico (C18:1), linoleico (C18:2) y el linolénico (C18:3), mientras que la lipasa II muestra una especificidad de sustrato más amplia.

La utilización de aceite de oliva o de un aceite rico en ácidos grasos poliinsaturados como única fuente de carbono en el medio de fermentación dio lugar a diferentes resultados. Así, mientras que en el caso del oleico se detectó una actividad lipasa creciente en el tiempo, en presencia de PUFAs ésta era prácticamente inexistente. Este hecho puede deberse a la existencia, en los promotores de los genes *lipI* y *lipII*, de una región inducible por la presencia de ácidos grasos de cadena larga y, especialmente, por el oleico (**Nagao T** y col., 1996).

Aunque la mayoría de los genes correspondientes a lipasas fúngicas poseen intrones, el análisis de las siete secuencias del gen *lipI*, procedentes de diferentes cepas de *G. geotrichum* depositadas en las bases de datos determinaron que el marco de lectura abierto (ORF) correspondiente al gen *lipI* no mostraba ninguno. Este hecho permitió realizar su amplificación a partir de ADN genómico utilizando oligonucleótidos específicos diseñados a partir de dos de las secuencias existentes.

El gen clonado presentó una elevada homología con las secuencias depositadas, oscilando entre un 80% con la secuencia correspondiente a la cepa *G. geotrichum* CBS 772.71 (**Phillips A** y col., 1995) y un 98,7% con la secuencia de la cepa *G. geotrichum* ATCC 34614 (**Bertolini MC** y col., 1994).

5.2 Expresión heteróloga del gen *lipI* de *G. geotrichum* BT107

Con el objetivo de caracterizar la proteína GGLIP 1 de *G. geotrichum* BT107, se realizó la clonación y expresión del gen *lipI* en el sistema de expresión en *P. pastoris*.

Este sistema se ha convertido en uno de los más utilizados para llevar a cabo la expresión de genes heterólogos (**Gleeson MA** y col., 1988; **Romanos MA** y col., 1992; **Higgins DR** y col., 1995; **Higgins DR** y **Cregg JM**, 1998; **Cereghino JL** y **Cregg JM**, 2000) debido a las siguientes características:

1. utilización de un promotor fuerte y altamente regulado, inducible por metanol,
2. facilidad para lograr elevadas densidades celulares,
3. fácil escalado a grandes biorreactores,

4. eficiente secreción extracelular de la proteína heteróloga,
5. realización de modificaciones post-traduccionales y baja glicosilación.

Este sistema se basa en la integración de los plásmidos de expresión en el genoma de la levadura lo que, *a priori*, les confiere una mayor estabilidad. Para ello, se generó un corte en la zona del vector homóloga al promotor del gen *AOX1* ya que esto permite dirigir la integración del plásmido hacia este locus e incrementa la frecuencia de transformación (**Orr-Weaver TL** y col., 1981).

Tras la transformación y selección se obtuvo la cepa tBT70-163 que era capaz de producir, tras 72 horas de inducción, unos 200 mg/L de proteína heteróloga. Este nivel de producción es, aproximadamente, el triple que el logrado previamente por otros autores (**Holmquist M** y col., 1997). La diferencia en la cantidad de proteína secretada podría ser debida tanto a la utilización de una cepa hospedadora de *P. pastoris* diferente, ya que en los casos anteriores se emplearon cepas auxotróficas, como a las condiciones de transformación y selección establecidas en este trabajo. El análisis genético de esta cepa reveló que contenía, al menos, cuatro copias integradas del gen *lipI* en su genoma (**Figura 22**).

5.3 Caracterización de la proteína recombinante

La proteína GGLIP 1 de *G. geotrichum* BT107 pertenece a la familia de las lipasas de *Candida rugosa* que se caracteriza, entre otras cosas, por poseer un plegamiento α/β hidrolasa característico, un peso molecular de ~60 kDa y un sitio de unión al ácido graso en forma de túnel. El análisis mediante SDS-PAGE de muestras del caldo de cultivo mostraron la presencia mayoritaria de una proteína con un tamaño aproximado de 63 kDa correspondiente a la lipasa recombinante (**Figura 21**).

La purificación de la proteína mediante cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de exclusión molecular reveló un tamaño de, aproximadamente, 59,6 kDa, ligeramente inferior al determinado por SDS-PAGE y al descrito por otros autores (**Holmquist M** y col., 1997). Durante el procesamiento post-traduccionales, *P. pastoris* incorpora una media de 8 a 14 unidades de manosa por cada sitio de glicosilación presente en la proteína (**Romanos MA** y col., 1992; **Cereghino JL** y

Cregg JM, 2000). El tratamiento de GGLIP 1 con Endoglicosidasa H reveló que podrían haberse introducido, aproximadamente, unas 20 unidades de este hidrato de carbono entre los dos sitios de N-glicosilación presentes en el polipéptido.

La comparación de la secuencia de la lipasa GGLIP 1 recombinante con otras secuencias de la lipasa I depositadas en las bases de datos mostró una elevada homología (**Figura 14**). Así, se comprobó la presencia de una secuencia altamente conservada GX SXG (siendo X cualquier aminoácido) que forma una estructura β -giro- α característica llamada “codo nucleofílico” (**Brenner S**, 1988; **Schrag JD** y col., 1991; **Jaeger KE** y **Reetz MT**, 1998; **Schmid RD** y **Verger R**, 1998). La triada catalítica se localizó en las mismas posiciones (Ser217, His143 y Glu354) en todas las secuencias analizadas y aparecen conservadas en lipasas de otros hongos como *Rhizomucor miehei* o *Fusarium solani* o, incluso, en la lipasa pancreática humana (**Schrag JD** y **Cygler M**, 1993).

El polipéptido presenta los dos sitios de N-glicosilación mencionados anteriormente, localizados en las posiciones 283 y 364, así como dos puentes disulfuro situados, uno en la *tapadera peptídica* (Cys61-Cys105) y otro en las posiciones Cys276-Cys288. Todas las secuencias analizadas mostraron una secuencia idéntica en la posición de estos residuos.

La región de la proteína correspondiente a la *tapadera peptídica* comprende desde los aminoácidos Met62 hasta Asp104. En esta estructura se observaron diferencias entre la lipasa GGLIP 1 y varias de las secuencias analizadas. Así, no se observó ningún cambio con la secuencia de la cepa *G. geotrichum* NRCC 205002 (**Bertolini MC** y col., 1994), y una única variación (Leu83Ile) con la secuencia de *G. geotrichum* ATCC 34614 (**Shimada Y** y col., 1989; **Nagao T** y col., 1993). La mayor divergencia se observó con la proteína 1 THG de *G. geotrichum* ATCC 34614 (**Schrag JD** y col., 1991), con la cual presentaba un 84% de homología, encontrándose hasta 13 cambios (Ala69Ser, Ile70Leu, Ser71Thr, Val76Ala, Val77Leu, Gly80Ala, Ile82Val, Leu83Ile, Asp85Glu, Arg86Glu, Leu87Phe, Gln96Lys, Ser98Thr), siendo la mayoría de ellos aminoácidos estructuralmente semejantes (hidrofóbicos o polares).

5.3.1 Especificidad de sustrato

La reducción o eliminación de la actividad catalítica de la lipasa GGLIP 1 frente a triglicéridos conteniendo PUFAs ω 3, mediante una estrategia de evolución molecular, exigía la puesta a punto de un método de selección y de un método analítico que nos permitiesen identificar las variantes obtenidas de forma rápida y fiable.

Las principales fuentes naturales y/o comerciales que contienen este tipo de triglicéridos son los aceites de pescado y los concentrados obtenidos a partir de éstos. En el primer caso, el contenido en PUFAs (mayoritariamente en forma de triglicéridos) se sitúa alrededor del 30% (18% EPA y 12% DHA), mientras que en el caso de los concentrados estos niveles pueden alcanzar hasta el 50-58% de uno de ellos o un 60% de ambos. Sin embargo, estos sustratos son muy heterogéneos y, por lo tanto, complejos para ser utilizados en un proceso de evolución molecular.

Por este motivo, se decidió poner a punto un método de selección utilizando dos triglicéridos puros. Debido a la elevada afinidad de la enzima por los ésteres de ácido oleico (**Baillargeon MW** y col., 1989; **Bertolini MC** y col., 1995; **Catoni E** y col., 1997; **Holmquist M** y col., 1997), decidimos realizar una primera selección sobre trioleína para identificar los clones que mostraban mayor actividad. A continuación, estos clones se sometían a una segunda selección, utilizando triEPA como sustrato, para identificar aquellos que no mostraban actividad frente a este triglicérido. La elección de este PUFA se realizó debido al mayor interés comercial en la utilización de EPA como ingrediente de alimentos funcionales, especialmente aquellos para alimentación en adultos (**Baró L** y col., 2003; **Carrero JJ** y col., 2004).

Debido a que este tipo de triglicéridos de PUFAs no existen en el mercado, fue necesario poner a punto la síntesis química de triEPA. El proceso se realizó en dos etapas. En primer lugar, se obtuvo el ácido graso libre a partir del metil éster mediante hidrólisis alcalina. A continuación, se llevó a cabo la síntesis del triglicérido, haciendo reaccionar EPA con glicerol (relación molar 3:1) y utilizando EDCI y DMAP como catalizadores. El rendimiento global del proceso fue del 77,5%, lográndose un producto con una pureza superior al 99%.

La cuantificación de la actividad lipasa se ha llevado a cabo tradicionalmente

mediante valoración titrimétrica (**Benzonana B y Desnuelle P**, 1968; **De Pury GG y Collins FD**, 1972; **Jensen RG**, 1983; **Gilham D y Lehner R**, 2005). El análisis mediante este procedimiento de la actividad de la proteína GGLIP 1 frente a trioleína, tripalmitina, tributirina y triEPA mostró una actividad 27 veces más elevada frente a trioleína (C18:1) que frente a tripalmitina (C16:0) y 32 veces más que frente a tributirina (C4:0) (**Figura 23**). Por lo tanto, la enzima presentó una especificidad mucho más alta para ácidos grasos monoinsaturados de cadena larga que frente a ácidos grasos saturados de cadena corta o larga. Estos resultados coinciden con los previamente publicados para otras cepas de *G. geotrichum* (**Bertolini MC y col.**, 1995; **Catoni E. y col.**, 1997; **Holmquist M y col.**, 1997) donde mostraban que la lipasa I tenía una baja actividad frente a tripalmitina y a ácidos grasos saturados de cadena corta.

La determinación de la actividad sobre triEPA mediante este procedimiento no fue posible debido al elevado coste que suponían las cantidades necesarias de este sustrato para realizar el ensayo.

La cromatografía de gases es otra de las técnicas utilizadas para evaluar la actividad de las lipasas (**Alford JA y Pierce DA**, 1963; **Alford JA y col.**, 1964; **Watts R y Dils R**, 1968; **Bereuter TL y Lorbeer E**, 1995; **Gilham D y Lehner R**, 2005). Sin embargo, todos los ensayos realizados, incluso utilizando columnas específicas para grasas poliinsaturadas, sólo nos permitieron la elución de los ácidos grasos. Ninguna de las condiciones utilizadas lograron obtener la resolución de los productos de reacción intermedios (mono y diglicéridos) o, incluso, de los triglicéridos.

La metodología HPLC-MS también ha sido ampliamente utilizada en el análisis de triglicéridos, ácidos grasos y productos intermedios (monoglicéridos y diglicéridos). La resolución de estos componentes se logra mediante la utilización de columnas cromatográficas de fase reversa, que permiten conseguir una buena resolución de los ácidos grasos en función de su longitud y grado de insaturación (**Marcato B y Cecchin G**, 1996; **Morera Pons S y col.**, 1998 **López-López A y col.**, 2001). Alternativamente se pueden utilizar columnas con iones de plata, que aprovechan la propiedad que tienen estos iones para formar complejos polares reversibles con los dobles enlaces, permitiendo la separación en función del número, geometría y posición de las insaturaciones (**Chistie WW**, 1988; **Dobson G y col.**, 1995; **Han JJ y col.**, 1999). Sin embargo, ninguno de los métodos descritos

nos permitió llevar a cabo una resolución adecuada tanto del triEPA como del EPA. El análisis de este tipo de grasas conlleva una dificultad añadida debido a la longitud de las cadenas hidrocarbonadas y al elevado número de insaturaciones.

