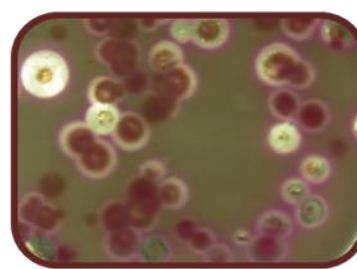
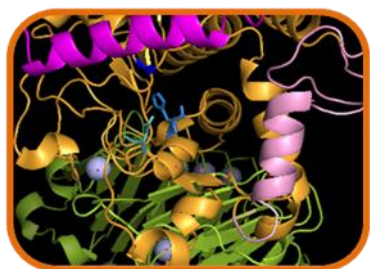


Universidad de la República
Facultad de Química - PEDECIBA Química

Evaluación y optimización de las
propiedades bioquímicas, genéticas y
moleculares de las lipasas de *Pseudomonas*
y prospección de nuevas enzimas
lipolíticas para biocatálisis



Ana Paola Panizza Scasso

Trabajo presentado para aspirar al título de

Doctor en Química

Orientadoras

Dra. Sonia Rodríguez

Dra Pilar Diaz

Universidad de la República
Facultad de Química - PEDECIBA Química

Evaluación y optimización de las
propiedades bioquímicas, genéticas y
moleculares de las lipasas de *Pseudomonas*
y prospección de nuevas enzimas
lipolíticas para biocatálisis

Ana Paola Panizza Scasso

Trabajo presentado para aspirar al título de

Doctor en Química

Miembros del tribunal

Dra. Matilde Soubes

Dra. Anita Marsaioli

Dra. Laura Franco-Fraguas

Orientadoras

Dra. Sonia Rodríguez

Dra. Pilar Diaz

Montevideo, 11 de Setiembre de 2013

A Emi, a Rodri y a Guille.

Gracias por iluminar mi vida todos los días

Agradecimientos

Este trabajo de tesis comenzó en el 2007. Casi al mismo tiempo comenzaron muchos cambios en mi vida, que me han llevado hasta donde estoy hoy. Este ha sido un viaje muy intenso pero muy hermoso. El trabajo científico de esta parte de mi vida queda plasmado hoy en esta Tesis de Doctorado. Durante su desarrollo, diversas personas han puesto su granito de arena para ayudarme a llegar hasta donde me encuentro hoy, tanto en lo personal como en lo académico. En estos párrafos quiero reconocer y agradecer sus aportes.

Quiero primero agradecer a todas las instituciones que de alguna forma han ayudado a que este trabajo de tesis pudiera ser llevado a cabo. A la Cátedra de Microbiología y al Laboratorio de Biocatálisis y Biotransformaciones de la Facultad de Química y al Departamento de Microbiología de la Universidad de Barcelona, por darme el lugar y las condiciones para que pudiera realizar el trabajo. A los organismos de financiación ANII, AECID y CSIC, dado que sin su apoyo todo hubiera quedado en una idea nomás. Al PEDECIBA Química, que entre otras cosas con su apoyo me permitió realizar pasantías y asistir a congresos muy enriquecedores.

Agradezco muy especialmente a las tres mujeres que aceptaron dedicar tiempo de sus vidas a leer este trabajo y evaluarlo: Las doctoras Anita Marsaioli, Matilde Soubes y Laura Franco-Fraguas.

Quiero agradecer también el consejo y la ayuda científica de diversas personas que me han ayudado en este trabajo. Iván Jachmanián por su ayuda con las reacciones de transesterificación e hidrólisis de ácidos grasos, y por ceder varios reactivos. A Andrés González por su apoyo con la utilización del GC-MS, y a él y Carmen Rossini por prestarme el equipo para realizar el análisis.

Pero también quiero aprovechar este breve espacio en donde puedo salir un poco de lo puramente académico, para reconocer y agradecer a todos aquellos que han pasado por mi vida en estos seis años y de alguna forma me han acompañado en este proceso.

A mis compañeros del LBB, con quien me une el interés por este campo tan multidisciplinario que es la biocatálisis, que nos tiene dando vueltas por toda la facultad. A Pilar y David, de quienes siempre he sentido un cercano apoyo. A Paulita, con quien he compartido una buena parte del camino y muchos dolores de cabeza comunes, y a su señor esposo Wilson. A Carlos, a Nacho, y a la barra “joven” del LBB: Emiliana, Facundo, Alejandra, Agustina, Larissa y Victoria. Un agradecimiento especial a mis compañeros de oficina: Luis, que en los últimos tiempos de locura antes de imprimir esta tesis me ha brindado amablemente su ayuda en más de una ocasión, y Ana, con quien compartimos estos últimos tiempos de nervios tratando de convertirnos en doctoras.

A mis compañeros del Micro, comenzando por César y Diego, que en algún momento fueron mis estudiantes y luego pasaron a ser compañeros y amigos. A toda la gente del 12 con quienes he compartido tantas conversaciones de laboratorio (académicas algunas, pero más bien de las otras). A María Inés (MIS), Analía, Rodrigo, Marianita, María Inés (MIL), Beatriz, Marcela, Valentina, Matías, Alejandra, Carolina y Mariana R. que ya se fue pero también estuvo. También a las jefas María Julia y Gianna que han sabido dar apoyo en numerosos

momentos. Y quiero dejar escrito un agradecimiento muy especial a Vicky (la tía Vicky), por su amistad, apoyo y compañerismo cuando convivimos en Barcelona.

También a muchas otras personas de la Cátedra de Micro, seguro que me olvido de alguien, pero voy a hacer un intento... A Lucía, Inés B., Adalgisa, Gastón, Laura, Silvana A., Silvana Vero, Silvana Tarlera, Anita A., Carola, Graciela, Ana F., Javier, Mauricio, Mariana U., Virginia, Claudia, Gabriela, Silvana V., Pía, y tantos otros que han estado en la Cátedra. También quiero agradecer especialmente a Matilde porque además de ser miembro del tribunal ha estado presente todos estos años brindándome su apoyo en numerosas ocasiones.

A mis compañeros del laboratorio de la UB, que en los momentos en los que estuve allá me brindaron su apoyo y ayuda. A Susana, Iulia, Oscar, Pere, Arnau, Eriel, Eric, a mis compañeros del Máster, y un agradecimiento muy especial a Cristina, que me brindó una guía invaluable en la primera parte de este trabajo. A Amanda, Belén y Mónica, que durante mi pasantía hicieron de todo por mí. Y por supuesto a Silvia, una científica excelente y una compañera aún mejor, siempre dispuesta a dar una mano en todo. No hubiera podido hacer ni la mitad de lo que hice en la pasantía sin su ayuda.

Quiero agradecer en estas líneas muy especialmente a Pilar, quien me recibió en Barcelona en el 2007 con los brazos abiertos y yo un año después le di vuelta todos los planes. Por suerte, hemos vivido muchas cosas desde ese momento, y hoy en día además de ser co-tutora de esta tesis y un gran apoyo desde el punto de vista académico, tiene un lugar en mis afectos personales como amiga.

Y por supuesto, a Sonia, quien no sólo ha sido imprescindible para que este trabajo de tesis se llevara adelante, sino que ha sido mucho más importante en mi vida personal. Gracias a su apoyo y su comprensión puedo encontrarme hoy en el lugar donde estoy. Sin dudas le debo mucho más que este doctorado, y espero que este camino siga para poder construir muchas más cosas juntas.

Quiero agradecer a mis amigos Vero, Irene, Arya, Lucía, Gonzalo, Paola, Sofía, Marcia, Denise, Majó y Saskia, por estar ahí siempre y compartir mis otras pasiones distintas de la ciencia. Y especialmente a Tami, por estar siempre dispuesta a ayudar y por ser una persona hermosa, que tengo la suerte de tener de amiga.

Por último quiero agradecer a mi familia. A mi madre, que me ha apoyado siempre. A mi padre, que aunque ya no está me ha transmitido la pasión por la investigación. A mi abuela, que siempre ha sido mi fan nº 1 en todo lo que hago. A mis numerosos hermanos de todos los tipos, María Eugenia, Lucía, Andrés y Álvaro, que ahora están multiplicados en sobrinos hermosos. A mi familia política que me ha adoptado, a Vero, a Osvaldo, a Mónica, a Diana y a Jorge, quienes también me han ayudado mucho en este camino.

Y agradezco infinitamente a mis tres hermosos hombres, que son lo más lindo que me pasó en la vida. A los dos pequeños, Rodri y Emi, porque me iluminan la vida. Y a mi esposo Guille, por ser mi apoyo y darme fuerzas para lograr las cosas que me propongo, por compartir y aliviar mis penas, y por alegrarse conmigo y festejar mis logros. Gracias a los tres por hacer mi vida cada día más feliz.