Esta situación planteó la necesidad de poner a punto un método de análisis mediante HPLC-MS. Tras numerosos ensayos, se definieron unas condiciones que nos permitieron resolver tanto EPA como triEPA. El método incluyó la utilización de dos columnas cromatográficas en fase reversa. La primera, con un tamaño de partícula de 5 μ m, se utilizó para el análisis de triglicéridos y la segunda, con un tamaño de partícula de 3 μ m, para el análisis de los ácidos grasos. Además, se utilizaron dos sistemas de detección: APCI en modo positivo para triglicéridos y ESI para ácidos grasos. APCI produce una fragmentación suave, llegando generalmente a obtener moléculas protonadas y fragmentos identificativos del compuesto que ha dado buenos resultados en el análisis de lípidos no polares, como en el caso de triglicéridos (**Byrwell WC** y **Emken EA**, 1995). ESI, por otro lado, es más sensible que APCI y suele producir iones moleculares y/o iones aductos, como los iones carboxilato de ácidos grasos saturados, insaturados y poliinsaturados que ha hecho que esta técnica se haya utilizado en la caracterización de este tipo de compuestos (**Kerwin JL** y col., 1996; **Murphy RC** y col., 2001).

5.4 Evolución dirigida

Los ácidos grasos poliinsaturados ω 3 (PUFAs ω 3) desempeñan funciones fisiológicas muy importantes, destacando principalmente sus acciones a nivel cerebral y cardiovascular.

A nivel cerebral, cantidades adecuadas de estos ácidos grasos son necesarias para el crecimiento y desarrollo funcional del cerebro, así como para la agudeza visual en niños (**Horrocks LA** y **Yeo YK**, 1999), pueden reducir el desarrollo de depresión unipolar (**Horrocks LA** y **Yeo YK**, 1999; **Green P** y col., 2005) y pueden ser empleados en el tratamiento y prevención de la demencia senil en adultos (**Horrocks LA** y **Yeo YK**, 1999). Además, el déficit de PUFAs ω 3 está asociado con la pérdida de memoria y con la disminución de las funciones cognitivas (**Jump DB**, 2002).

A nivel cardiovascular, estos ácidos grasos juegan un papel esencial, con

numerosos efectos beneficiosos que contribuyen a reducir el riesgo de sufrir enfermedades coronarias (**Horrocks LA** y **Yeo YK**, 1999; **Schmidt EB** y col., 2001; **Nordoy A**, 2001; **Wijendran V** y **Hayes KC**, 2004). El reconocimiento de estos efectos saludables que previenen y mejoran la salud cardiovascular se ha visto muy reforzado por la publicación de una nota por la FDA americana en septiembre del año 2004 en la que se recomienda la inclusión de estos ácidos grasos en la dieta.

Debido a estas propiedades beneficiosas, la obtención de preparados enriquecidos en PUFAs $\omega 3$ tiene un elevado interés comercial. Aunque, los etil ésteres de este tipo de ácidos grasos son muy comercializados en Japón como suplemento nutricional (**Rosu R** y col., 1998), hay estudios que indican que los PUFAs se absorben mejor en forma de triglicérido que como etil o metil ésteres (**Lawson LD** y **Hughes BG**, 1988). Por lo tanto, desde un punto de vista nutricional, los triglicéridos de PUFAs serían la forma más deseable como ingrediente alimentario.

La obtención de aceites ricos en PUFAs $\omega 3$ en forma de triglicéridos mediante hidrólisis selectiva a partir de sustratos complejos como aceites de pescado es de gran interés ya que constituye un primer paso en el desarrollo de un proceso industrial para la obtención de este tipo de aceites.

En los últimos años, los investigadores han utilizado lipasas de origen microbiano para producir concentrados de PUFAs $\omega 3$ a partir de la hidrólisis de aceites de pescado. Así, en función del tipo de microorganismo del que proceden, hay lipasas que muestran diferente afinidad por los ésteres de EPA o DHA. Esta preferencia por un determinado tipo de sustrato se utiliza para incrementar la presencia de uno de estos PUFAs $\omega 3$ en la fracción de glicéridos (**Tanaka Y** y col., 1992; **Halldorsson A** y col., 2004).

La hidrólisis de aceite de atún utilizando la lipasa I de *G. geotrichum* llevada a cabo por Shimada y colaboradores, reveló que la enzima hidrolizaba los ácidos grasos por los que tiene mayor especificidad, principalmente oleico y palmítico, liberándolos del aceite de atún y permitiendo obtener glicéridos, principalmente triglicéridos, enriquecidos en DHA y en EPA (**Shimada Y** y col., 1994; **Shimada Y** y col., 1995).

Como se puede observar en las referencias mencionadas anteriormente, el enriquecimiento de la fracción de PUFAs a partir de aceites de pescado se puede

realizar utilizando enzimas moderadamente selectivas que permiten incrementar la fracción de PUFAs hasta, aproximadamente, un 50% (**Halldorsson A** y col., 2004). Sin embargo, no se ha descrito hasta ahora ninguna enzima con especificidad absoluta, es decir, con muy baja o nula actividad catalítica sobre triglicéridos ricos en PUFAs, principalmente EPA, pero manteniendo su actividad hidrolítica sobre el resto de ácidos grasos (oleico, palmítico, entre otros). Una enzima con estas características permitiría enriquecer, de forma más eficaz, la fracción de este tipo de triglicéridos a partir de mezclas complejas.

La evolución dirigida es una forma rápida de encontrar variantes de enzimas que actúan mejor que las enzimas presentes en la naturaleza bajo unas condiciones específicas. Todos los procesos de evolución dirigida contemplan dos etapas esenciales: la creación de variabilidad genética (**Cohen N** y col., 2001; **Arnold FH** y **Georgiou G**, 2003a) y la disponibilidad de un método de *screening* robusto, rápido y fiable que permita seleccionar aquellas variantes que muestran las características deseadas (**Arnold FH** y **Georgiou G**, 2003b; **Schmidt M** y **Bornscheuer UT**, 2005). Esta última etapa es totalmente crítica en un proceso de evolución molecular.

Las lipasas han emergido como importantes biocatalizadores en la industria química y biomédica debido a su excelente capacidad para llevar a cabo reacciones regioselectivas en una gran variedad de solventes orgánicos y con un amplio rango de sustratos y han sido objeto de numerosos procesos de evolución dirigida para modificar sus propiedades catalíticas.

La síntesis estereoselectiva de compuestos orgánicos quirales tiene un elevado interés académico e industrial. La biocatálisis enantioselectiva es una herramienta clave en la producción de sustancias químicas para su uso en fármacos o cosméticos. (**Ashok P** y col., 1999; **Jaeger KE** y **Eggert T**, 2004). La enantioselectividad de la lipasa extracelular de *Pseudomonas aeruginosa* frente al ácido 2-metildecanoico *p*-nitrofenil éster en configuración (S) se incrementó diez veces en cuatro rondas de PCR mutagénica. Posteriormente, mediante mutagénesis a saturación, se consiguió una variante con una enantioselectividad 25 veces mayor que la enzima original (**Liebeton K** y col., 2000; **Reetz MT**, 2002)

La mejora de la enantioselectividad mediante evolución molecular también se ha llevado a cabo en otras lipasas como es el caso de la lipasa A de *Bacillus subtilis* para la formación de alcoholes quirales (**Funke SA** y col., 2003) y con la lipasa de

Burkholderia cepacia (**Koga Y** y col., 2003). Otros ejemplos en los que se ha alterado la especificidad de sustrato son lipasa de *Bacillus thermocatenuatus* evolucionada hacia una fosfolipasa con mayor afinidad por ácidos grasos de cadena larga (**Kauffmann I** y **Schmidt-Dannert C**, 2001) o la lipasa de *Pseudomonas aeruginosa* en la mejora de la actividad amidasa (**Fujii R** y col., 2005).

Aunque, como se ha mencionado anteriormente, las lipasas son ampliamente utilizadas tanto en la hidrólisis de grasas como en reacciones de esterificación, no hemos encontrado ninguna referencia sobre la modificación de la especificidad de una lipasa frente a PUFAs ω 3 mediante evolución molecular.

5.4.1 Creación de variabilidad genética. PCR Mutagénica

Existen diferentes metodologías que permiten la obtención de colecciones de variantes génicas de forma aleatoria como la utilización de radiación ultravioleta o agentes químicos (**Taguchi S** y col., 1998), la utilización de cepas bacterianas con una o varias rutas de reparación del ADN alteradas (**Bornscheuer UT** y col., 1998). Sin embargo, este tipo de técnicas, a diferencia de lo que ocurre con otras metodologías como la PCR mutagénica, provocan mutagénesis no sólo en el gen de interés sino en otros contenidos en el plásmido de clonación y en el propio genoma de la bacteria hospedadora (**Neylon C**, 2004).

Quizás, la técnica más utilizada para lograr variabilidad genética es la PCR mutagénica (**Leung DW** y col., 1989; **Cadwell RC** y **Joyce GF**, 1992). Mediante este método las mutaciones se generan por la acción de la ADN polimerasa durante el proceso de amplificación, pudiéndose incrementar la tasa de mutación de múltiples formas. Uno de los métodos más utilizados es la combinación de pequeñas cantidades de Mn^{2+} (en lugar de su cofactor natural, Mg^{2+}), concentraciones desbalanceadas de los desoxiribonucleótidos trifosfato (dNTPs) y la modificación del número de ciclos de amplificación. Se ha comprobado como la presencia de Mn^{2+} junto con una mayor concentración de dGTP y dTTP en la reacción de amplificación conlleva tasas de error de, aproximadamente, un nucleótido por kb (**Neylon C**, 2004).

El método utilizado en este trabajo para lograr variabilidad genética se basó en la utilización de una polimerasa (Mutazyme™) que introduce un amplio rango de mutaciones al azar. Esta enzima produce todos los tipos posibles de transiciones y

transversiones, mostrando una ligera preferencia por las primeras, mientras que las inserciones y deleciones son relativamente raras (**Cline J** y **Hogrefe H**, 2000). Esta enzima es, aproximadamente, tres veces más propensa a mutar Guaninas y Citosinas ($AT \rightarrow GC/GC \rightarrow AT=0,2$) mientras que la *Taq* polimerasa tiende a mutar con mayor probabilidad Adeninas y Timinas ($AT \rightarrow GC/GC \rightarrow AT > 1$). La tasa de mutación deseada se fija en función de la cantidad de molde presente en la reacción, siendo ésta más elevada al utilizar bajas cantidades de ADN molde.

La secuenciación del gen *lipI* en 10 de los clones obtenidos mostró que la frecuencia de mutación en el presente estudio fue de 1,2 mutaciones/kb. Los resultados confirmaron que la mayoría de los cambios producidos eran transiciones (transiciones/transversiones=2,3), siendo el cambio más frecuente G→A.

Es importante tener en cuenta que si la tasa de mutación obtenida es demasiado alta, la mayoría de las enzimas obtenidas serán inactivas (**Moore JC** y **Arnold FH**, 1996), mientras que si son bajas permiten la creación de diversidad mutacional sin destruir la actividad, aumentando la posibilidad de encontrar variantes mejoradas (**Suzuki M** y col., 1996; **Drummond DA** y col., 2005). Por otro lado, la completa randomización de una proteína conteniendo, por ejemplo, 285 aminoácidos conllevaría la obtención de 20^{285} variantes enzimáticas diferentes, es decir, un espacio secuencial prácticamente infinito. Sin embargo, la sustitución de un aminoácido de la enzima por otro de los 19 restantes conllevaría, en base al algoritmo $N=19M \times 285! / (285-M)!M!$, siendo M es el número de sustituciones aminoacídicas, el análisis de un número de variantes (N), teóricamente, mucho menor (N=5.415) (**Arnold FH**, 1998; **Reetz MT**, 2002).

Las colecciones de clones recombinantes que expresan las variantes deben ser analizadas, más que seleccionadas, de forma individual. Este hecho es muy importante ya que limita, en la mayoría de los casos, el número de variantes enzimáticas a analizar (normalmente entre 10^4 y 10^5). Por ello, generalmente, las estrategias empleadas implican la creación y el análisis de genotecas de variantes que difieran en 1 ó 2 aminoácidos de la proteína original (**Wan L** y col., 1998; **Zhao H** y col., 1999).

5.4.2 Evolución dirigida en *Saccharomyces cerevisiae*

S. cerevisiae constituye un buen sistema de expresión heterólogo para ser utilizado en procesos de evolución molecular ya que posee una buena eficiencia de transformación, tasa de crecimiento y, por otro lado, permite llevar a cabo todo el procesamiento posttraduccional de proteínas eucariotas (**Morawski B** y col., 2000; **Bulter T** y col., 2003). Además, en este microorganismo los procesos de recombinación *in vivo*, recombinación y ligación entre fragmentos de ADN que posean homología, se producen de forma muy eficiente (**Orr-Weaver TL** y col., 1981; **Ma H** y col., 1987). De hecho, la presencia de fragmentos homólogos de, tan sólo, 30 pb de longitud son suficientes para que tenga lugar este proceso (**Manivasakam P** y col., 1995). Esta propiedad ha sido utilizada para lograr colecciones de microorganismos expresando las variantes al cotransformar la levadura con fragmentos de ADN y un plásmido linearizado que presentaban zonas homólogas. Para ello, los oligonucleótidos utilizados como cebadores se diseñan de manera que el fragmento amplificado por PCR posea, aproximadamente, unos 50 pb de homólogos en cada extremo con el vector linearizado (**Raymond CK** y col., 1999).

Esta estrategia de recombinación *in vivo* ha sido utilizada, por ejemplo, para mejorar 174 veces la termoestabilidad y 100 veces la resistencia a la oxidación de una peroxidasa fúngica utilizada como aditivo en detergentes (**Cherry JR** y col., 1999). Diez generaciones de evolución dirigida de la lacasa MtL del hongo *Myceliophthora thermophila* permitieron mejorar 8 veces su expresión e incrementar 170 veces su actividad oxidativa (**Bulter T** y col., 2003).

En nuestro caso, una vez obtenida la cepa *S. cerevisiae* tBT158-19, capaz de secretar la proteína GGLIP 1 al medio extracelular, se desarrolló un método de selección que permitiese detectar la actividad lipolítica directamente en placas, evitando la necesidad de realizar procesos de inducción en medio líquido. Las colonias crecidas sobre el medio de selección, conteniendo como sustratos trioleína o triEPA, galactosa y rodamina B, mostraban un color rosado y emitían fluorescencia al ser expuestas a la luz ultravioleta indicando la presencia de actividad lipolítica.

Con el fin de crear una colección de variantes mediante recombinación *in vivo* se cotransformó *S. cerevisiae* BJ5465 con fragmentos amplificados mediante PCR mutagénica y el plásmido pBT158 linearizado (**Figura 25**). El análisis de las variantes obtenidas se realizó, en primer lugar, sobre placas conteniendo trioleína

como sustrato, seleccionándose 1.000 clones que emitían fluorescencia al ser expuestos a luz u.v. Sin embargo, todas las colonias seleccionadas mostraron una actividad nula al ser analizadas en placas conteniendo triEPA como sustrato.

Estudios previos con esta lipasa mostraron unos niveles de secreción muy bajos (<1 mg/L) en *S. cerevisiae* (**Bertolini MC** y col., 1995). Esta escasa concentración de proteína extracelular y la menor especificidad de la enzima frente a triEPA podría justificar la ausencia de halos fluorescentes en las placas conteniendo este triglicérido como sustrato. Este hecho se confirmó al picar varias colonias, en placas del mismo medio, en superficies mayores (1 cm²). La presencia de mayor biomasa y, por tanto, una mayor concentración de enzima extracelular sí permitió observar la presencia de halos fluorescentes.

Debido a que la elección de las variantes es crítica para futuras rondas de mejora y análisis, se concluyó que este método de selección no era lo suficientemente sensible como para evitar la posible selección de falsos positivos, por lo que se descartó su utilización.

5.4.3 Evolución dirigida en *Pichia pastoris*

Aunque *P. pastoris* ha sido utilizada para la expresión de variantes mejoradas (**Morawski B** y col., 2000; **Morawski B** y col., 2001), no existe ningún trabajo, hasta la fecha, en el que esta levadura haya sido empleada como hospedador para un proceso de evolución molecular.

La expresión de genes heterólogos en *P. pastoris* se basa en la integración por homología del plásmido de expresión en el genoma de la levadura (**Romanos MA** y col., 1998). Los métodos de transformación, electroporación o mediante la formación de protoplastos, con una elevada cantidad de ADN plasmídico linearizado y una selección en elevadas concentraciones de antibiótico (G418 o zeocina) permiten, de forma general, obtener clones con 1-5 copias integradas del gen de interés (**Romanos MA** y col., 1992; **Scorer CA** y col., 1994; **Cereghino JL** y **Cregg JM**, 2000).

La integración de un elevado número de copias ha permitido, en algunos casos, lograr elevados niveles de expresión, como por ejemplo, 12 g/L del fragmento C de la toxina tetánica (**Clare JJ** y col., 1991), 1 g/L de la lipasa humana inducida por

sales biliares (**Murasugi A** y col., 2001), 400 mg/L del antígeno superficial de la hepatitis B (**Vassileva A** y col., 2001) o 20 mg/L de glicoproteínas de adhesión del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (HIV-1 ENV) (**Scorer CA** y col., 1994), entre otros.

El planteamiento de una estrategia de evolución dirigida en *P. pastoris* hizo imprescindible lograr unas condiciones de transformación que permitieran asegurar la integración de una única copia de cada gen. De esta forma nos asegurábamos que cada clon obtenido generaba una sola variante de la proteína GGLIP 1. El número de copias integradas se ve favorecido al realizar la transformación con elevadas cantidades de ADN plasmídico y por una elevada concentración de antibiótico en el medio de selección (**Romanos MA** y col., 1992; **Scorer CA** y col., 1994; **Cereghino JL** y **Cregg JM**, 2000). La proteína que confiere resistencia a la zeocina actúa estequiométricamente, no enzimáticamente, permitiendo, por tanto, establecer una buena correlación entre el número de copias integradas del gen *Sh ble* y el fenotipo de hiperresistencia a este antibiótico (**Higgins DR** y col., 1998). De esta forma, la selección de transformantes resistentes a concentraciones crecientes de zeocina (100-2.000 µg/mL) implicaría la presencia de múltiples copias integradas del plásmido y, por lo tanto, del gen heterólogo.

Como en nuestro caso deseábamos obtener transformantes monocopia, se ensayaron condiciones que incluían la utilización de una baja cantidad de ADN durante la transformación (250-500 ng de ADN) y la selección en presencia de una baja concentración de antibiótico (25-50 µg/mL de zeocina).

Como se esperaba, el número de clones obtenidos, a la misma concentración de antibiótico, se incrementó casi al doble al utilizar la mayor cantidad de ADN. Por el contrario, para una misma cantidad de ADN, este número disminuyó prácticamente tres veces al realizar la selección a la concentración más alta de zeocina (50 µg/mL). El análisis mediante hibridación de una muestra representativa de los clones obtenidos al utilizar una baja cantidad de ADN y de zeocina reveló que el 84% contenían una única copia del plásmido de expresión integrada en su genoma (**Figura 33**) confirmando así nuestras expectativas. Uno de los clones obtenidos (tBT70-399) se seleccionó como cepa control para desarrollar un método de “screening”.

Al igual que en *S. cerevisiae*, se puso a punto un método de selección en placa con el fin de poder analizar de forma rápida un elevado número de clones. Tras 72 horas de incubación, las colonias crecidas en el medio mostraron los típicos halos fluorescentes tanto en presencia de trioleína como de triEPA aunque en el caso de este último sustrato los halos eran de menor tamaño (**Figura 26**).

5.4.3.1 Obtención de una colección de variantes del gen *lipI*

Debido a que los plásmidos de expresión de *P. pastoris* son bifuncionales, decidimos desarrollar un proceso que nos permitiese clonar directamente los productos de la PCR mutagénica en estos plásmidos y transformar directamente la levadura. De esta forma evitábamos tener que realizar un paso intermedio, laborioso y poco eficiente, de ligación y transformación en *E. coli*.

La colección de variantes del gen *lipI* se realizó utilizando una modificación del sistema de clonación “Gateway® Technology” (Invitrogen) basado en el mecanismo de recombinación-inserción del fago λ en *E. coli*. Este sistema permite la inserción de fragmentos de ADN en diferentes vectores de clonación, manteniendo su orientación y marco de lectura, reemplazando el uso de enzimas de restricción y de ligasa. Este último motivo hace que este sistema presente una elevada eficiencia en la clonación/subclonación de fragmentos de ADN en comparación con el sistema tradicional. Así, el análisis de los clones obtenidos mediante esta tecnología mostró que el 100% contenían el plásmido con el gen correctamente insertado, mientras que mediante una ligación convencional el porcentaje de éxito fue del 30%.

El fundamento de esta técnica consiste en que el gen de interés, localizado entre dos sitios de integración *attB* (presentes en *E. coli*) se hace reaccionar con un plásmido que contiene los sitios de integración *attP* (presentes en el fago λ) flanqueando al gen *ccdB* (gen suicida que codifica para una proteína que interfiere con la ADN girasa de *E. coli*). La recombinación entre los sitios *attB* y *attP*, mediante una reacción denominada BP, origina dos productos: uno que contiene dos sitios nuevos de recombinación *attL* flanqueando al gen integrado, y otro, inviable, que contiene al gen *ccdB* flanqueado por dos nuevos sitios *attR*.

Para poder aplicar esta estrategia en *P. pastoris* se construyó, a partir de un plásmido de expresión pPICZ α , un vector conteniendo dos sitios *attP* (**Figura 28**). El

plásmido resultante se recombinó *in vitro* con los fragmentos obtenidos por PCR mutagénica conteniendo las secuencias *attB*.

La creación de variabilidad genética mediante PCR mutagénica se realiza generalmente utilizando como molde únicamente la secuencia del gen de interés. De esta forma se garantiza que los clones seleccionados portan una variante que procede del gen mutado y que codifica, en caso de éxito, para una proteína con propiedades catalíticas diferentes a la original. Sin embargo, la estrategia de clonación nos obligó a realizar este proceso utilizando como molde un *cassette* de expresión conteniendo el promotor *AOX1*, el péptido señal del factor α de *S. cerevisiae*, el gen *lipI* y el terminador *AOX1*. Este hecho conllevaba la posible mutación de cualquiera de estos elementos incrementando la diversidad de mutantes obtenidos. Aunque el tamaño de este fragmento era de 3.162 pb, el doble que el gen *lipI* (1.635 pb), decidimos mantener una baja tasa de mutación (1,1-2,5 mutaciones/kb) con el fin de provocar pocos cambios aminoácidos y mantener la funcionalidad.

La colección de plásmidos obtenidos mediante esta estrategia se utilizó para transformar de *P. pastoris* X-33 en las condiciones establecidas para obtener un elevado porcentaje de clones monocopias. El 90% de los transformantes obtenidos mostraron actividad en placas conteniendo trioleína como sustrato. Al transferir estos clones a placas de medio conteniendo triEPA como sustrato se identificaron dieciseis que no producían halos fluorescentes y, aparentemente, no mostraban actividad sobre este triglicérido. Después de repetir este proceso, se seleccionaron cinco clones que mostraban una buena actividad frente a trioleína y una actividad muy baja frente a triEPA.

La hibridación del ADN genómico con una sonda específica confirmó que los cinco clones seleccionados eran monocopia y, por lo tanto, las variantes de la proteína GGLIP 1 secretadas por cada uno de ellos procedía de la expresión de un único gen.

5.4.3.2 Análisis de las variantes de la lipasa GGLIP 1

5.4.3.2.1 Especificidad de sustrato

Con el fin de determinar la especificidad de sustrato de las variantes seleccionadas se procedió, en primer lugar, a la purificación de las proteínas mediante cromatografía de intercambio aniónico. Una vez purificadas, se llevaron a cabo reacciones de hidrólisis, utilizando trioleína y triEPA como sustratos, que se analizaron mediante HPLC-MS.

El análisis de triglicéridos por HPLC-MS mostró que la lipasa GGLIP 1 producida por la cepa *G. geotrichum* BT107 hidrolizaba el 70% de trioleína y el 46% de triEPA a los 30 minutos de reacción. En todos los ensayos realizados los resultados obtenidos, después de 60 minutos de hidrólisis, no mostraron un incremento significativo en la hidrólisis de ambos sustratos. Estos valores difieren con los únicos datos existentes en la bibliografía referentes a la hidrólisis de aceite de oliva y de aceite de pescado (atún) utilizando la lipasa I de *G. geotrichum* ATCC 34614 (**Shimada Y** y col., 1995). En este caso, los porcentajes de hidrólisis determinados mediante titulación de los ácidos grasos liberados fueron 89% y 31% para el aceite de oliva y de atún, respectivamente. Las diferencias en los porcentajes de hidrólisis en ambos trabajos son, probablemente, debidas a variaciones en las condiciones de reacción, ya que estos autores realizaron la hidrólisis en un tampón más ácido (pH 5,6 frente a pH 8), una temperatura más baja (35°C frente a 40°C) y utilizaron una metodología de análisis diferente. Además, el tipo de sustratos también fue diferente, ya que estos autores emplearon aceites más heterogéneos, mientras que en este trabajo fueron triglicéridos puros.