Tabla de Contenidos

Resumen	2
Introducción.....	4
Una nueva era en la Química.....	4
Biotatálisis	5
Lipasas	6
Aplicaciones de las lipasas	7
Descubrimiento y desarrollo de nuevas lipasas	9
Lipasas bacterianas.....	12
Lipasas de la subfamilia I.3	12
Objetivo general	18
Objetivos específicos	18
Capítulo 1 Desarrollo de sistemas de expresión y purificación de Lip I.3	20
Lipasa Lip I.3 de <i>Pseudomonas</i> sp CR-611	20
Extracción de Lip I.3 a partir de <i>E. coli</i> 5K (pGEMT-lipI.3)	20
Purificación de Lip I.3.....	22
Purificación por intercambio iónico	22
Purificación por afinidad.....	24
Desarrollo de sistemas de expresión de Lip I.3 en forma soluble	25
Sistema de expresión basado en <i>Pichia pastoris</i>	25
Sistema de expresión basado en <i>Pseudomonas</i>	26
Capítulo 2 Caracterización de Lip I.3	30
Análisis <i>in silico</i> de Lip I.3.....	30
Caracterización bioquímica	35
Especificidad de sustrato	35
Condiciones óptimas de reacción.....	37
Parámetros cinéticos	39
Estudio de inhibidores y activadores de Lip I.3	41
Estudio de estabilidad de Lip I.3	45

Capítulo 3 Búsqueda de nuevas lipasas mediante genotecas	49
Extracción y purificación de ADN	49
Extracción, purificación y digestión del ADN de la muestra L1	50
Extracción, purificación y digestión del ADN de la muestra L2	53
Construcción de la genoteca	55
Análisis de la genoteca	55
Análisis de los clones positivos	55
Clonado del gen identificado en PPIV 11A	58
Amplificación y clonado de la carboxipeptidasa en el plásmido pPINK α -HC	58
Capítulo 4 Aplicaciones de las nuevas lipasas	60
Liofilizado de Lip I.3	60
Aplicaciones sintéticas: Síntesis de biodiesel	61
Aplicaciones sintéticas: Esterificación del glicerol y sus derivados	63
Esterificación de glicerol	64
Esterificación de 1,3 propanodiol	64
Aplicaciones sintéticas: Análisis de la actividad de Lip I.3 en reacciones de hidrólisis	67
Capítulo 5 Modificación de las propiedades de Lip I.3 mediante mutagenesis por diseño racional	69
Mutaciones puntuales sobre el Lid1.....	71
Obtención de mutaciones por saturación	74
Variantes Y29X.....	77
Variantes F166X.....	78
Variantes W310X	79
Variantes N344X	80
Mutagénesis de Lip I.3: conclusiones y trabajo a futuro	81
Conclusiones y perspectivas	83
Metodología	88
Métodos microbiológicos	88
Cepas utilizadas	88
Mantenimiento de las cepas	88
Medios de cultivo	89
Sistema de expresión <i>PichiaPink</i> [™]	91
Métodos moleculares.....	93
Extracción de Lip I.3 y preparación del extracto crudo	93

Purificación de Lip I.3 a partir del extracto crudo	94
Extracción y liofilización de otras lipasas utilizadas.....	96
Primers.....	96
Amplificación del gen de Lip I.3 para su clonado en <i>Pichia pastoris</i>	96
Construcción de genotecas de metagenomas.....	97
Mutagénesis por Quikchange	97
Ensayos de actividad.....	99
Procedimiento general	99
Ensayos de caracterización.....	101
Ensayo de hidrólisis de derivados de MUF en papel de filtro	101
Zimograma	101
Aplicaciones sintéticas.....	102
Síntesis de biodiesel.....	102
Esterificación del glicerol y el propanodiol.....	103
Reacciones de hidrólisis.....	104
Bioinformática	105
Bibliografía.....	107

Índice de Figuras

Figura 1: Los 12 principios de la Química Verde ⁶	4
Figura 2: Reacciones catalizadas por lipasas ²¹	6
Figura 3: Ejemplos de reacciones enantioselectivas catalizadas por lipasas ¹⁶	8
Figura 4: Modelos tridimensionales de las estructuras cerrada (a) y abierta (b) de PML de <i>Pseudomonas</i> sp. MIS38. ^{133,138} Naranja: dominio N-terminal; verde: dominio C-terminal; violeta: Lid 1; rosado: Lid 2. En tonos de azul se muestran los aminoácidos del sitio activo S ²⁰⁷ , D ²⁵⁵ y H ³¹⁰ y como esferas celestes los átomos de calcio.....	14
Figura 5: Esquema general de un sistema de secreción de tipo I. El sistema se ensambla una vez que es reconocida la señal de secreción C-terminal de la proteína a exportar. ¹⁵⁵	16
Figura 6: Intermediario 1: metil éster del ácido <i>trans</i> -3-(4-metoxifenil) glicídico ((±) MPGM, <i>trans</i> -3-(4-methoxyphenyl)glycidic acid methyl ester).....	17
Figura 7: Extracción de Lip I.3 utilizando el <i>Método 1</i> a) Extracción a partir de <i>E. coli</i> 5K (pGEMT-Lip I.3) b) Control negativo (Extracción a partir de la cepa huésped). Ex: extractos celulares; RC: restos celulares particulados; C+: control positivo, Lip A de <i>Pseudomonas</i> sp. 42A2; ¹⁷³ PM: Escalera de peso molecular (se indican a la derecha de los geles los PM de las proteínas de referencia en kDa)	21
Figura 8: Extracción de proteínas de <i>E. coli</i> 5K (pGEMT-Lip I.3) utilizando urea a) Extracción usando distintas concentraciones de urea: actividad de las fracciones. Se indica en cada caso la concentración de urea utilizada (1 M– 8 M) b) Extracción utilizando urea 2M c) Extracción por el método de Kojima y purificación por intercambio iónico. Ex: extractos celulares; RC: restos celulares particulados; C-: control negativo (<i>E. coli</i> 5K); C+: control positivo (Extracción por el Método 1); EK: extracto crudo obtenido por el método de Kojima; PM: Escalera de peso molecular (se indican a la derecha de los geles los PM de las proteínas de referencia en kDa)	22
Figura 9: Purificación mediante intercambio iónico del extracto crudo producido mediante el método de Kojima. Separación por SDS-PAGE revelado mediante a) zimograma, b) tinción con azul de coomasie. EK: extracto crudo obtenido por el método de Kojima; F15-F21: Fracciones obtenidas en la purificación por intercambio aniónico, condición 2; PM: Escalera de peso molecular (se indican a la derecha los PM de las proteínas en kDa)	23
Figura 10: Actividad lipasa en el sobrenadante durante la inmovilización de Lip 3.I en el soporte EP100. La disminución en la actividad es un reflejo de la adsorción de la lipasa al soporte.....	24

Figura 11: Purificación de Lip I.3 por afinidad mediante adsorción al soporte EP100. 1) Enzima purificada usando buffer acetato 50 mM con CaCl ₂ 10 mM y Tritón X-100® al 0,5 %; 2) Enzima purificada usando agua con Tritón X-100® al 0,5 %; EK: extracto crudo obtenido por el método de Kojima; PM: Escalera de peso molecular (se indican a la derecha los PM de las proteínas).....	24
Figura 12: Esquema del vector recombinante pPINKαHC-Lip I.3.....	25
Figura 13: Esquema del vector recombinante tipo “lanzadera” pBBR1MCS-Lip I.3.....	27
Figura 14: a) La cepa <i>Ps. aeruginosa</i> PAO1 Δ <i>lipH</i> (pBBR1MCS-Lip I.3) forma halos de hidrólisis en medio agar tributirina con trioctanoil glicerol, a diferencia de la misma cepa con el plásmido pBBR1MCS; b) Diferencia de actividad sobre MUF heptanoato entre los sobrenadantes de la cepa <i>Ps. aeruginosa</i> PAO1 Δ <i>lipH</i> (pBBR1MCS-Lip I.3) y la cepa control	28
Figura 15: Dominios conservados encontrados en Lip I.3. La región COG2931 corresponde a un motivo de unión a calcio conservado en peptidasas y toxinas RTX ¹⁵⁵	30
Figura 16: Modelos tridimensionales de las estructuras cerrada (a) y abierta (b) de Lip I.3. Los modelos se construyeron por comparación con la lipasa PML de <i>Pseudomonas</i> sp. MIS38, estructuras cerrada (2z8x) y abierta(2zvd) respectivamente. Naranja: dominio N-terminal; verde: dominio C-terminal; violeta: Lid 1; rosado: Lid 2. En tonos de azul se muestran los aminoácidos del sitio activo S ²⁰⁷ , D ²⁵⁵ y H ³¹⁰ y como esferas celestes los átomos de calcio ...	32
Figura 17: Modelos tridimensionales de las estructuras cerrada (a) y abierta (b) de Lip I.3 mostrando el dominio C-terminal en β-roll sandwich. Los modelos se construyeron por comparación con la lipasa PML de <i>Pseudomonas</i> sp. MIS38, estructuras cerrada (2z8x) y abierta (2zvd), respectivamente. Naranja: dominio N-terminal; verde: dominio C-terminal; violeta: Lid 1; rosado: Lid 2. En tonos de azul se muestran los aminoácidos del sitio activo S ²⁰⁷ , D ²⁵⁵ y H ³¹⁰ y como esferas celestes los átomos de calcio	33
Figura 18: Sitio de unión a Ca1 en a) PML b) Lip I.3. Se muestra la ausencia de Ca1 en el modelo de Lip I.3. Naranja: dominio N-terminal; violeta: Lid 1. Para los aminoácidos que unen Ca1 los colores indican los distintos elementos. C: verde en a)Thr118 b) Ser 118; cian en el resto; O: rojo, N: azul El átomo de calcio en a) se muestra como una esfera de puntos para facilitar la visualización.	34
Figura 19: Porcentaje de actividad de Lip I.3 en función del sustrato para los derivados de pNP. El 100 % corresponde al sustrato para el cual Lip I.3 presenta máxima actividad. En la gráfica los derivados se indican por el número de átomos de C.	35
Figura 20: Porcentaje de actividad de Lip I.3 en función del sustrato para los derivados de MUF. El 100 % corresponde al sustrato para el cual Lip I.3 presenta máxima actividad. En la gráfica los derivados de MUF se indican por el número de átomos de C.	36