Los resultados obtenidos, en los análisis de triglicéridos, mostraron una desviación estándar del 27% mientras que en el análisis de los ácidos grasos, en las mismas muestras, la desviación fue menor del 19%. Estas diferencias pueden justificarse en base a las diferentes propiedades físico-químicas de estos compuestos.

Los triglicéridos son compuestos, fuertemente apolares, menos solubles que los ácidos grasos en soluciones acuosas, ya que estos últimos debido a la existencia de grupos carbonilo ionizables y, por tanto, a su carácter anfipático pueden formar micelas más fáciles de solubilizar. La homogenización de la mezcla lípido-acuosa es

fundamental para el posterior tratamiento de las muestras, requiriendo, en la mayoría de los casos, la utilización de agentes emulsionantes que faciliten la formación de micelas y la “solubilización” de la grasa (**Gilham D** y col., 2005). Es posible que la mayor variabilidad de los resultados obtenidos con los triglicéridos se deba a que, al ser menos solubles que los ácidos grasos, puedan quedar “atrapados” en las estructuras micelares y, por lo tanto, dificultar su extracción con disolventes orgánicos (**Shahidi F** y **Wanasundara PKJPD**, 2002).

El análisis de los resultados obtenidos con las variantes de la lipasa GGLIP 1, al utilizar trioleína como sustrato, reveló diferencias entre ellas. Así, la variante 425 presentó un comportamiento similar al control mientras que las variantes 79, 97 y 747 mostraron una actividad hidrolítica un 33-43% menor. La variante 126 mostró una actividad mayor que el control, aunque es necesario resaltar que la desviación estándar de los resultados fue excesivamente grande (41% frente al 27% de media).

El análisis de la actividad frente a triEPA reveló que todos los clones presentaban porcentajes de hidrólisis entre un 12-32% más bajos que el control, excepto la variante 97 que mostró unos resultados muy similares al control, alcanzando un 54 % de hidrólisis.

De la misma forma, el análisis de ácidos grasos (oleico y EPA) mostraron resultados diferentes para cada variante. El análisis de ácido oleico liberado reveló que las variantes hidrolizaban los ésteres de este ácido graso de forma similar al control. Aunque con diferentes porcentajes de actividad, todas ellas mostraron valores comprendidos dentro de los márgenes de variación del control ($\pm 19\%$), excepto las variantes 79 y 747 que presentaban unas desviaciones mayores, entre un 20% mayor o menor que el control.

El análisis de EPA reveló que dos variantes, la 425 y la 747, hidrolizaban los ésteres de triEPA un 50,3% y un 43,3% peor que el control, respectivamente. Aunque el balance de materia en estos procesos es complejo, en estos dos casos los resultados coincidían aproximadamente, con los resultados obtenidos en el análisis de los triglicéridos.

Debido a que los análisis de los ácidos grasos liberados durante la hidrólisis mostraron una mayor reproducibilidad (coeficiente de desviación estándar $< 19\%$), decidimos evaluar la variantes en función de estos resultados. Para ello, establecimos un criterio de selección que definimos como *coeficiente de actividad*.

Este coeficiente viene dado por la relación entre el porcentaje de actividad, medido en forma de ácidos grasos liberados, de una enzima con respecto al control frente a ésteres de EPA y de ácido oleico. El cálculo de este coeficiente para las cinco variantes seleccionadas nos permitió determinar que las mejores proteínas eran las procedentes de los clones 425 y 747 con un coeficiente de actividad de aproximadamente 0,46 en ambos casos. Este valor indicaba, por tanto, una reducción de la actividad hidrolítica frente a triEPA de, aproximadamente, un 54% con respecto al control (**Figura 36**). Es decir, las variantes hidrolizaban un 24,8% de este triglicérido en las condiciones de reacción establecidas.

Las fuentes naturales o comerciales más abundantes que contienen triglicéridos esterificados con PUFAs ω 3 son los aceites de pescado y los concentrados obtenidos a partir de éstos. Sin embargo, en ambos casos, son sustratos muy heterogéneos conteniendo más de 50 tipos diferentes ácidos grasos con diferentes grados de insaturación, tanto en forma libre como esterificados, que podrían afectar a la actividad enzimática (**Halldorsson A** y col., 2004).

Con la finalidad de determinar el comportamiento de las variantes 425 y 747 frente a un sustrato más heterogéneo, se realizaron hidrólisis utilizando un aceite comercial (Eupoly-EPA®, Puleva Biotech, S.A.) con, aproximadamente, un contenido en EPA y DHA del 30% en forma de triglicéridos (**Tabla 20**). Los resultados obtenidos, mediante el análisis de los ácidos grasos, revelaron que ambas variantes producían unos picos, correspondientes al EPA, con unas áreas un 55,6% (variante 425), y un 43,7% (variante 747) menores que el área obtenida al realizar la hidrólisis con la lipasa GGLIP 1 (**Figura 37**), confirmando, por tanto, los resultados previamente obtenidos con triglicéridos puros. Los resultados del análisis de ácido oleico mostraron que ambas lipasas hidrolizaban los ésteres de este ácido de forma similar al control, aunque las áreas de los picos fueron un 14,5-24% menores.

Tabla 20. Contenido (%) en ácidos grasos en Eupoly-EPA®.

Tipo	(%)
Ácidos grasos poliinsaturados	44,86
- EPA	20,76
- DHA	10,45
Ácidos grasos saturados	29,28
Ácidos grasos monoinsaturados	25,87
- Oleico	10,33

El cálculo del *coeficiente de actividad* a partir de los resultados anteriores, fue de 0,52 para la variante 425 y 0,74 para la 747. La actividad hidrolítica frente a los glicéridos ricos en EPA presentes en este aceite fue, respectivamente, un 48% y 26% menor con respecto al control (**Figura 40**). A diferencia de lo que ocurre con la variante 425 donde los resultados coinciden aproximadamente con los obtenidos previamente, el valor del coeficiente para la variante 747 fue más bajo que el obtenido en los ensayos con triglicéridos puros. Este hecho podría deberse a la utilización de un sustrato con una composición más compleja que podría, de alguna forma, afectar a la actividad hidrolítica de la enzima sobre ésteres del ácido oleico.

Estos resultados confirman la menor actividad hidrolítica de las variantes 425 y 747 frente a los glicéridos de EPA presentes en una mezcla heterogénea lo que indica su posible aplicación a la hora de enriquecer la fracción de PUFAs esterificados a partir de aceites de pescado.

Con el fin de analizar cuál era el origen molecular que sustentaba esta especificidad de sustrato, se procedió a realizar un análisis estructural de las variantes, con especial atención a las procedentes de los clones 425 y 747. Por otro lado, debido a que las variantes 79, 97 y 126, en medio acuoso, liberaron cantidades similares de EPA que el control, a diferencia de lo que se observó en las placas de selección, se decidió no profundizar en el análisis estructural de las mismas.

5.4.3.2.2 Análisis estructural

La secuenciación de los genes de las variantes obtenidas confirmó la existencia de mutaciones con respecto al gen *lipI* original. Todos los cambios producidos fueron transiciones (G→A), excepto en el caso del clon 126 donde el cambio fue una transversión (C→A) (**Tabla 19**). Estas mutaciones generaron cambios en la secuencia de aminoácidos de las variantes, concentrándose la mayoría en la zona correspondiente a la *tapadera peptídica*, excepto en el caso de la variante 126 que se produjo en una zona diferente, aunque próxima a dicha estructura. Todos los cambios se localizaron en los primeros 104 aminoácidos del extremo N-terminal de la secuencia proteica.

La resolución de la estructura tridimensional de la lipasa I de *G. geotrichum* ATCC 34614 permitió observar que entre la Ser217 localizada en el centro catalítico y la parte inferior de la *tapadera peptídica*, aparecía una cavidad que, según el modelo de activación interfacial, tras el movimiento de la “tapadera”, ésta quedaría expuesta provocando la unión hidrofóbica con el sustrato (**Schrag JD** y col., 1991; **Schrag JD** y col., 1993). Por lo tanto, cabría esperar que sustituciones aminoacídicas en esta región, como ocurre en este trabajo, influyeran en la especificidad de sustrato por parte de la enzima (**Bertolini MC** y col., 1994; **Martinelle M** y col., 1996).

La *tapadera peptídica* es una estructura constituida por dos α -hélices cortas unidas al cuerpo de la lipasa a través de estructuras flexibles que permiten los movimientos de apertura (forma activa) y de cierre (forma inactiva) del sitio de acceso del sustrato. La conformación de esta estructura no sólo modula la accesibilidad de la maquinaria catalítica, sino que también participa en la unión del sustrato a la superficie enzimática y, probablemente, esté involucrada en el reconocimiento del mismo. En algunas lipasas, incluso, el movimiento de la tapadera a la conformación “abierta” genera el correcto posicionamiento de los aminoácidos responsables de la estabilización del intermediario tetraédrico obtenido durante la reacción catalítica (**Brocca S** y col., 2003).

El papel fundamental de la tapadera en la selectividad de sustrato por parte de las lipasas fue confirmado mediante deleciones y mutagénesis específica realizadas en la secuencia de la tapadera de la lipasa pancreática humana (**Jennens ML y Lowe ME**, 1994; **Carrière F** y col., 1998) y de lipasas fúngicas (**Holmquist M** y col.,

1993; **Joerger RD** y **Haas MJ**, 1994; **Martinelle M** y col., 1996) que modificaron la selectividad de sustrato de las mismas.

Sin embargo, aminoácidos situados en la zona de la *tapadera peptídica* comprendida entre los aminoácidos Pro66-Val76, que están dispuestos formando una α -hélice, lejos del centro activo, podrían actuar restringiendo el acceso al residuo Ser217 y, por lo tanto, participar activamente en la acción catalítica de la enzima (**Schrag JD** y col., 1991). Los aminoácidos Pro66, Leu70, Leu73, Leu79, Iso83 y Leu91, según el modelo cristalizado de la proteína 1THG (**Schrag JD y Cygler M**, 1993), están localizados en la cara interna de la tapadera y establecerían interacciones hidrofóbicas con los sustratos al quedar expuestos cuando la lipasa sufre el cambio conformacional (**Figura 41 A**). Por tanto, *a priori* cabría esperar que la estructura de los sitios de unión y de escisión del ácido graso fueran determinantes en la selectividad de la enzima por un sustrato (**Schmitt J** y col., 2002).

Mientras que la geometría de la maquinaria catalítica está muy conservada, el tamaño y la forma del sitio de unión del ácido graso varía considerablemente entre las lipasas (**Tabla 3**). Las propiedades de esta región en la lipasa I de *G. geotrichum*, así como el papel de algunos residuos en la especificidad frente a ácidos grasos con una determinada longitud de cadena concluyeron que la región de la proteína comprendida entre los aminoácidos Gly349-Thr406 parece ser determinante en la especificidad frente a trioleína (**Holmquist M** y col., 1997). Los residuos Ala357, Phe358, situados al comienzo del túnel de entrada al centro activo, así como Phe379 y Tyr380, localizados en el fondo de dicho túnel parecen desempeñar un papel muy importante (**Figura 41 B**).