Figura 21: Actividad de Lip I.3 en función del pH. El 100 % corresponde al punto de máxima actividad.....	37
Figura 22: Porcentaje de actividad de Lip I.3 en función de la temperatura. El 100 % corresponde al punto de máxima actividad.	37
Figura 23: Actividad de Lip I.3 en función de la concentración de Ca ⁺⁺ . Se indica la actividad relativa respecto a la obtenida en ausencia de Ca ⁺⁺	39
Figura 24: Velocidad inicial en función de la concentración de sustrato.	40
Figura 25: Diagrama de Lineweaver-Burk para Lip I.3	40
Figura 26: Porcentaje de actividad de Lip I.3 en función de la concentración de urea. El 100 % corresponde a la actividad de la enzima en ausencia de urea.	41
Figura 27: Actividad de la lipasa Lip I.3 en función de la concentración de Tritón X-100® El 100 % corresponde a la actividad de la enzima en ausencia de Tritón X-100®.....	42
Figura 28: Actividad de Lip I.3 en función de la concentración de SDS El 100 % corresponde a la actividad de la enzima en ausencia de SDS.....	43
Figura 29: Actividad de Lip I.3 en función de la concentración de PMSF. IF: incremento de fluorescencia.....	43
Figura 30: Efecto de la presencia de diversos compuestos sobre la actividad de Lip I.3. El 100 % corresponde a la actividad de la enzima en ausencia de las sales indicadas	44
Figura 31: Actividad en función de la temperatura de pre-incubación. El 100 % corresponde a la actividad de la enzima antes de la pre-incubación.	45
Figura 32: Estabilidad de Lip I.3 frente al almacenamiento a largo plazo. El 100 % corresponde a la actividad del día 0. Sin tritón X-100®: La enzima se almacenó en buffer Tris 20 mM pH 7; Con tritón X-100®: La enzima se almacenó en buffer Tris 20 mM pH 7 con Tritón X-100® a dos concentraciones, 0,2 y 0,5 %.	46
Figura 33: Actividad en función del pH de pre-incubación durante 1 hora. El 100 % corresponde a la actividad de la enzima antes de la pre-incubación.	47
Figura 34: Sitios de recolección de muestras para extracción de ADN metagenómico. En b se pueden ver los dos sitios. a y c) detalle de la zona en donde se tomó la muestra de ambiente contaminado (L1); d) detalle de la zona donde se tomó la muestra de ambiente libre de contaminación (L2).	49
Figura 35: Evidencia de la presencia de inhibidores de la digestión en las muestras de ADN metagenómico. a) Digestión de ADN metagenómico con distintas concentraciones de <i>BfuC</i> I; b) Controles de la digestión. 1: pET22b+ digerido con <i>BfuC</i> I; 2: digestión de pET22b+ con <i>BfuC</i> I en presencia de ADN metagenómico; 3: pET22b+ sin digerir	50

Figura 36: Comparación de métodos de purificación del ADN metagenómico. a) ADN recuperado luego de la purificación b) Análisis de la presencia de inhibidores de la digestión mediante digestión de pET22b+ en presencia de las muestras de ADN. A: ADN metagenómico sin purificar (muestra de partida); M1: método 1; s: sobrenadante; p: precipitado; M2: método 2; M3: método 3; c: concentrado; f: filtrado; C+: digestión de pET22b+; PM: escalera de peso molecular (GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, Fermentas).....	52
Figura 37: a y b) Optimización de la digestión con <i>BfuC</i> I. Se indica en cada caso la concentración de enzima utilizada. c) Digestión a mayor escala de la muestra purificada de ADN metagenómico con <i>BfuC</i> I (ADN 26 ng/μL, enzima 80 mU/μL, 37 °C, 1hr). d) Segunda digestión del ADN metagenómico. Se agregaron 40 mU/μL de <i>BfuC</i> I y se incubó a 37 °C por 1hr. PM: escalera de peso molecular (GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, Fermentas)	52
Figura 38: a) Muestras de ADN metagenómico extraídas del lodo proveniente de L2 b) Digestión de las mismas muestras de ADN metagenómico con <i>BfuC</i> I. Los números sobre las filas corresponden a distintas fracciones de la misma muestra. PM: Marcador de peso molecular. Se indica el peso molecular en Kpb de las bandas más importantes	53
Figura 39: a) Análisis de la presencia de inhibidores de la digestión en las muestras de ADN purificadas. Para los métodos 1 a 4 se analizó la digestión de pUC19 con <i>BfuC</i> I en presencia de la muestra. Para el método 5 se analizó la digestión directa de la muestra con <i>BfuC</i> I. A: ADN metagenómico sin purificar (muestra de partida); M3: método 3; M4: método 4; M5: método 5; C+: digestión de pUC19 con <i>BfuC</i> I; PM: escalera de peso molecular (GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, Fermentas).....	54
Figura 40: Construcción y análisis de la genoteca metagenómica	55
Figura 41: Inserto presente en el plásmido PPIV11A.....	56
Figura 42: Inserto presente en el plásmido PPIV11B.....	57
Figura 43: Inserto presente en el plásmido PPIV15A.....	57
Figura 44: Esquema del vector pPINKαHC-CP.....	58
Figura 45: Análisis cualitativo de la actividad de Lip I.3 liofilizada.....	61
Figura 46: Cromatogramas de GC de los productos de esterificación del 1,3 propanodiol con acetato de vinilo utilizando distintas enzimas. MA: producto monoacilado; DA: producto diacilado (determinados mediante GC-MS).....	64
Figura 47: Cromatogramas de GC de los productos de esterificación del 1,3 propanodiol con propionato de vinilo utilizando distintas enzimas. MA: producto monoacilado; DA: producto diacilado (determinados mediante GC-MS).....	65
Figura 48: Cromatogramas de GC de los productos de esterificación del 1,3 propanodiol con butirato de vinilo utilizando distintas enzimas. MA: producto monoacilado; DA: producto diacilado (determinados mediante GC-MS).....	66

Figura 49: Sustratos utilizados para analizar la actividad de Lip I.3.....	67
Figura 50: Ésteres derivados de p-nitrofenol (5) y 4-metil umbeliferona (6)	67
Figura 51: Secuencias comparadas del Lid1 para Lip I.3, PML y SML	69
Figura 52: Modelo estructural de Lip I.3. Se muestran en tonos de azul los aminoácidos del sitio catalítico (Ser207, Asp255, His313), y en amarillo los residuos que forman el hueco del oxianión (Thr143 y Leu 208). El Lid1 se muestra en violeta. Los aminoácidos seleccionados para las mutaciones se muestran en rojo (Tyr29), naranja (Trp310), verde oscuro (Phe166) y verde claro (Asn 344). Los átomos de calcio aparecen en celeste.	70
Figura 53: Actividad hidrolítica en los sobrenadantes de cultivo para los diferentes mutantes obtenidos. El 100 % corresponde a la actividad de Lip I.3 wt sobre su sustrato óptimo, MUF heptanoato. MUF H: MUF heptanoato, MUF O: MUF oleato.....	71
Figura 54: Lid1 en las estructura cerrada (a y b) y abierta (b y d) de Lip I.3 wt (a y b) y Lip I.3 G152L (c y d). Se muestra G152 en rojo, L152 en verde y el resto de los aminoácidos del Lid1 en violeta.	72
Figura 55: Detalle de las posiciones 149 y 152 en a) Lip I.3 G152L y b) Lip I.3 I149N/G152L. Se muestra L152 en verde, I149 en naranja, N149 en amarillo y el resto de los aminoácidos del Lid1 en violeta.....	73
Figura 56: Detalle de la estructura de Lip I.3 wt (a) y Lip I.3 S154T (b) mostrando el sitio mutado y algunos aminoácidos cercanos. Los colores indican los distintos elementos. C: verde, O: rojo, N: azul.	73
Figura 57: Velocidad inicial en función de la concentración de sustrato para los mutantes puntuales de Lip I.3 en el Lid1. Las variantes con mayor actividad fueron diluidas para facilitar los ensayos, por lo que las concentraciones de enzima no son equivalentes.....	74
Figura 58: Ejemplo de análisis en placa para detectar la actividad de las variantes obtenidas para las mutaciones generadas por saturación. TC8: Agar tributirina base con trioctanoil glicerol, AO: Agar tributirina base con aceite de oliva. Ambos medios contienen rodamina como indicador de actividad.....	75
Figura 59: a) Superposición de las estructuras de Lip I.3 wt con las mutantes Y29C e Y29 T. Abajo: Detalle de las distancias en Å entre el oxígeno de la serina catalítica y el átomo más cercano del aminoácido en la posición 29 para b) Lip I.3 wt, c) Lip I.3 Y29C y d) Lip I.3 Y29T. Se muestran tonos de azul los aminoácidos de la tríada catalítica. En rojo se indica el aminoácido Y29 mientras que los cambios efectuados se pueden ver en verde (C29) y en amarillo (T29).....	78