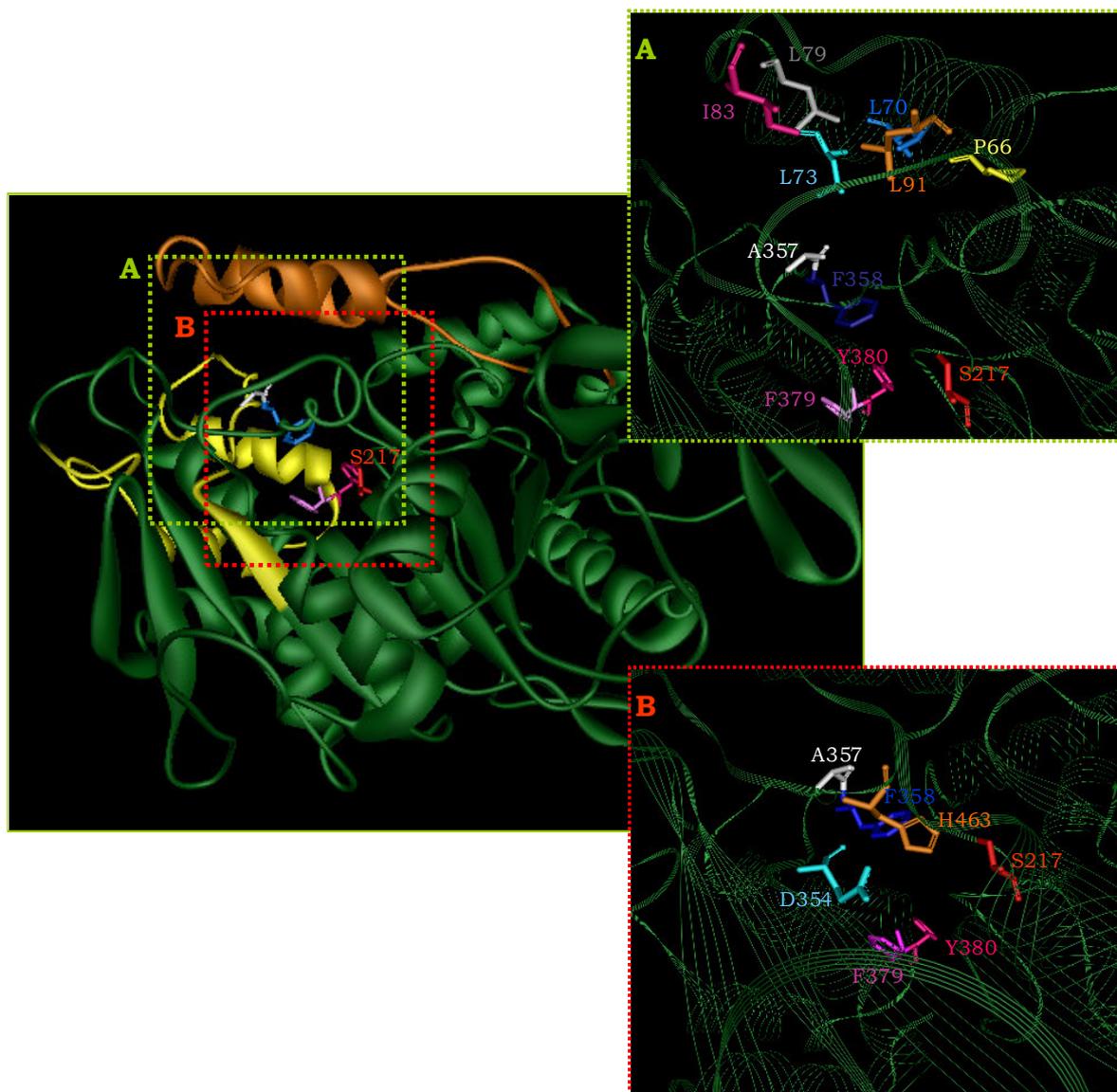


Figura 41. Estructura tridimensional de la lipasa 1THG de *G. geotrichum* ATCC 34614 (Schrag JD y Cygler M, 1993). La zona comprendida entre los aminoácidos Gly359 y Thr406 (en amarillo) es importante en la actividad frente a trioleína. **A:** Aminoácidos localizados en la cara interna de la tapadera peptídica que interactúan con el sustrato: Pro66 (amarillo), Leu70 (azul), Leu73 (celeste), Leu79 (gris), Iso83 (rosa), Leu91 (naranja). **B:** Residuos Ala357 (blanco) y Phe358 (azul oscuro) situados a la entrada del túnel de entrada del sustrato y los residuos Phe379 (violeta) y Tyr380 (rosa) situados al fondo del túnel. Aminoácidos del centro activo, Ser217 (rojo), Glu354 (azul claro) e His463 (naranja).

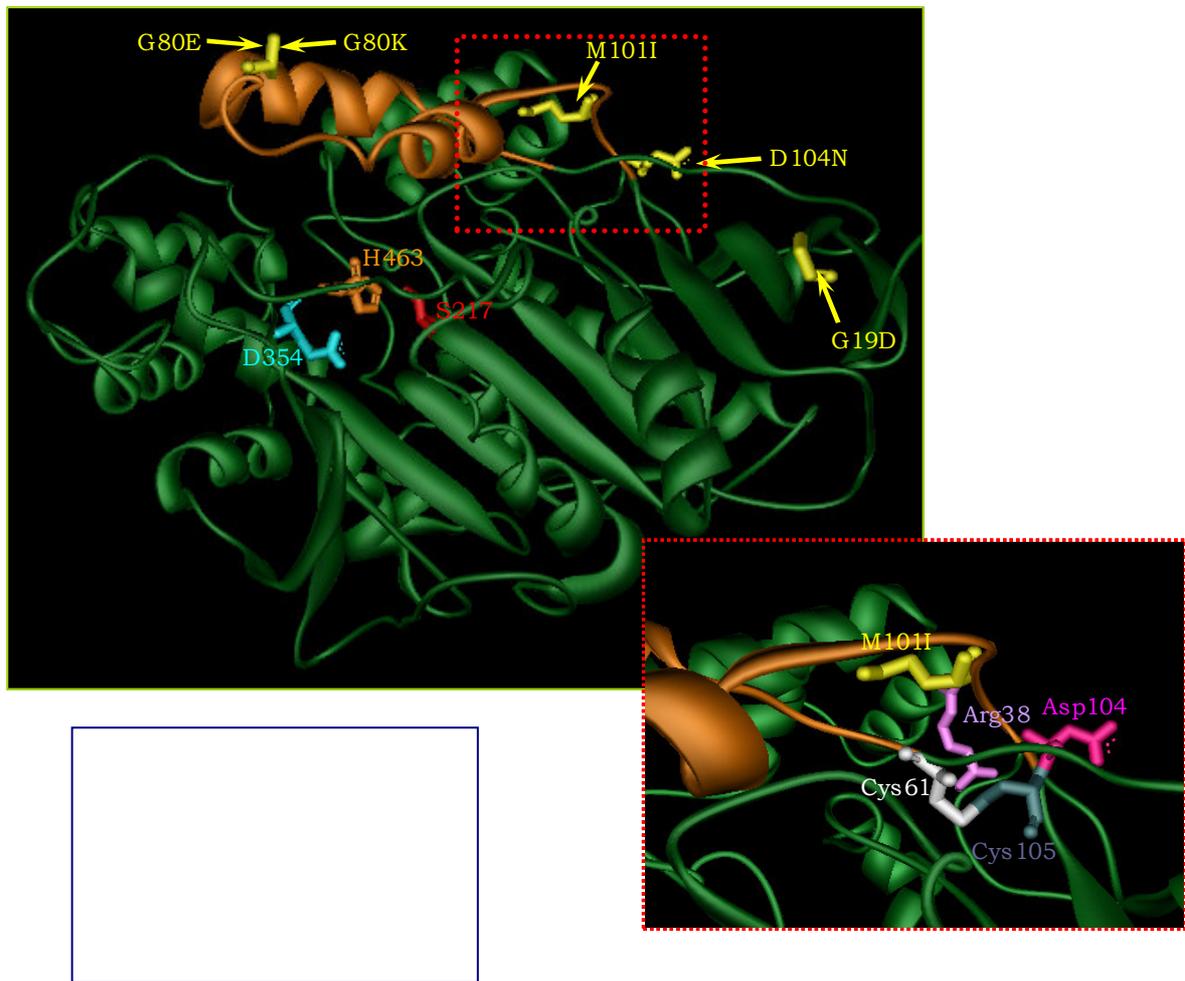


Figura 42. Estructura tridimensional de la lipasa 1THG de *G. geotrichum* ATCC 34614 (Schrag JD y Cygler M, 1993). Las sustituciones aminoacídicas encontrados en las variantes seleccionadas se señalan en color amarillo. También se muestra la *tapadera peptídica* (naranja) y los aminoácidos del centro activo, Ser217 (rojo), Glu354 (azul) e His463 (naranja). En la vista ampliada se observan el puente disulfuro Cys61(blanco)-Cys105(gris) y el puente salino Arg38(morado)-Asp104(rosa), ambos situados en la base de la tapadera.

Es muy difícil prever, en ausencia de una resolución cristalográfica, los cambios estructurales originados en una proteína al producir sustituciones en su secuencia. Ninguna de las sustituciones presentes en las cinco variantes afectó a los residuos implicados en la especificidad frente a trioleína mencionados en el párrafo anterior. Las pequeñas variaciones en los residuos obtenidos tras la hidrólisis de trioleína podrían deberse a alguna alteración estructural que afectase indirectamente a alguno de estos aminoácidos, así como a otros aún no descritos que puedan estar

implicados en la especificidad por este sustrato (**Holmquist M**, 1998).

La **Figura 42** muestra la disposición de los cambios encontrados en las cinco variantes obtenidas utilizando el modelo tridimensional de la lipasa I de *G. geotrichum* (**Schrag JD** y **Cygler M**, 1993). Se puede observar como todos ellos se localizaron en el extremo N-terminal de la proteína, relativamente alejados de los aminoácidos del centro activo.

Dos de las variantes obtenidas, 97 y 425, mostraron sustituciones en la misma posición, Gly80Lys y Gly80Glu, respectivamente. El residuo Gly80 se localiza en un “loop” peptídico cuya flexibilidad conformacional se ve favorecida por la presencia de este aminoácido, ya que al tener una cadena lateral muy corta, permite la consecución de cambios en la estructura polipeptídica al contactar con una interfase lipido-acuosa (**Schrag JD** y col., 1991).

La relación entre una mayor plasticidad conformacional y la presencia de residuos de glicina se puso de manifiesto durante la evolución molecular de la lipasa de *Pseudomonas aeruginosa*. La mejora de la enantioselectividad de esta proteína, frente al ácido 2-metildecanoico *p*-nitrofenil éster (S), 25 veces con respecto a la proteína original se justificaría por un incremento en la flexibilidad de la enzima debido a la sustitución de diferentes aminoácidos localizados en la superficie por residuos de glicina (**Liebeton K** y col., 2000; **Reetz MT**, 2002).

La sustitución en estas dos variantes de Gly80 por Glu o Lys, dos aminoácidos con una cadena lateral más larga y con carga electrostática (negativa y positiva, respectivamente) podría alterar la flexibilidad de la “tapadera” convirtiéndola en una estructura más rígida dificultando la entrada de los sustratos. La presencia de dobles enlaces carbono-carbono en los ácidos grasos provoca la aparición de “codos” en las moléculas, de forma que el grupo metilo terminal de ácido graso aparece próximo al enlace éster, causando un impedimento estérico a las lipasas (**Shahidi F** y **Wanasundara UN**, 1998). Es probable, por tanto, que la presencia de cinco insaturaciones en la cadena hidrocarbonada del EPA (**Figura 7**) dificulten mucho más el acceso de la lipasa al enlace éster presente en el triEPA que en el caso de la trioleína.

Este hecho y la posible pérdida de flexibilidad podrían explicar que las proteínas presentasen una actividad normal frente a trioleína y baja frente a triEPA.

Sin embargo, la variante 97 hidroliza ésteres de EPA igual que la proteína GGLIP 1, mientras que la variante 425 presenta una actividad un 50,3% más baja que el control. Por lo tanto, estos resultados indican que las modificaciones estructurales producidas por la sustitución de Gly80 por glutámico o lisina deben ser muy diferentes.

La sustitución en la variante 747, Met101Ile, se localiza en la parte final de la secuencia correspondiente a la *tapadera peptídica*, a tres posiciones del puente disulfuro entre los residuos Cys61 y Cys105 (**Figura 42**). Tanto este puente disulfuro como el puente salino Arg38-Asp104 localizado en la base de la tapadera son dos elementos que constituyen un buen anclaje, así como un punto pivotante, para el movimiento de esta estructura (**Schrag JD y Cygler M**, 1993). La sustitución de metionina por isoleucina conlleva un incremento de hidrofobicidad ya que, según la escala de Kyte-Doolittle (**Kyte J y Doolittle RF**, 1982), la isoleucina presenta un valor de 4,5 mientras que para la metionina es de 1,9. Este incremento podría favorecer una mayor interacción hidrofóbica en esta zona dificultando el movimiento de apertura de la *tapadera peptídica*. Al igual que en el caso de la variante 425, es posible que se genere una estructura más “cerrada” que dificulte la entrada de un sustrato más rígido como el triEPA, pero no se afecte la actividad sobre la trioleína.

Como ya se ha mencionado, la ausencia de la resolución de la estructura tridimensional de las dos variantes, hace muy difícil interpretar los cambios estructurales originados al producir sustituciones en la secuencia de aminoácidos. A la luz de los resultados obtenidos, las sustituciones en las variantes 425 (Gly80Glu) y 747 (Met101Ile) originan una notable reducción en la actividad hidrolítica frente a glicéridos ricos en EPA. Es posible que este hecho se deba a una distorsión en los aminoácidos localizados en el túnel de acceso al centro activo. Es importante resaltar que ninguna de estas alteraciones estructurales afectó, de forma clara y evidente, a la actividad hidrolítica de ambas proteínas frente a ésteres de ácido oleico.