Figura 60: a) Superposición de las estructuras de Lip I.3 wt con las mutantes W310 M, W310F y W310 Q. Abajo: Detalle de las distancias en Å entre el oxígeno de la serina catalítica y el átomo más cercano del aminoácido en la posición 310 para b) Lip I.3 wt, c) Lip I.3 W310 Q, d) Lip I.3 W310F y e) Lip I.3 W310M. Se muestran tonos de azul los aminoácidos de la tríada catalítica. En rojo se indica el aminoácido W310 mientras que los cambios efectuados se pueden ver en verde (Q310), en rosado (F310) y en amarillo (M310).	79
Figura 61: Superposición de las estructuras de Lip I.3 wt con la mutante N344R. a) Estructura cerrada b) Estructura abierta, c y d) Detalle de las estructuras mostradas en a y b. Tonos de azul: aminoácidos de la tríada catalítica, rojo: N344, verde: R344, violeta: Lid1, rosado: Lid 2.	80
Figura 62: Ciclo de PCR utilizado para amplificar las muestras de ADN genómico provenientes de los clones de <i>Pichia pastoris</i>	92
Figura 63: Ciclo de PCR utilizado para amplificar el gen de Lip I.3	96
Figura 64: Ciclo de PCR utilizado para introducir mutaciones por Quikchange®	98
Figura 65: Reacciones de hidrólisis de los sustratos modelo. Para los derivados de pNP n = 2 (butirato), 3 (valerato), 6 (caprilato), 8 (caprato), 10 (laurato), 14 (palmitato) o 16 (estearato). Para los derivados de MUF n = 2 (butirato), 5 (heptanoato) o 16 (estearato). También se utilizó MUF oleato (no incluido en la figura).	99
Figura 66: Sustratos utilizados para analizar la actividad de Lip I.3.....	104

Índice de tablas

Tabla 1: Condiciones para la purificación de Lip I.3 por intercambio iónico	22
Tabla 2: Proteínas que presentan mayor homología con Lip I.3 (NP: no publicado)	31
Tabla 3: Métodos utilizados para la purificación del ADN metagenómico para L1.....	51
Tabla 4: Métodos utilizados para la purificación del ADN metagenómico para L2.....	54
Tabla 5: Plásmidos enviados a secuenciar	55
Tabla 6: Condiciones para los ensayos de síntesis de biodiesel	62
Tabla 7: Condiciones de esterificación del glicerol y sus derivados	63
Tabla 8: Resultados obtenidos para la hidrólisis de los sustratos 1 a 4 con Lip I.3	67
Tabla 9: Aminoácidos codificados por las distintas posibilidades presentes en el codón degenerado NNK, situado en la posición correspondiente al aminoácido a modificar en la secuencia de Lip I.3. ²¹¹	75
Tabla 10: Resultados de actividad sobre MUF oleato de los mutantes obtenidos por saturación	76
Tabla 11: Clones que presentaron mayor actividad.	77
Tabla 12: Cepas utilizadas	88
Tabla 13: Condiciones de PCR analizadas para la amplificación del gen <i>Lip</i> I.3 a partir de muestras de ADN provenientes de los clones de <i>P. pastoris</i> . Se muestran también los controles positivos utilizados.....	92
Tabla 14: Programa IEX PP para intercambio iónico y las variables que lo definen	95
Tabla 15: Tampones utilizados para la cromatografía de intercambio iónico.....	95
Tabla 16: Lista de primers utilizados.....	96
Tabla 17: Primers utilizados para la introducción de mutaciones por Quickchange.....	98
Tabla 18: Condiciones utilizadas para la medida de fluorescencia.....	100
Tabla 19: Ajustes realizados para los ensayos de caracterización.....	101
Tabla 20: Condiciones para los ensayos de síntesis de biodiesel	102
Tabla 21: Programas de temperatura para GC utilizados en el análisis de las reacciones de síntesis de biodiesel y esterificación de glicerol y 1,3-propanodiol	103

Tabla 22: Condiciones para los ensayos de esterificación	103
Tabla 23: Condiciones de GC para el análisis de las reacciones de hidrólisis	104

Resumen

Resumen

Las lipasas (triacilglicerol hidrolasas, EC 3.1.1.-) son una importante clase de enzimas con un gran número de aplicaciones en biotecnología. Sin embargo, la mayoría de las aplicaciones descritas se centran en las lipasas disponibles comercialmente, las cuales no siempre son capaces de cumplir con los requisitos de los procesos industriales. Existe una gran biodiversidad inexplorada, fuente potencial de enzimas con actividad novedosa. Por ello, se hace necesaria la exploración y la explotación de dicho potencial para el desarrollo de nuevos bioprocesos. Además, el avance en las técnicas de ingeniería genética permite modificar las nuevas enzimas de acuerdo a las necesidades biocatalíticas, ampliando aún más las posibilidades para nuevos desarrollos. Este trabajo se centra en la exploración de nuevas lipasas, y en la caracterización de enzimas lipolíticas que divergen de las que han sido más extensamente estudiadas.

La lipasa Lip I.3 fue aislada mediante métodos moleculares de una cepa proveniente del suelo de un bosque subtropical de Puerto Iguazú, Argentina, y se encuentra relacionada con cepas de *Pseudomonas fluorescens*. Esta enzima pertenece a la subfamilia I.3 de lipasas bacterianas, grupo que ha sido poco explorado en biocatálisis, y que difiere de otros grupos más estudiados tanto en su secuencia como en su actividad catalítica. En el presente trabajo se realizó el modelado y la caracterización de esta lipasa, aportando conocimiento sobre las características de la subfamilia I.3. La producción de Lip I.3 fue optimizada mediante el diseño y desarrollo de diversos sistemas de expresión en bacterias y levaduras. Además, se aplicaron técnicas de ingeniería genética para mejorar sus propiedades y establecer relaciones entre la estructura y la actividad de las lipasas de la subfamilia I.3. Un logro importante en esta área fue el desarrollo de variantes modificadas de la enzima con mayor actividad biocatalítica, y con mejoras sustanciales en la actividad sobre sustratos de cadena larga.

Paralelamente, se exploró la diversidad presente en dos ambientes distintos, uno altamente contaminado y otro libre de contaminación, en busca de nuevas enzimas lipolíticas. Mediante técnicas de metagenómica fue posible acceder a parte de la diversidad no cultivable presente en dichos ambientes. Se encontró una enzima con posible actividad lipolítica, para la cual se desarrolló un sistema de expresión heteróloga.

Se analizó la utilidad de la lipasa Lip I.3 y otras lipasas aisladas por nuestro grupo de trabajo en la síntesis de biodiesel y en la valorización de su principal subproducto, el glicerol. También se estudió la aplicación de Lip I.3 a la hidrólisis de una serie de ésteres, comparando los resultados con los reportados para enzimas disponibles comercialmente.

El trabajo desarrollado en esta tesis permitió aumentar el conocimiento en el área de las lipasas, especialmente dentro de la subfamilia I.3. La información obtenida significa un avance en el conocimiento de la relación estructura - actividad dentro de esta subfamilia, posibilitando en el futuro una mayor racionalidad en el desarrollo de nuevas variantes. En conjunto, este trabajo aporta al avance del área de la biocatálisis mediada por lipasas, y abre nuevas puertas hacia el desarrollo de metodologías productivas amigables con el medio ambiente.

Introducción

Introducción

Una nueva era en la Química

La evolución de la civilización ha generado un aumento en la demanda de compuestos obtenidos mediante transformaciones químicas. Estos compuestos se han vuelto necesarios, contribuyendo al bienestar de la raza humana. Pero estamos pagando un alto precio por nuestro bienestar: la síntesis de estos compuestos ha contribuido al deterioro del medio ambiente y a la generación de productos tóxicos de desecho.¹⁻² Como respuesta a una inquietud creciente frente al deterioro ambiental y a la sustentabilidad de nuestro modo de vida, los organismos legislativos han implementado un marco legal cada vez más restrictivo,³⁻⁵ que obliga al desarrollo de nuevos procesos industriales más amigables con el medio ambiente. En 1988 Anastas y Warner⁶ plantearon la necesidad de implementar la Química Verde, consistente en el diseño de productos y procesos químicos que reduzcan o eliminen el uso y la generación de sustancias peligrosas. Como una guía para su aplicación, establecieron los 12 principios de la Química Verde (Figura 1). La utilización de métodos biocatalíticos para la síntesis de compuestos químicos está en concordancia con dichos principios, contribuyendo favorablemente al desarrollo sustentable.²



Figura 1: Los 12 principios de la Química Verde⁶

Biocatálisis

Los métodos biocatalíticos utilizan enzimas para llevar a cabo reacciones químicas. Las enzimas son muy buenos catalizadores, alcanzando en algunos casos niveles de eficiencia imposibles de lograr con catalizadores químicos.³ Debido a su constitución proteica las enzimas son rápidamente degradadas en el medio ambiente, lo que no ocurre con muchos de los reactivos utilizados en los procesos químicos tradicionales. Además, las reacciones biocatalizadas pueden llevarse a cabo a temperatura ambiente y presión atmosférica, lo que está en concordancia con el Principio 6 de la Química Verde, a la vez que se evitan problemas de inestabilidad de los sustratos y reactivos.