6. Conclusiones

6. Conclusiones

1. Se ha aislado, a partir del alpeorujo, la cepa *G. geotrichum* BT107.
2. Se ha clonado el gen *lipI* de *G. geotrichum* BT107. La secuencia del gen *lipI* presentó una elevada identidad (entre un 80-98,7 %) con las otras secuencias depositadas en las bases de datos.
3. El gen *lipI* se ha expresado en *P. pastoris* X-33. La concentración de proteína heteróloga secretada al medio de cultivo fue de 200 mg/L después de 72 h de inducción en matraz, aproximadamente tres veces mayor a los valores descritos en la bibliografía.
4. Se ha puesto a punto un procedimiento para realizar la síntesis química de triEPA.
5. Se ha desarrollado un nuevo método de análisis por HPLC-MS que permite determinar y cuantificar triEPA y trioleína, así como sus respectivos ácidos grasos: EPA y oleico.
6. Se ha desarrollado un sistema de selección en placa para analizar la presencia de actividad lipasa frente a trioleína o triEPA en levaduras recombinantes.
7. Se han obtenido variantes genéticas del gen *lipI* mediante PCR mutagénica. Las condiciones de amplificación utilizadas permitieron alcanzar un rango de mutación bajo (1,2 mutaciones por kb).
8. Se ha construido una colección de variantes del gen *lipI* en *S. cerevisiae* BJ5465 mediante procesos de recombinación *in vivo*.
9. Se ha desarrollado un sistema novedoso para la expresión en *P. pastoris* de variantes de enzimas generadas por mutación al azar. Este sistema basado en el proceso de recombinación-integración del fago λ en *E. coli* permite simplificar el proceso de construcción de plásmidos de expresión para la selección directa en levaduras.
10. Se han seleccionado dos variantes de la lipasa GGLIP 1 con baja actividad catalítica frente a triEPA. Las variantes 425 y 747 mostraron unos porcentajes

de hidrólisis un 50,3% y un 43,3% inferiores al control, respectivamente.

11. Los ensayos de actividad de las variantes 425 y 747 frente a producto comercial que contiene mezclas de ésteres de PUFAs y ácidos grasos saturados y monoinsaturados (Eupoly-EPA®) confirmaron que ambas hidrolizaban los ésteres de EPA un 55,6% y 43,7% peor que el control, respectivamente.

7. Bibliografía

1. **Adrio JL, Demain AL** (2003). "Fungal biotechnology". *Int. Microbiol.* **6**: 191-199.
2. **Adrio JL, Demain AL** (2005). "Microbial cells and enzymes. A century of progress". En: Methods in Biotechnology. Barredo JL (ed.), Humana Press, Inc., Totowa, NJ, pp:1-27.
3. **Alcalde M, Bulter T, Zumarraga M, Garcia-Arellano H, Mencia M, Plou FJ, Ballesteros A** (2005). "Screening mutant libraries of fungal laccases in the presence of organic solvents". *J. Biomol. Screen.* **10**: 624-631.
4. **Alford JA, Pierce DA** (1963). "Production of lipase by *Pseudomonas fragi* in a synthetic medium". *J. Bacteriol.* **86**: 24-29.
5. **Alford JA, Pierce DA, Suggs FG** (1964). "Activity of microbial lipases on natural fats and synthetic triglycerides". *J. Lipid Res.* **5**: 390-394.
6. **Altamirano MM, Blackburn JM, Aguayo C, Fersht AR** (2000). "Directed evolution of new catalytic activity using the alpha/beta-barrel scaffold". *Nature.* **403**: 606-607.
7. **Arnold FH** (1998). "Design by directed evolution". *Acc. Chem. Res.* **31**: 125-131.
8. **Arnold FH, Georgiou G** (2003a). "Directed evolution library creation: methods and protocols". En: Methods in Molecular Biology, 230. Humana Press, Totowa, NJ.
9. **Arnold FH, Georgiou G** (2003b). "Directed enzyme evolution: screening and selection methods". En: Methods in Molecular Biology, 231. Humana Press, Totowa, NJ.
10. **Artemis P, Simopoulos MD** (2002). "Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases". *J. Am. Coll. Nutr.* **21**: 495-505.
11. **Ashok P, Sailas B, Soccol CR, Nigam P, Krieger N, Soccol VT** (1999) "The realm of microbial lipases in biotechnology". *Biotechnol. Appl. Biochem.* **29**:

- 119-131.
12. **Babiak P, Reymond JL** (2005). "A high-throughput, low-volume enzyme assay on solid support". *Anal. Chem.* **77**: 373-377.
 13. **Baró L, Fonollá J, Peña JL, Martínez-Férez A, Lucena A, Jiménez J, Boza JJ, López-Huertas E** (2003). "n-3 fatty acids plus oleic acid and vitamin supplemented milk consumption reduces total and LDL cholesterol, homocysteine and levels of endothelial adhesion molecules in healthy humans". *Clin. Nutr.* **22**: 175-182.
 14. **Becker DM, Guarente L** (1991). "High-efficiency transformation of yeast by electroporation". *Methods Enzymol.* **194**: 182-187.
 15. **Benzonana B, Desnuelle P** (1968). "Action of some effectors on the hydrolysis of long-chain triglycerides by pancreatic lipase". *Biochim. Biophys. Acta.* **164**: 47-58.
 16. **Bereuter TL, Lorbeer E** (1995). "Monitoring of lipase-catalyzed cleavage of acylglycerols by high-temperature gas chromatography". *J. Chromatogr. A.* **697**: 469-474.
 17. **Bertolini MC, Laramée L, Thomas DY, Cygler M, Schrag JD, Vernet T** (1994). "Polymorphism in the lipase genes of *Geotrichum candidum* strains". *Eur. J. Biochem.* **219**: 119-125.
 18. **Bertolini MC, Schrag JD, Cygler M, Ziomek E, Thomas DY, Vernet T** (1995). "Expression and characterization of *Geotrichum candidum* lipase I gene. Comparison of specificity profile with lipase II". *Eur. J. Biochem.* **228**: 863-869.
 19. **Borge Poulsen P, Buchholz K** (2003). "History of enzymology with emphasis on food production". En: Handbook of Food Enzymology. Whitaker JR, Voragen AGJ, Wong DWS (eds.), Marcel Dekker, Inc., NY, pp: 11-20.
 20. **Bornscheuer UT** (2004). "Finding enzymatic gold on silver surfaces". *Nat. Biotechnol.* **22**: 1098-1099.
 21. **Bornscheuer UT, Altenbuchner J, Meyer HH** (1998). "Directed evolution of an esterase for the stereoselective resolution of a key intermediate in the

- synthesis of epothilones”. *Biotechnol. Bioeng.* **58**: 554-559.
22. **Bradford MM** (1976). “A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding”. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
23. **Brady L, Brzozowski AM, Derewenda ZS, Dodson E, Dodson G, Tolley S, Turkenburg JP, Christiansen L, Huge-Jennsen B, Norskov L** (1990). “A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase”. *Nature.* **343**: 767-770.
24. **Brenner S** (1988) “The molecular evolution of genes and proteins: a tale of two serines”. *Nature.* **334**: 528-530.
25. **Bulter T, Alcalde M, Sieber V, Meinhold P, Schlachtbauer C, Arnold HF** (2003). “Functional expression of a fungal laccase in *Saccharomyces cerevisiae* by directed evolution”. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 987-995.
26. **Byrwell WC, Emken EA** (1995). “Analysis of triglycerides using atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry”. *Lipids.* **30**: 173-175.
27. **Cadwell RC, Joyce GF** (1992). “Randomization of genes by PCR mutagenesis”. *PCR Method Applic.* **2**: 28-33.
28. **Carrero JJ, Lopez-Huertas E, Salieron LM, Baro L, Ros E** (2005). “Daily supplementation with (n-3) PUFAs, oleic acid, folic acid, and vitamins B-6 and E increases pain-free walking distance and improves risk factors in men with peripheral vascular disease”. *J. Nutr.* **135**: 1393-1399.
29. **Carrero JJ, Baro L, Fonolla J, Gonzalez-Santiago M, Martínez-Ferez A, Castillo R, Jimenez J, Boza JJ, Lopez-Huertas E** (2004). “Cardiovascular effects of milk enriched with omega-3 polyunsaturated fatty acids, oleic acid, folic acid, and vitamins E and B6 in volunteers with mild hyperlipidemia”. *Nutrition.* **20**: 521-527.
30. **Carrière F, Withers-Martinez C, van Tilbeurgh H, Roussel A, Cambillau C, Verger R** (1998). “Structural basis for the substrate selectivity of pancreatic lipases and some related proteins”. *Biochim. Biophys. Acta.* **1376**: 417-432.

7. Bibliografía

31. **Catoni E, Schmidt-Dannert C, Brocca S, Schmid RD** (1997). "Overexpression of lipase A and B of *Geotrichum candidum* in *Pichia pastoris*: High level production and some properties of functional expressed lipase B". *Biotechnol. Techniques*. **11**: 689-695.
32. **Cereghino JL, Cregg JM** (2000). "Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*". *FEMS Microbiol. Rev.* **24**: 45-66.
33. **Cherry JR, Lamsa MH, Schneider P, Vind J, Svendsen A, Jones A, Pedersen AH** (1999). "Directed evolution of a fungal peroxidase". *Nat. Biotechnol.* **17**: 379-384.
34. **Christie WW** (1998). "Separation of molecular species of triacylglycerols by high-performance liquid chromatography with a silver-ion column". *J. Chromatogr. A.* **454**: 273-284.
35. **Clare JJ, Rayment FB, Ballantine SP, Sreekrishna K, Romanos MA** (1991). "High-level expression of tetanus toxin fragment C in *Pichia pastoris* strains containing multiple tandem integrations of the gene". *Bio/Technology*. **9**: 455-460.
36. **Cline J, Hogrefe H** (2000). "Randomize gene sequences with new PCR mutagenesis kit". *Strategies*. **13**: 157-161.
37. **Cohen N, Abramov S, Dror Y, Freeman A** (2001). "In vitro evolution: the screening challenge of isolating the one in a million". *Trends Biotechnol.* **19**: 507-510.
38. **Coco MM** (2003). "RACHITT: Gene family shuffling by Random Chimeragenesis on Transient Templates". *Methods Mol. Biol.* **231**: 111-127.
39. **Cramer A, Raillard SA, Bermudez E, Stemmer WPC** (1998). "DNA shuffling of a family of genes from diverse species accelerates directed evolution". *Nature*. **391**: 288-291.
40. **Cregg JM, Tschopp JF, Stillman C, Siegel R, Akong M, Craig WS, Bulkholz RG, Madden LR, Kellaris PA, Davis GK, Smiley BL, Cruze J, Torregrosa R, Velicebi G, Thill GP** (1987). "High-level expression and efficient assembly of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*".

Bio/Technology. **5**: 479-485.

41. **Davis BC, Kris-Etherton PM** (2003). "Achieving optimal essential fatty acid status in vegetarians: current knowledge and practical implications". *Am. J. Clin. Nutr.* **78**: 640S-646S.
42. **Delagrave S, Murphy DJ, Mafia AM 3rd, Marrs BL, Bylina EJ, Coleman WJ, Grek CL, Dilworth MR, Yang MM, Youvan DC** (2001). "Application of a very high-throughput digital imaging screen to evolve the enzyme galactose oxidase". *Protein Eng.* **14**: 261-267.
43. **De Pury GG, Collins FD** (1972). "Very low density lipoproteins and lipoprotein lipase in serum of rats deficient in essential fatty acids". *J. Lipid Res.* **13**: 268-275.
44. **Dobson G, Christie WW, Nikolva-Damyanova B** (1995). "Silver ion chromatography of lipids and fatty acids". *J. Chromatogr. B.* **671**: 197-222.
45. **Drummond DA, Iverson BL, Georgiou G, Arnold FH** (2005). "Why high-error-rate random mutagenesis libraries are enriched in functional and improved proteins". *J. Mol. Biol.* **350**: 806-816.
46. **Eggert T, Funke SA, Rao NM, charya P, Krumm H, Reetz MT, Jaeger KE** (2005). "Multiplex-PCR-based recombination as a novel high-fidelity method for directed evolution". *Chembiochem.* **6**: 1062-1067.
47. **Emken EA, Adlof RO, Gulley RM** (1994). "Dietary linoleic acid influences desaturation and acylation of deuterium-labeled lineic and linolenic acids in young adult males". *Biochim. Biophys. Acta.* **1213**: 277-288.
48. **Funke SA, Eipper A, Reetz MT, Otte N, Thiel W, Van Pouderoyen G, Dijkstra BW, Jaeger KE, Eggert T** (2003). "Directed evolution of an enantioselective *Bacillus subtilis* lipase". *Biocatal. Biotransform.* **21**: 67-73.
49. **Gerster H** (1998). "Can adults adequately convert alpha-linolenic acid (18:3n-3) to eicopsapentaenoic acid (20:5n-3) and docosahexanoic acid (22:6n-3)?". *Int. Vitam. Nutr. Res.* **68**:159-173.
50. **Gilham D, Lehner R** (2005). "Techniques to measure lipase and sterase

7. Bibliografía

- activity in vitro". *Methods*. **36**: 139-147.
51. **Gleeson MA, Sudbery PE** (1988). "The methylotrophic yeast". *Yeast*. **4**: 1-15.
52. **Glieder A, Farinas ET, Arnold FH** (2002). "Laboratory evolution of a soluble. Self-sufficient, highly active alkane hydrolase". *Nat. Biotechnol.* **20**: 1135-1139.
53. **Goodstine SL, Zheng T, Holford TR, Ward BA, Carter D, Owens PH, Mayne ST** (2003). "Dietary (n-3)/(n-6) fatty acid ratio: possible relationship to premenopausal but not postmenopausal breast cancer risk in U.S. women". *J Nutr.* **133**: 1409-1414.
54. **Green P, Gispan-Herman I, Yadid G** (2005). "Increased arachidonic acid concentration in the brain of Flinders Sensitive Line rats, an animal model of depression". *J. Lipid Res.* **46**: 1093-1096.
55. **Gupta R, Rathi P, Gupta N, Bardo S** (2003). "Lipase assays for conventional and molecular screening: an overview". *Biotechnol. Appl. Biochem.* **37**: 63-71.
56. **Hall BG** (1999). "Toward an understnading of evolutionary potential". *FEMS Microbiol. Lett.* **178**: 1-6.
57. **Halldorsson A, Kristinsson B, Haraldsson G** (2004). "Lipase selectivity toward fatty acids commonly found in fish oil". *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **106**: 79-87.
58. **Haraldsson A., Halldorsson A, Kulas E** (2000). "Chemoenzymatic synthesis of structured triacylglycerols containing eicosapentaenoic and doco". *JAOCS.* **77**: 1139-1149.
59. **Han JJ, Iwasaki Y, Yamane T** (1999). "Monitoring of lipase-catalyzed transesterification between eicosapentaenoic acid ethyl ester and tricaprylin by silver ion high-performance liquid chromatography and high-temperature gas chromatography". *JAOCS.* **76**: 31-39.
60. **Harris JL, Craik CS** (1998). "Engineering enzyme specificity". *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2**: 127-132.
61. **Henke E, Bornscheuer UT** (1999) "Directed evolution of an esterase from *Pseudomonas fluorescens*. Random mutagenesis by error-prone PCR or a

- mutador strain and identification of mutants showing enhanced enantioselectivity by a resorufin-based fluorescent assay". *Biol. Chem.* **380**: 1029-1033.
62. **Henne A, Schmitz RA, Bömeke M, Gottschalk G, Daniel R** (2000). "Screening of environmental DNA libraries for the presence of genes conferring lipolytic activity on *Escherichia coli*". *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 3113-3116.
63. **Hilbeln JR, Bissette G, Umhau JC, George DT** (2004). "Omega-3 status and cerebrospinal fluid corticotrophin releasing hormone in perpetrators of domestic violence". *Biol. Psychiatry.* **56**: 895-897.
64. **Hibbeln JR, Nieminen LR, Lands WE** (2004). "Increasing homicide rates and linoleic consumption among five Western countries, 1961-2000". *Lipids.* **39**: 1207-1213.
65. **Higgins DR** (1995). "Overview of protein expression in *Pichia pastoris*". En: Current Protocols in Protein Science. Coligan JE, Dunn BM, Ploeg HL, Speicher DW, Wingfield PT (eds.), John Wiley & Sons, Inc., pp: 1-16.
66. **Higgins DR, Cregg JM** (1998). "Introduction to *Pichia pastoris*". En: Pichia Protocols. Higgins DR, Cregg JM (eds.), Humana Press, Totowa, NJ, pp: 1-15.
67. **Higgins DR, Busser K, Comiskey J, Whittier PS, Purcell TJ, Hoeffler JP** (1998). "Small vectors for expression based on dominant drug resistance with direct multicopy selection". En: Pichia Protocols. Higgins DR, Cregg JM (eds.), Humana Press, Totowa, NJ, pp: 41-53.
68. **Hiraga K, Arnold FH** (2003). "General Method for Sequence-independent Site-directed Chimeragenesis". *J. Mol. Biol.* **330**: 287-296.
69. **Holmes DS, Quigley M** (1981). "A rapid boiling method for the preparation of bacteria plasmids". *Anal. Biochem.* **114**: 193-197.
70. **Holmquist M** (1998). "Insights into the molecular basis for fatty acyl specificities of lipases from *Geotrichum candidum* and *Candida rugosa*". *Chem. Phys. Lipids.* **93**: 57-65.
71. **Holmquist M, Tessier DC, Cygler M** (1997). "High-level production of

7. Bibliografía

- recombinant *Geotrichum candidum* lipases in yeast *Pichia pastoris*". *Protein Exp. Purif.* **11**: 35-40.
72. **Holub BJ** (2002). "Clinical nutrition: Omega-3 fatty acids in cardiovascular care". *JAMC.* **166**: 608-615.
73. **Horrocks LA, Yeo YK** (1999). "Health benefits of docosahexaenoic acid (DHA)". *Pharmacol. Res.* **40**: 211-225.
74. **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.
75. **Jaeger KE, Eggert T** (2004). "Enantioselective biocatalysis optimized by directed evolution". *Curr. Opin. Biotechnol.* **15**: 305-313.
76. **Jaeger KE, Ransac S, Dijkstra BW, Colson C, van Heuvel M, Misset O** (1994). "Bacterial lipases". *FEMS Microbiol. Rev.* **15**: 29-63.
77. **Jaeger KE, Reetz MT** (1998) "Microbial lipases form versatile tools for biotechnology". *Trends Biotechnol.* **16**: 396-403.
78. **Jaeger KE, Reetz MT** (2000). "Directed evolution of enantioselective enzymes for organic chemistry". *Curr. Opin. Chem. Biol.* **4**: 68-73.
79. **Jaeger KE, Schneidinger B, Rosenau F, Werner M, Lang D, Dijkstra BW, Schimossek K, Zonta A, Reetz M** (1997) "Bacterial lipases for biotechnological applications". *J. Mol. Catal. B: Enzymatic.* **3**: 3-12.
80. **Jennens ML y Lowe ME** (1994). "A surface loop covering the active site of human pancreatic lipase influences interfacial activation and lipid binding". *J. Biol. Chem.* **269**: 25470-25474.
81. **Jensen RG** (1983). "Detection and determination of lipase (acylglycerol hydrolase) activity from various sources". *Lipids.* **18**: 650-657.
82. **Jette JF, Ziomek E** (1994). "Determination of lipase activity by a rhodamine-triglyceride-agarose assay". *Anal. Biochem.* **219**: 256-260.
83. **Jump DB** (2002). "The biochemistry of n-3 polyunsaturated fatty acids". *J.*

Biol. Chem. **277**: 8755-8758

84. **Jun Han J, Iwasaki Y, Yamane T** (1999) "Monitoring of Lipase-Catalyzed Transesterification between eicosapentaenoic acid ethyl ester and tricaprylin by silver ion high-performance liquid chromatography and high-temperature gas chromatography". *JAOCS.* **76**: 31-39.
85. **Kendrick A, Ratledge C** (1992). "Lipids of selected molds grown for production of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids". *Lipids.* **27**: 15-20.
86. **Kerwin JL, Wiens AM, Ericsson LH** (1996). "Identification of fatty acids by electrospray mass spectrometry and tandem mass spectrometry". *J. Mass Spectrom.* **31**: 184-192.
87. **Koga Y, Kato K, Nakano H, Yamane T** (2003). "Inverting enantioselectivity of *Burkholderia cepacia* KWI-56 lipase by combinatorial mutation and high throughput screening using single-molecule PCR and in vitro expression". *J. Mol. Biol.* **331**: 585-592.
88. **Kouker G, Jaeger KE** (1987). "Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases". *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 211-213.
89. **Kuchner O, Arnold F** (1997). "Directed evolution of enzyme catalysts". *Trends Biotechnol.* **15**: 523-530.
90. **Kumar S, Chen CS, Waxman DJ, Halpert JR** (2005). "Directed evolution of mammalian cytochrome P450 2B1: mutations outside of the active site enhance the metabolism of several substrates, including the anticancer prodrugs cyclophosphamide and ifosfamide". *J. Biol. Chem.* **280**: 19569-19575.
91. **Kurtzman AL, Govindarajan S, Vahle K, Jones JT, Heinrichs V, Patten PA** (2001). "Advances in directed protein evolution by recursive genetic recombination: applications to therapeutic proteins". *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**: 361-370.
92. **Kyte J, Doolittle RF** (1982). "A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein". *J. Mol. Biol.* **157**: 105-132.

7. Bibliografía

93. **Laemmli UK** (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". *Nature*. **227**: 680-685.
94. **Lawson LD, Hughes BG** (1988). "Human absorption of fish oil fatty acids as triacylglycerols, free fatty acids or ethyl esters". *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **152**: 328-335.
95. **Leung DW, Chen E, Goeddel DV** (1989). "A method for random mutagenesis of a defined DNA segment using a modified polymerase chain reaction". *Technique*. **1**: 11-15.
96. **Liebeton K, Zonta A, Schimossek K, Nardini M, Lang D, Dijkstra BW, Reetz MT, Jaeger KE** (2000). "Directed evolution of an enantioselective lipase". *Chem. Biol.* **7**: 709-718.
97. **Lim GP, Calon F, Morihara T, Yang F, Teter B, Ubeda O, Salem N Jr, Frautschy SA, Cole GM** (2005). "A diet enriched with the omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid reduces amyloid burden in an aged Alzheimer mouse model". *J. Neurosci.* **25**: 3032-40.
98. **López-López A, Castellote-Bargalló AI, López-Sabater MC** (2001) "Direct determination by high-performance liquid chromatography of *sn*-2 monopalmitin alter enzymatic lipase hydrolysis". *J. Chromatogr. B.* **760**: 97-105.
99. **Ma H, Kunes S, Schatz PJ, Botstein D** (1987). "Plasmid construction by homologous recombination in yeast". *Gene*. **58**: 201-216.
100. **Lutz S, Benkovic SJ** (2000). "Homology-independent protein engineering". *Curr. Opin. Biotechnol.* **11**: 319-324.
101. **Manivasakam P, Weber SC, McElver J, Schiestl RH** (1995). "Micro-homology mediated PCR targeting in *Saccharomyces cerevisiae*". *Nucleic Acids Res.* **23**: 2799-2800.
102. **Marcato B, Cecchin G** (1996). "Analysis of mixtures containing free fatty acids and mono-, di- and triglycerides by high-performance liquid chromatography coupled with evaporative light-scattering detection". *J. Chromatogr A.* **730**: 83-

90.

103. **Martinelle M, Holmquist M, Clausen IG, Patkar S, Svendsen A, Hult K** (1996). "The role of Glu87 and Trp89 in the lid of *Humicola lanuginosa* lipase". *Protein Eng.* **9**: 519-524.
104. **Marrs B, Delagrave S, Murphy D** (1999). "Novel approaches for discovering industrial enzymes". *Curr. Opin. Microbiol.* **2**: 241-245.
105. **Miller JH** (1972). Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Press. Cold Spring Harbor, NY.
106. **Moore JC, Arnold FH** (1996). "Directed evolution of a *para*-nitrobenzyl esterase for aqueous-organic solvents". *Nat. Biotechnol.* **14**: 458-467.
107. **Morawski B, Lin Z, Cirino P, Joo H, Bandara G, Arnold FH** (2000). "Functional expression of horseradish peroxidase in *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris*". *Protein Eng.* **13**: 377-384.
108. **Morawski B, Quan S, Arnold FH** (2001). "Functional expression and characterization of horseradish peroxidase by directed evolution in *Saccharomyces cerevisiae*". *Biotechnol. Bioeng.* **76**: 99-107.
109. **Morera Pons S, Castellote Bargalló AI, López Sabater MC** (1998). "Analysis of human milk triacylglycerols by high-performance liquid chromatography with light-scattering detection". *J. Chromatogr. A.* **823**: 475-482.
110. **Mortesen A, Hansen BF, Hansen JF, Frandsen H, Barnikowska E, Andersen PS, Bertelsen LS** (1998). "Comparison of the effects of fish oil and olive oil on blood lipids and aortic atherosclerosis in Watanabe heritable hyperlipidaemic rabbits". *British J. Nut.* **8**: 565-573.
111. **Murasugi A, Asami Y, Mera-Kikuchi Y** (2001). "Production of recombinant human bile SALT-stimulated lipase in *Pichia pastoris*". *Protein Expr. Purif.* **23**: 282-288.
112. **Murphy RC, Fiedler J, Hevko J** (2001). "Analysis of non volatile lipids by mass spectrometry". *Chem. Rev.* **101**: 479-526.