Las enzimas y otras proteínas regulan la actividad de los sistemas vivos. Diversos compuestos químicos bioactivos, como medicamentos y agrotóxicos, tienen su blanco de acción en estas proteínas. Al ser moléculas quirales, formadas únicamente por L-aminoácidos, las enzimas son capaces de reconocer de forma diferencial a los enantiómeros de una mezcla racémica, por lo que dichos enantiómeros tendrán actividades distintas. En reconocimiento de esta propiedad, la FDA (*Food and Drug Administration*, EEUU) y otros organismos reguladores han impuesto restricciones al registro de nuevos medicamentos racémicos,⁷⁻⁹ promoviendo los medicamentos enantioméricamente puros, y obligando al desarrollo de procesos que involucren la síntesis quiral de dichos compuestos. Como catalizadores, las enzimas pueden aportar en gran medida al diseño de estos procesos, dado que al ser moléculas quirales las reacciones catalizadas por ellas son comúnmente estereoselectivas. Además presentan otros tipos de selectividad: son capaces de promover reacciones en sitios no activados de los sustratos, dando lugar a productos imposibles de conseguir por métodos químicos; y pueden distinguir entre dos sitios químicamente similares del sustrato catalizando la reacción de uno sólo de éstos, lo que da como resultado reacciones regioselectivas.³

Las ventajas mencionadas demuestran la concordancia de la biocatálisis con los principios de la Química Verde (Figura 1) y la relevancia de las enzimas como catalizadores sumamente poderosos y convenientes para el rumbo actual de la química sintética.

Sin embargo, al utilizar métodos biocatalíticos en síntesis orgánica se presentan también varios inconvenientes. Los estrechos parámetros de operación no permiten cambios de temperatura o pH, necesarios para algunas reacciones. El medio de reacción más adecuado para muchas reacciones biocatalíticas es el agua, que resulta generalmente un mal solvente para los compuestos orgánicos. En algunos casos se han efectuado reacciones con enzimas¹⁰ o microorganismos^{5,11} en solventes orgánicos, pero esto conduce muchas veces a una pérdida de actividad del biocatalizador, y no es aplicable a todas las reacciones enzimáticas.³ Sin embargo se han obtenido resultados prometedores utilizando solventes “verdes” como los líquidos iónicos o DES (*deep eutectic solvents*).¹²⁻¹⁴

Si bien las aplicaciones comerciales de la biocatálisis han aumentado,¹⁵ para poder aprovechar al máximo el potencial que nos ofrecen los biocatalizadores es necesario profundizar en el conocimiento tanto a nivel del descubrimiento y desarrollo de nuevos biocatalizadores, como en el desarrollo de nuevos bioprocesos.²

Lipasas

Las lipasas (triacilglicerol hidrolasas, EC 3.1.1.-) son una importante clase de enzimas con un gran número de aplicaciones en biotecnología.^{3,16-17} Sus sustratos naturales son los triacilgliceroles de cadena larga. En condiciones acuosas, las lipasas catalizan la hidrólisis del enlace éster entre los ácidos grasos y el glicerol. Esta reacción presenta gran importancia para la transformación y la utilización de los lípidos en el metabolismo de los organismos vivos, por lo que las lipasas se encuentran ampliamente distribuidas entre los seres vivos, incluyendo plantas, animales y microorganismos.¹⁸

Más allá de su relevancia desde el punto de vista biológico, las lipasas han atraído la atención debido a su amplia aplicación en procesos biotecnológicos.^{16,19-20} Este gran potencial biotecnológico se debe a varios factores. En las condiciones adecuadas las lipasas son capaces de catalizar reacciones distintas a la hidrólisis, como la síntesis de ésteres y la transesterificación. Las lipasas son capaces de mostrar promiscuidad biocatalítica, no sólo aceptando sustratos distintos a los naturales²¹ (Figura 2), sino también catalizando reacciones muy distintas a su actividad natural.²²⁻²³ Numerosas lipasas presentan alta quimio-, regio- y estereoselectividad, lo que las hace valiosas herramientas como catalizadores para procesos de síntesis orgánica. Además algunas de ellas son estables en solventes orgánicos, lo que facilita la disolución de los sustratos y la recuperación de los productos de reacción. Las lipasas no requieren de cofactores para su actividad, y en muchos casos pueden obtenerse en grandes cantidades por procedimientos accesibles, pudiendo incluso utilizarse para algunas aplicaciones los extractos crudos o preparaciones enzimáticas con niveles bajos de purificación.²⁴⁻²⁷ Estos dos factores disminuyen los costos de las reacciones catalizadas por lipasas, haciéndolas económicamente viables.

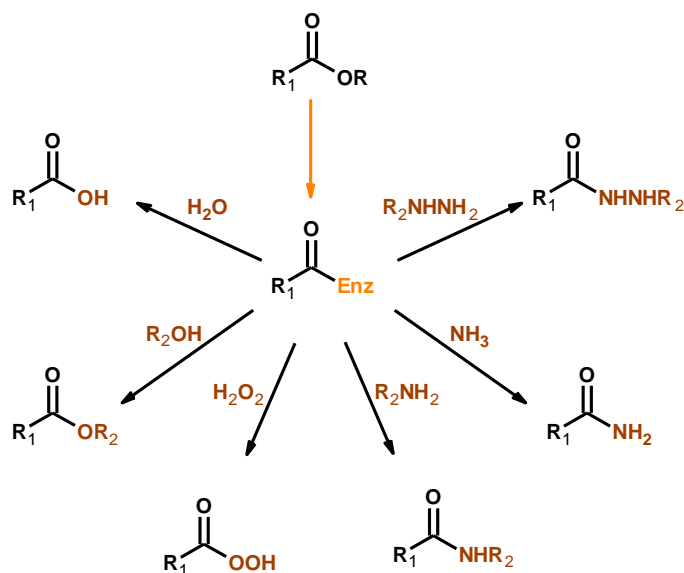


Figura 2: Reacciones catalizadas por lipasas²¹

Aplicaciones de las lipasas

Las ventajas de las lipasas como catalizadores se ven reflejadas en el gran volumen de artículos originales y revisiones que existen sobre el tema, lo que se potencia debido a que se encuentran disponibles comercialmente un gran número lipasas. Estas enzimas han encontrado numerosas aplicaciones a nivel industrial²⁸⁻³¹ y en síntesis orgánica.^{3,16,18,21-23,29,32-38}

La aplicación más importante a nivel industrial de las lipasas, basada en los volúmenes de venta, se encuentra en la formulación de detergentes, donde se aplican como coadyuvantes del lavado para la eliminación de manchas de grasas.^{29,39} La industria alimentaria también utiliza lipasas, tanto para mejorar las propiedades organolépticas, nutritivas y tecnológicas de los triglicéridos mediante transesterificación, como para la producción de aromas en productos lácteos o cárnicos por hidrólisis de triglicéridos.^{29,39} En la industria papelería los compuestos hidrofóbicos de la madera, denominados en su conjunto *pitch* y formados principalmente por triglicéridos y ceras, representan un problema para la elaboración del papel. Se ha desarrollado un proceso biotecnológico para la eliminación del *pitch* que utiliza lipasas para la hidrólisis de sus componentes.^{16,29}

Las lipasas han sido ampliamente estudiadas como catalizadores para la preparación de intermediarios quirales en síntesis orgánica,^{3-4,16,21,23,29,32,35-37,40-41} y constituyen el grupo de enzimas más estudiado en biocatálisis.^{3,23} Además de catalizar la reacción de alcoholes y ésteres quirales o proquirales, sus posibles sustratos incluyen dioles, α - y β -hidroxiácidos, cianohidrininas, clorohidrininas, diésteres, lactonas, aminas, diaminas, amino alcoholes y derivados de α - y β -aminoácidos (Figura 3). Las clases más importantes de bloques quirales para síntesis orgánica pueden ser obtenidos por este método,¹⁶ por lo que las lipasas constituyen una herramienta de gran valor en síntesis orgánica y química fina.