7. Bibliografía

113. **Nagao T, Shimada Y, Sugihara A, Tominaga Y** (1993). “Cloning and sequencing of two chromosomal lipase genes from *Geotrichum candidum*”. *J. Biochem.* **113**: 776-780.
114. **Neylon C** (2004). “Chemical and biochemical strategies for the randomization of protein encoding DNA sequences: library construction methods for directed evolution”. *Nucleic Acids Res.* **32**: 1448-1459.
115. **Nordoy A, Marchioli R, Arneses H, Videbaek J** (2001). “n-3 Polyunsaturated fatty acids and cardiovascular diseases”. *Lipids.* **36**: S127-S129.
116. **Oh K, Willett WC, Fuchs CS, Giovannucci E** (2005). “Dietary marine n-3 fatty acids in relation to risk of distal colorectal adenoma in women”. *Cancer Epidemiol. Biomarkers.* **14**: 835-841.
117. **O’Keefe SF** (2002). “Nomenclature and classification of lipids”. En: Food Lipids: Chemistry, Nutrition and Biotechnology. Akoh CA., Min DB (eds.), Marcel Dekker Ltd, NY, pp: 1-40.
118. **Orr-Weaver TL, Szostak JW, Rothstein RJ** (1981). “Yeast transformation: a model system for the study of recombination”. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **78**: 6354-6258.
119. **Parikh MR, Matsumura I** (2005). “Site-saturation mutagénesis is more efficient than DNA shuffling for the directed evolution of beta-fucosidase from beta-galactosidase”. *J. Mol. Biol.* **352**: 621-628
120. **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: Enzymatic.* **10**: 491-508.
121. **Phillips A, Pretorius GH, van Rensburg HG** (1995). “Molecular characterization of a *Galactomyces geotrichum* lipase, another member of the cholinesterase/lipase family”. *Biochem. Biophys. Acta.* **1252**: 305-311.
122. **Ratledge C** (2004). “Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production”. *Biochemie.* **86**: 807-815.
123. **Reetz MT, Zonta A, Schimossek K, Liebeton K, Jaeger KE** (1997). “Creation

- of an enantioselective biocatalysts for organic chemistry by in vitro evolution”. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **36**: 2830-2832.
124. **Reetz MT** (2002) “Lipases as practical biocatalysts”. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **6**: 145-150.
125. **Reetz MT** (2002). “Directed evolution of selective enzymes and hybrid catalysts”. *Tetrahedron.* **58**: 6595-6602.
126. **Reetz MT, Jaeger KE** (2000). “Directed evolution of enantioselective enzymes for organic chemistry”. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **4**: 68-73.
100. **Reetz MT, Tielmann P, Eipper A, Ross A, Schlotterbeck G** (2004). “A high-throughput NMR-based ee-assay using chemical shift imaging”. *Chem. Commun.* **21**: 1366-1367.
101. **Robles Medina A, Molina Grima E, Jiménez Jiménez A, Ibáñez González MJ** (1998). “Downstream processing of algal polyunsaturated fatty acids”. *Biotechnol. Adv.* **16**: 517-580.
102. **Romanos MA, Scorer CA, Clare JJ** (1992). “Foreign gene expression in yeast: a review”. *Yeast.* **8**: 423-488
103. **Romanos MA, Scorer CA, Sreekrishna K, Clare JJ** (1998). “The generation of multicopy recombinant strains”. En: *Pichia Protocols*. Higgins DR, Cregg JM (eds.), Humana Press, Totowa, NJ, pp: 55-72.
104. **Rosu R, Iwasaki Y, Shimidzu N, Doisaki N, Yamane T** (1998). “Enzymatic synthesis of glycerides from DHA-enriched PUFA ethyl ester by glycerolysis under vacuum”. *J. Mol. Catal. B.* **4**: 191-198.
105. **Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T** (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Second edition*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
106. **Sarda L, Desnuelle P** (1958) “Action of pancreatic lipase on emulsified esters”. *Biochim. Biophys. Acta.* **30**: 513-521.
107. **Schmidt M, Bornscheuer UT** (2005). “High-throughput assays for lipases and

7. Bibliografía

- esterases". *Biomol. Eng.* **22**: 51-56.
108. **Schmidt EB, Christensen JH, Aardestrup I, Madsen T, Riahi S, Hansen VE, Skou HA** (2001). "Marine n-3 Fatty Acids: Basic features and background". *Lipids.* **36**: S65-S68.
109. **Schmidt-Dannert C, Pleiss J, Schmid RD** (1998) "A toolbox of recombinant lipases for industrial applications". *Ann. New York Acad. Sci.* **864**: 14-22.
110. **Schmitt J, Brocca S, Schmid RD, Pleis J** (2002). "Blocking the tunnel: engineering of *Candida rugosa* lipase mutants with short chain length specificity". *Protein Eng.* **15**: 595-601.
111. **Schmitt-Rozieres M, Deyris V, Comeau LC** (2000). "Enrichment of polyunsaturated fatty acids from sardine cannery effluents by enzymatic selective esterification". *JAOCS.* **77**: 329-332.
112. **Schmid RD, Verger R** (1998) "Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications". *Angew. Chem. Int. Ed.* **37**: 1608-1633.
113. **Schrag JD, Cygler M** (1993). "1.8 Å refined structure of the lipase from *Geotrichum candidum*". *J. Mol. Biol.* **230**: 575-591.
114. **Schrag JD, Li Y, Wu S, Cygler M** (1991). "Ser-His-Glu forms the catalytic site of the lipase from *Geotrichum candidum*". *Nature.* **351**: 761-764.
115. **Scorer CA, Clare JJ, McCombie WR, Romanos MA, Sreekrishna K** (1994). "Rapid selection using G418 of high copy number transformants of *Pichia pastoris* for high-level foreign gene expression". *Bio/Technology.* **12**: 181-184.
116. **Shafikhani S, Siegel RA, Ferrari E, Schellenberger V** (1997). "Generation of large libraries of random mutants in *Bacillus subtilis* by PCR-based plasmid multimerization". *Biotechniques.* **23**: 304-310.
117. **Shahidi F, Wanasundara UN** (1998). "Omega-3 fatty acid concentrates: nutritional aspects and production technologies". *Trends Food Sci. Technol.* **9**: 230-240.
118. **Shahidi F, Wanasundara PKJPD** (2002). "Extraction and analysis of lipids". En: Food Lipids: Chemistry, Nutrition and Biotechnology. Akoh CA., Min DB

(eds.), Marcel Dekker Ltd, NY, pp: 1-40.

119. **Sharma R, Chisti Y, Banerjee UC** (2001) "Production, purification, characterization, and applications of lipases". *Biotechnol Adv.* **19**: 627-662.
120. **Shimada Y, Maruyama M, Nakayama S, Sugihara A, Tominaga Y** (1995). "Selective hydrolysis of polyunsaturated fatty acid-containing oil with *Geotrichum candidum* lipase". *JAOCS.* **72**: 1577-1581.
121. **Shimada Y, Maruyama K, Okazaki S, Nakamura M, Sugihara A, Tominaga Y** (1994). "Enrichment of polyunsaturated fatty acids with *Geotrichum candidum* lipase". *JAOCS.* **71**: 951-954.
122. **Shimada Y, Sugihara A, Tominaga Y, Iizumi T, Tsunasawa S** (1989). "cDNA molecular cloning of *Geotrichum candidum* lipase". *J. Biochem.* **106**: 383-388.
123. **Shimada Y, Sugihara A, Tominaga Y** (2001). "Enzymatic purification of polyunsaturated fatty acids". *J. Biosc. Bioeng.* **91**: 529-538.
124. **Sidebottom CM, Charton E, Duna PPJ, Mycock G, Davies C, Sutton JL, Macrae AR, Slabas AR** (1991). "*Geotrichum candidum* produces several lipases with markedly different substrate specificities". *Eur. J. Biochem.* **202**: 485-491.
125. **Sieber V, Martinez CA, Arnold FH** (2001). "Libraries of hybrid proteins from distantly related sequences". *Nat. Biotechnol.* **19**:456-460.
126. **Sierra G** (1957) "A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates". *Antonie van Leeuwenhoek* **23**: 15-22.
127. **Sijtsma L, de Swaaf ME** (2004). "Biotechnological production and applications of the ω -3 polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid". *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **64**: 146-153.
128. **Simopoulos AP** (2002). "The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids". *Biomed. Pharmacother.* **56**: 365-379.
129. **Stemmer WPC** (1994). "DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: *In vitro* recombination for molecular evolution". *Proc. Natl. Acad.*

7. Bibliografía

- Sci. USA.* **91**: 10747-10751.
130. **Sugihara A, Shimada Y, Tominaga Y** (1990). "Separation and characterization of two molecular forms of *Geotrichum candidum* lipase". *J. Biochem.* **107**: 426-430.
131. **Suzuki M, Christians FC, Kim B, Skandalis A, Black ME, Loeb LA** (1996). "Tolerance of different proteins for aminoacid diversity". *Mol. Divers.* **2**: 111-118.
132. **Swers JS, Kellogg BA, Wittrup KD** (2004). "Shuffled antibody libraries created by *in vivo* homologous recombination and yeast surface display". *Nucleic Acids Res.* **32**: e36.
133. **Taguchi S, Ozaki A, Momose H** (1998). "Engineering of a Cold-Adapted protease by sequential random mutagenesis and a screening system". *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 492-495.
134. **Tanaka Y, Hirano J, Funada T** (1992). "Concentration of docosahexaenoic acid in glyceride by hydrolysis of fish oils with *Candida cylindracea* lipase". *JAACS.* **69**: 1210-1214.
135. **Terry P, Lichtenstein P, Feychting M, Ahlbom A, Wolk A** (2001). "Fatty fish consumption and risk of prostate cancer". *Lancet.* **357**: 1764-1766.
136. **Tessier DC, Cygler M** (1997). "Identification of residues for differential fatty acyl specificity of *Geotrichum candidum* lipases I and II". *Biochemistry.* **36**: 15019-15025.
137. **Thomson CA, Delaquis PJ, Mazza G** (1999). "Detection and measurement of microbial lipase activity: a review". *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **39**: 165-187.
138. **van den Burg B, de Kreijl A, Van der VEEK P, Mansfeld J, Venema G** (1998). "Engineering an enzyme to resist boiling". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**: 2056-2060.
139. **van Tildeurgh H, Egloff MP, Martinez C, Rugani N, Verger K, Cambillau C** (1993). "Interfacial activation of the lipase-procolipase complex by mixed micelles revealed by X-Ray crystallography". *Nature.* **362**: 814-820.

-
140. **Vassileva A, Chung DA, Swaminathan S, Khanna N** (2001). "Expression of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* using the *GAP* promoter". *J. Biotechnol.* **88**: 21-35.
141. **Verger R** (1997) "Interfacial activation of lipases: facts and artifacts". *Trends Biotechnol.* **15**: 32-38.
142. **Wan L, Twitchett MB, Eltis LD, Mauk AG, Smith M** (1998). "*In vitro* evolution of horse heart myoglobin to increase peroxidase activity". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**: 12825-12831.
143. **Watts R, Dils R** (1968). "Separation of triglycerides by gas-liquid chromatography". *J. Lipid Res.* **9**: 40-51.
144. **Wijendran V, Hayes KC** (2004). "Dietary n-6 and n-3 fatty acid balance and cardiovascular health". *Annu. Rev. Nutr.* **24**: 597-615.
145. **Wong DWS**, (2003) "Lipase". En: Handbook of Food Enzymology. Whitaker JR, Voragen AGJ, Wong DWS (eds.), Marcel Dekker, Inc., NY, pp: 11-20.
146. **Wong TS, Wu N, Roccatano D, Zacharias M, Schwaneberg U** (2005). "Sensible assay for laboratory evolution of hidrolases toward aromatic and heterocyclic compounds". *J. Biomol. Screen.* **10**: 246-252.
147. **Zhao H, Arnold FH** (1997). "Optimization of DNA shuffling for high fidelity recombination". *Nucleic Acids Res.* **25**: 1307-1308.
148. **Zhao H, Moore JC, Volkov AA, Arnold FH** (1999). "Methods for optimizing industrial enzymes by directed evolution". En: Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology, edn 2. Demain AL, Davies JE (eds.), ASM Press, Washington DC, pp.: 597-604.