Además de su aplicación en síntesis quiral, un área de aplicación promisoría para las lipasas es la industria del biodiesel.⁴² Este biocombustible proveniente de fuentes renovables presenta ventajas sobre los combustibles fósiles que han sido ampliamente reconocidas.⁴³⁻⁴⁸ El biodiesel está compuesto por ésteres de ácidos grasos y un alcohol de cadena corta como metanol o etanol. Se sintetiza a partir de triglicéridos de distinto origen, mediante transesterificación con los alcoholes mencionados, por lo que se obtiene como principal subproducto el glicerol (aproximadamente un 10% de la masa total de productos).⁴⁹⁻⁵⁰ La comercialización de este subproducto fue en un principio un factor positivo en la economía de la síntesis de biodiesel, pero el aumento en los niveles de producción ha llevado a una saturación de mercado, y hoy en día su valor ha disminuido considerablemente.⁵¹⁻⁵³

Actualmente, el proceso más utilizado para la síntesis de biodiesel es la catálisis química homogénea, utilizando bases como NaOH o KOH, o ácidos como H₂SO₄ como catalizadores.⁵⁴ Este método resulta eficiente, pero presenta inconvenientes y no es amigable con el medio ambiente debido a la cantidad y calidad de sus efluentes. La catálisis enzimática presenta claras ventajas sobre el método químico,^{42,55-56} y representa una alternativa de creciente interés para conducir este proceso.^{46,48,54,57-62} Sin embargo actualmente a nivel comercial sólo existe un ejemplo de aplicación a escala piloto⁶²⁻⁶³ Se requiere aún del descubrimiento y desarrollo de nuevos biocatalizadores, así como de la optimización de los

bioprocesos ya existentes, para poder cumplir con los requerimientos industriales y dotar de competitividad a los nuevos sistemas de síntesis enzimática.⁴²

El glicerol obtenido en el proceso puede comercializarse, pero como se mencionó anteriormente, el aumento en los niveles de producción de biodiesel por métodos químicos a nivel mundial ha llevado a una saturación del mercado de este subproducto. El glicerol puede utilizarse como punto de partida para la síntesis de moléculas con alto valor agregado o que pueden servir de intermediarios de síntesis.⁶⁴⁻⁶⁶ Los ésteres del glicerol han sido utilizados como emulsionantes en la industria alimentaria, en cosméticos y en la industria farmacéutica⁶⁷⁻⁶⁸. Se han explorado también los ésteres de diglicerol, así como polímeros del glicerol de distinto tamaño y grado de ramificación. Se ha propuesto la utilización de ésteres de oligoglicerol como antiempañantes,⁶⁹ como agentes anti estática, como lubricantes en la industria alimenticia, y como tensoactivos.⁶⁸⁻⁶⁹ La esterificación del glicerol y sus derivados utilizando lipasas representa una alternativa válida para la valorización de este subproducto⁷⁰⁻⁷⁷ y la consecuente mejora del balance económico del proceso. Además, el glicerol obtenido mediante síntesis enzimática de biodiesel presenta mejor calidad que el obtenido mediante síntesis química, por lo que la aplicación de lipasas en este proceso puede realizar aportes favorables desde numerosos puntos de vista.

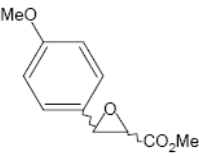
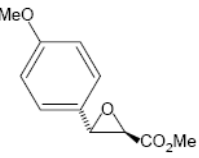
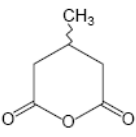
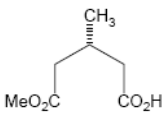
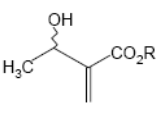
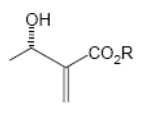
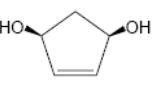
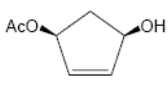
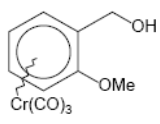
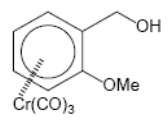
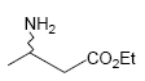
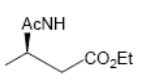
Sustrato	Microorganismo de origen	Producto	Rendimiento	% ee
	<i>Serratia marcescens</i>		45%	>98%
	<i>Pseudomonas</i> sp.		92%	87%
	<i>Pseudomonas</i> sp.		41%	>95%
	<i>Candida antarctica</i>		48%	>99%
	<i>Pseudomonas</i> sp.		47%	97%
	<i>Candida antarctica</i>		38%	95%

Figura 3: Ejemplos de reacciones enantioselectivas catalizadas por lipasas¹⁶

Descubrimiento y desarrollo de nuevas lipasas

Las lipasas han demostrado tener un gran potencial para la resolución de algunos de los problemas actuales de la síntesis química. Sin embargo, las enzimas disponibles actualmente no siempre cumplen con las características adecuadas para el desarrollo de su aplicación industrial. Es por esto que la búsqueda de nuevas enzimas cobra una gran importancia en el desarrollo de nuevas aplicaciones biocatalíticas y la mejora de los procesos existentes.

Las lipasas más utilizadas a nivel industrial provienen de microorganismos, por lo que éstos constituyen una invaluable fuente de enzimas para biocatálisis. Sin embargo, sólo una pequeña parte de la biodiversidad microbiana presente en nuestro mundo ha podido ser cultivada.⁷⁸ Muchos de estos microorganismos están adaptados a vivir en condiciones que se adecúan a los requerimientos industriales para los procesos químicos, como temperaturas y pH extremos o altas presiones.⁷⁹ Esta amplia diversidad inexplorada alberga un enorme reservorio de enzimas con potencial aplicación biocatalítica, por lo que los avances en su estudio podrían dar lugar a numerosas aplicaciones, algunas quizás insospechadas.

Exploración de la biodiversidad

Una primera aproximación a la exploración de la biodiversidad con fines biocatalíticos consiste en la búsqueda de microorganismos que puedan producir enzimas con la actividad deseada.⁸⁰⁻⁸³ La enzima puede luego obtenerse a partir del microorganismo original, o si es necesario pueden utilizarse métodos moleculares para desarrollar sistemas de expresión más eficientes.⁸⁴ La información genética de los microorganismos cultivados puede ser explorada mediante amplificación por PCR (*polymerase chain reaction*, reacción en cadena de la polimerasa) usando datos de secuencias previamente conocidas, o por medio de la construcción y análisis de genotecas, para la búsqueda de la enzima responsable de la actividad deseada.⁸⁵ Recientemente, la disminución en los costos ha facilitado el secuenciado de genomas completos de microorganismos, los cuales también pueden ser analizados en base a la homología con secuencias ya reportadas para buscar nuevas enzimas.^{80,86-87} Los métodos dependientes de cultivo han sido la primera aproximación para la búsqueda de nuevas enzimas, y aún hoy siguen siendo utilizados con éxito.⁸⁸⁻⁹⁰

Sin embargo, un gran número de microorganismos viven en la naturaleza en condiciones muy difíciles de reproducir en el laboratorio, y no pueden ser cultivados en forma aislada con las técnicas actuales. Se calcula que menos del 1% de los microorganismos son cultivables,⁷⁸ e incluso es posible que los valores que han sido calculados hasta el momento estén sobreestimados.⁹¹ Por este motivo se ha desarrollado la metagenómica, técnica que permite explorar dicha diversidad y acceder a parte de su amplio potencial biotecnológico sin necesidad de cultivar los microorganismos.^{79,92} La construcción de bibliotecas metagenómicas comienza por la extracción total de ADN de una comunidad microbiana, para lo cual se han desarrollado técnicas aplicables a distintos hábitats.⁹³⁻⁹⁴ Los fragmentos de ADN son luego clonados utilizando huéspedes adecuados, generando una biblioteca metagenómica conteniendo al menos una parte de la información genética de la comunidad microbiana. El análisis de dicha información en busca de genes de utilidad biocatalítica puede realizarse mediante técnicas basadas en secuencias, como hibridación, PCR o secuenciado, en forma similar a lo descrito para los microorganismos aislados. Este tipo de análisis requiere la

comparación con secuencias de enzimas previamente reportadas, y permite obtener principalmente variantes de las enzimas ya conocidas. Cabe señalar que los frecuentes errores en la asignación de funciones en los genes depositados en bases de datos producen en ocasiones errores en la identificación de nuevas enzimas mediante este tipo de métodos.⁷⁹ En cambio, el análisis funcional consiste en la detección de las enzimas de interés mediante ensayos de actividad, lo que proporciona el potencial de detectar aquellas enzimas que son radicalmente distintas a las reportadas previamente. Para poder detectar la actividad enzimática es necesario que la enzima se exprese en forma activa en el huésped utilizado. Esto ha sido señalado como una limitación,^{79,94} pero puede también ser una ventaja dado que implica que las enzimas detectadas podrán ser expresadas en huéspedes heterólogos adecuados para su utilización en biotecnología.⁹⁵ La reciente exploración de metagenomas mediante análisis funcional ha demostrado su utilidad en la detección de numerosas nuevas lipasas.⁹⁶⁻¹⁰⁰

Optimización de biocatalizadores conocidos

Dentro del amplio universo de posibles biocatalizadores existentes en la naturaleza, sólo un pequeño porcentaje ha sido estudiado con cierta profundidad y se encuentra disponible para su aplicación biocatalítica.⁹³⁻⁹⁴ Estas enzimas, provenientes de un número limitado de microorganismos, muchas veces distan mucho de ser biocatalizadores ideales. Esto ha llevado al desarrollo de estrategias para mejorar su actividad y su estabilidad. La opción más clásica involucra la optimización de las condiciones de reacción y la inmovilización de las enzimas. Los métodos de ingeniería genética permiten mejorar aún más las propiedades de los biocatalizadores, permitiendo el desarrollo de enzimas que se adapten a los procesos industriales, en lugar de adaptar los procesos a las enzimas.⁹⁵

Para desarrollar nuevas variantes enzimáticas con propiedades mejoradas, deben introducirse cambios en las enzimas originales. Estas mutaciones pueden generarse mediante métodos que involucran el azar, como la amplificación por PCR con tendencia al error, o pueden basarse en estrategias de diseño racional, lo que requiere una base de conocimientos previos sobre la relación estructura - actividad de la enzima a modificar. Los métodos de diseño semi-racional toman elementos de ambos extremos, con el objetivo de obtener resultados más rápidos y con un menor esfuerzo de análisis, sin perder la amplitud de posibilidades que genera el azar.¹⁰¹⁻¹⁰⁵ Esta combinación es probablemente la opción más eficiente para la generación de variantes mejoradas de las lipasas.⁹⁵

Diversas lipasas han sido sometidas a mejoramiento mediante métodos de ingeniería genética, aplicando distintas metodologías de acuerdo con los objetivos perseguidos. Cuando no se conoce con certeza la base estructural de la característica que se desea mejorar, el método más utilizado es la introducción de mutaciones al azar. La aplicación de este método ha permitido producir un aumento de estabilidad en algunas lipasas; sin embargo, algunas aproximaciones semi-rationales también han tenido éxito.⁹⁵ Por otro lado, en la modificación de las propiedades catalíticas, las aproximaciones racionales y semi-rationales han demostrado ser más útiles.¹⁰⁵ Esto ha sido posible gracias al avance en el conocimiento de la estructura tridimensional de distintas lipasas, y en la correlación de dichas estructuras con la actividad observada. El primer ejemplo de modificación de la enantioselectividad de una lipasa, reportado en el 2000 por Reetz y colaboradores,¹⁰⁶⁻¹⁰⁷ se basó en la introducción de mutaciones al azar y el estudio de un gran número de mutantes utilizando métodos de análisis de alto rendimiento. En trabajos más recientes, la aplicación de métodos racionales y semi-rationales ha permitido disminuir el número de variantes a analizar y mejorar sustancialmente el porcentaje de éxito.⁹⁵

Las técnicas de ingeniería genética han sido también aplicadas a la modificación del perfil de sustratos aceptados por las lipasas. Tanto para la lipasa de *Rhizopus oryzae*¹⁰⁸ como las lipasas Lip 1 y Lip 4 de *Candida rugosa*¹⁰⁹⁻¹¹⁰ se ha podido establecer una base estructural para la preferencia de sustrato, y se han obtenido variantes que tienen preferencia por ésteres con largos de cadena menores que las lipasas originales. También se ha logrado extender la preferencia hacia sustratos de cadena más larga. Reyes-Duarte y colaboradores utilizaron PCR con tendencia al error para modificar la preferencia de sustrato de la carboxilesterasa R.34, proveniente del metagenoma del rumen bobino.¹¹¹ La única variante positiva observada presentó una sola mutación, Asn33Asp, la cual produjo un cambio en el perfil de preferencia de sustrato de la enzima, aumentando su actividad sobre sustratos de cadena media y larga. Basándose en el modelado tridimensional de la enzima se postuló que esta mutación produce la formación de un puente de hidrógeno que modifica su estructura. Hidalgo y colaboradores produjeron mutantes de la esterasa I de *Pseudomonas fluorescens* I con actividad aumentada sobre sustratos de cadena larga, mediante un método que involucra la introducción de mutaciones al azar en zonas restringidas del gen de la enzima.¹⁰² Reetz y colaboradores desarrollaron el método CAST (*Combinatorial active-site saturation test*), basado en la introducción de mutaciones por saturación en combinaciones de aminoácidos cercanos al sitio activo, seleccionados de forma racional. Aplicando este método fueron capaces de obtener mutantes de una lipasa de *Pseudomonas aeruginosa* capaces de hidrolizar sustratos voluminosos, estéricamente exigentes, para los cuales la lipasa original presentaba baja o nula actividad.¹⁰³⁻¹⁰⁴ Sin embargo, estas variantes presentaron en general actividad disminuida frente a los derivados de *p*-Nitrofenol esterificados con cadenas no ramificadas.¹⁰⁴

La ingeniería genética nos da el potencial para poder modificar las enzimas disponibles y hacerlas más adecuadas a nuestros propósitos. El descubrimiento de biocatalizadores novedosos mediante técnicas de cultivo o metagenómicas provee de nuevos puntos de partida, a la vez que permite la profundización en el estudio de la relación estructura-actividad de las lipasas. Se han logrado grandes avances conociendo menos del 1% de la biodiversidad disponible. En consecuencia, es necesario continuar explorando la misma para develar todas las posibilidades que ofrece la biocatálisis, utilizando la ingeniería genética para ampliar y mejorar las herramientas que la naturaleza proporciona.

Lipasas bacterianas

Como se mencionó anteriormente, las lipasas son biocatalizadores con numerosas aplicaciones en biotecnología. Dentro de estas enzimas, las que presentan mayor relevancia desde el punto de vista biotecnológico provienen principalmente de microorganismos, tanto de hongos como de bacterias.¹¹² Un gran número de lipasas y esterases bacterianas han sido objeto de un estudio comparativo, lo que ha permitido su clasificación inicial en ocho familias en base a su similitud de secuencia y a sus propiedades bioquímicas,¹¹³ aunque han sido propuestas diferentes ampliaciones de esta subdivisión.^{32,114} En esta clasificación, la mayoría de las lipasas verdaderas se agrupan dentro de la familia I junto con las fosfolipasas. Esta familia se divide a su vez en seis subfamilias. Las lipasas del género *Pseudomonas*, muy importantes por sus aplicaciones biotecnológicas, pertenecen a las subfamilias I.1 a I.3. Dentro de éstas, las lipasas de las subfamilias I.1 y I.2 presentan mayores semejanzas y han sido ampliamente estudiadas.^{113,115} Sus tamaños son similares, entre 30 y 33 kDa, y son claramente homólogas. Las lipasas de ambas subfamilias requieren de proteínas chaperonas para adoptar su forma activa, las cuales se denominan Lif (foldasa específica para lipasas, *lipase-specific foldase* en inglés). En cambio, las lipasas de la subfamilia I.3, menos conocidas, tienen un peso molecular mucho mayor, de 50 – 65 kDa, y sus secuencias difieren notablemente de las de las subfamilias I.1 y I.2. Las lipasas de la subfamilia I.3 no requieren chaperonas para su correcto plegamiento. Mientras que las subfamilias I.1 y I.2 incluyen enzimas de diversos géneros bacterianos, las de la subfamilia I.3 provienen únicamente de los géneros *Serratia* y *Pseudomonas*,¹¹³ aunque se encuentra también en las bases de datos una secuencia con alta homología a la subfamilia I.3 perteneciente al género *Acinetobacter*.¹¹⁶

Lipasas de la subfamilia I.3

Características generales

La subfamilia I.3 ha sido menos explorada que las subfamilias I.1 y I.2, especialmente desde el punto de vista biocatalítico. Si bien hay numerosas secuencias depositadas en bases de datos, sólo cerca de 20 lipasas pertenecientes a la subfamilia I.3 han sido estudiadas en cierta medida. Las que provienen de microorganismos conocidos tienen su origen en cepas de *Ps. fluorescens*¹¹⁷⁻¹²¹ y *S. marcescens*,¹²²⁻¹²⁸ así como de cepas del género *Pseudomonas* para las cuales no se ha determinado la especie.¹²⁹⁻¹³³ Por otro lado, un número importante de ejemplos de lipasas de la subfamilia I.3 proviene del estudio de metagenomas.^{96-99,134}

Las lipasas de la subfamilia I.3 comparten la ausencia de una señal de secreción en el extremo N-terminal, y se ha establecido que su liberación al medio extracelular se produce a través de un sistema de secreción del tipo I (SSTI).¹³⁵ Mediante digestión parcial con

quimiotripsina¹³¹ y a partir de estudios cristalográficos de las estructuras tridimensionales de las lipasas de *Pseudomonas* sp. MIS38¹³³ (PML) y *S. marcescens* SM6¹²⁵ (SML), se determinó que estas enzimas poseen dos dominios diferenciados: el dominio N-terminal, donde reside la actividad catalítica y el dominio C-terminal, involucrado en la secreción y el plegamiento de la enzima.

Tanto en PML como en SML los primeros 350 aminoácidos pertenecen al dominio N-terminal. En este dominio se encuentra el sitio activo, el cual está formado por los aminoácidos serina, ubicado en la posición 207, aspartato en la posición 255 o 256 e histidina en la posición 313 o 314. Las estructuras tridimensionales de SML y PML (Figura 4) han evidenciado la presencia en el dominio catalítico de dos “tapas” (*lids*): estructuras anfipáticas, con una cara hidrofílica y la otra hidrofóbica, capaces de cambiar de una conformación cerrada, en la cual bloquean el acceso del sustrato al sitio activo, a otra abierta que favorece la entrada del sustrato. Una de estas estructuras, denominada Lid 1 se encuentra entre los aminoácidos 146 – 166, y consiste en una única hélice α , que aparece quebrada cuando la enzima se encuentra en la conformación cerrada. La otra, denominada Lid 2 y situada entre los aminoácidos 33 – 74, consiste en una hélice α breve seguida de un *loop*. Mientras que la Lid 1 está ampliamente distribuida en diferentes familias de lipasas,¹³⁶ la Lid 2 es una estructura única de las lipasas de la subfamilia I.3.^{133,137} Ha sido demostrado para PML que estas estructuras participan en la activación interfacial, es decir, en presencia de un sustrato micelar estas “tapas” se abren exponiendo los residuos hidrofóbicos, los cuales entran en contacto con el sustrato y permiten su ingreso al sitio activo.¹³⁷⁻¹³⁸ Sin embargo, mientras hay evidencia empírica de activación interfacial en PML,¹³¹ esto no se ha podido demostrar para SML.¹²⁵ Se ha encontrado en la estructura de SML y en la conformación abierta de PML que la lid 1 se encuentra anclada en su posición por medio de un ion calcio denominado Ca1, el cual está coordinado por los residuos Asp¹⁵³, Asp¹⁵⁷, Thr¹¹⁸, Ser¹⁴⁴ y Gln¹²⁰. Se ha demostrado que la eliminación de Ca1 reduce notoriamente la actividad.¹³¹ En la conformación cerrada de PML Ca1 no está presente, y la hélice α de la Lid 1 adopta una conformación quebrada.¹³³ El dominio catalítico posee además dos sitios adicionales de unión a calcio, denominados Ca2 y Ca3, los cuales son necesarios para la estabilidad y la actividad de la enzima.^{125,138-139} El requerimiento de calcio en otras lipasas de la subfamilia I.3 ha sido ampliamente demostrado,^{117,124,127,129,134} y la homología de secuencia es alta, por lo que es probable que la estructura determinada para PML y SML se encuentre conservada entre las lipasas de la subfamilia I.3.

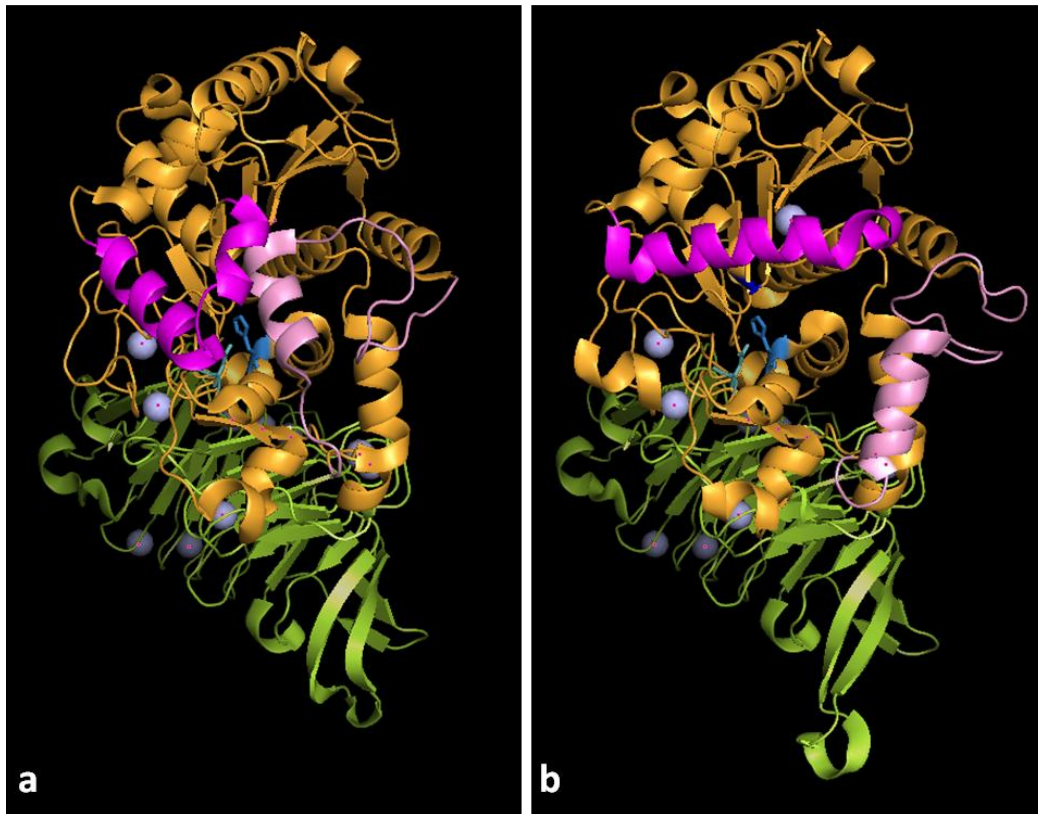


Figura 4: Modelos tridimensionales de las estructuras cerrada (a) y abierta (b) de PML de *Pseudomonas* sp. MIS38.^{133,138} Naranja: dominio N-terminal; verde: dominio C-terminal; violeta: Lid 1; rosado: Lid 2. En tonos de azul se muestran los aminoácidos del sitio activo S²⁰⁷, D²⁵⁵ y H³¹⁰ y como esferas celestes los átomos de calcio

El dominio C-terminal corresponde a los últimos 250 aminoácidos en PML y SML, aunque en muchas lipasas de la subfamilia esta estructura presenta una delección de 138 aminoácidos.^{96-97,99,117,119-120,130,134} Se encuentran en este dominio un número variable de repeticiones de la secuencia GGXGDXUX (U: residuo hidrofóbico), en algunas ocasiones degenerada. Esta secuencia se conoce como motivo RTX (*repeat in toxin*) debido a que se encuentra presente en varias toxinas y otras proteínas que son secretadas por sistemas de secreción de tipo I. Las secuencias GGXGDXUX forman una estructura de β -roll sandwich,¹²⁵ en la cual a través de los residuos aspartato se une un número variable de iones calcio, sin los cuales el dominio no adopta la conformación adecuada.¹³² Esta estructura es necesaria para el correcto plegamiento de la proteína y su actividad hidrolítica, y se ha postulado que podría funcionar como una chaperona intramolecular.^{125,132,140} En el extremo C-terminal se encuentra también una secuencia señal compuesta por un pentapéptido hidrofóbico, VTL(V/I)G, y un motivo formado por un aminoácido cargado negativamente seguido de 3 o 4 aminoácidos hidrofóbicos, (D/E)X(I/V)V(I/L)(A/S). Estos motivos están separados por una distancia entre seis y ocho aminoácidos, y constituyen una señal necesaria para la estabilidad y la secreción de las lipasas de la subfamilia I.3.^{125,141}

Las lipasas de la subfamilia I.3 presentan algunas características comunes en cuanto a sus propiedades bioquímicas. Las que han sido caracterizadas^{97,99,126,134-135} presentan preferencia por sustratos de cadena media (longitud de cadena entre 6 y 12 átomos de carbono). Las condiciones óptimas de reacción se encuentran a pH neutro o ligeramente básico (7 – 9), y a temperaturas entre 30 y 55 °C, con la excepción de una lipasa de *Pseudomonas* sp. AMS8, cepa proveniente de la Antártida, que presenta una temperatura óptima de 20 °C.¹³⁰ Una característica particular es que los puntos isoeléctricos para estas lipasas son generalmente bajos, entre 4,3 y 5,4, con la excepción de la lipasa de *Ps. fluorescens* SIK W1 para la cual el pI calculado es de 8,6. Esto ha permitido en varios casos utilizar métodos de intercambio aniónico para su purificación.^{97,117,123-124,131,142-143}

Se ha observado dentro de la subfamilia I.3 que pequeñas diferencias en la secuencia producen cambios importantes en sus propiedades biocatalíticas. Lip AMS8 y la lipasa de *Pseudomonas* sp. N°33 muestran un 97% de identidad entre sí pero la primera está adaptada a temperaturas bajas y pierde actividad por encima de 30 °C, mientras que la segunda es termoestable.¹³⁰ Incluso, a pesar de las similitudes en secuencia y estructura demostradas entre PML y SML, sus características biocatalíticas difieren. Resulta necesario un mayor estudio de la relación entre estructura y actividad en estas lipasas, para poder entender mejor estas diferencias.

Producción y purificación de lipasas de la subfamilia I.3

La purificación de las lipasas de la subfamilia I.3 puede realizarse a partir del sobrenadante del microorganismo que la produce originalmente. Esta estrategia ha tenido éxito en algunos casos,^{124,144-145} pero no ha sido el camino más transitado para la producción de estas lipasas. Debido a la interferencia de otras enzimas hidrolíticas o a la baja productividad, se hace necesario el clonado del gen correspondiente y su expresión en un huésped adecuado. En consecuencia, se han aplicado técnicas de biología molecular como elaboración de genotecas, *genome walking* y amplificación mediante PCR para lograr este fin. También se han identificado por estos métodos lipasas provenientes de metagenomas.^{96-99,134} Se ha logrado con éxito la expresión heteróloga de estas lipasas en *Escherichia coli*^{98,117,123,131,142,146-148} y *Pichia pastoris*,^{97,149-150} y mientras que en algunos otros casos se han desarrollado sistemas de expresión homóloga.¹⁵¹⁻¹⁵²

La utilización de *E. coli* como huésped produce en general la acumulación intracelular de las lipasas de la subfamilia I.3, lo que produce su agregación en forma de cuerpos de inclusión, con la concomitante pérdida de actividad hidrolítica. Una solución a este problema consiste en purificar la enzima a partir de los cuerpos de inclusión.^{98,117,142,146-147} Para lograr la solubilización de los mismos se utiliza una alta concentración de urea como agente caotrópico, cuya acción puede estar apoyada por la presencia de glicerol y DTT. En estas condiciones la lipasa es desnaturalizada y solubilizada. Posteriormente se realiza un paso de renaturalización, mediante disminución de la concentración de urea por dilución, para luego eliminarla utilizando diálisis o ultrafiltración. Este tipo de metodología permite lograr una eficiente purificación, dado que en los cuerpos de inclusión la enzima se encuentra prácticamente pura. Sin embargo su aplicación es tediosa y consume tiempo, motivo por el cual muchos grupos han explorado alternativas para lograr la expresión soluble de estas lipasas.^{97,135,149-154}

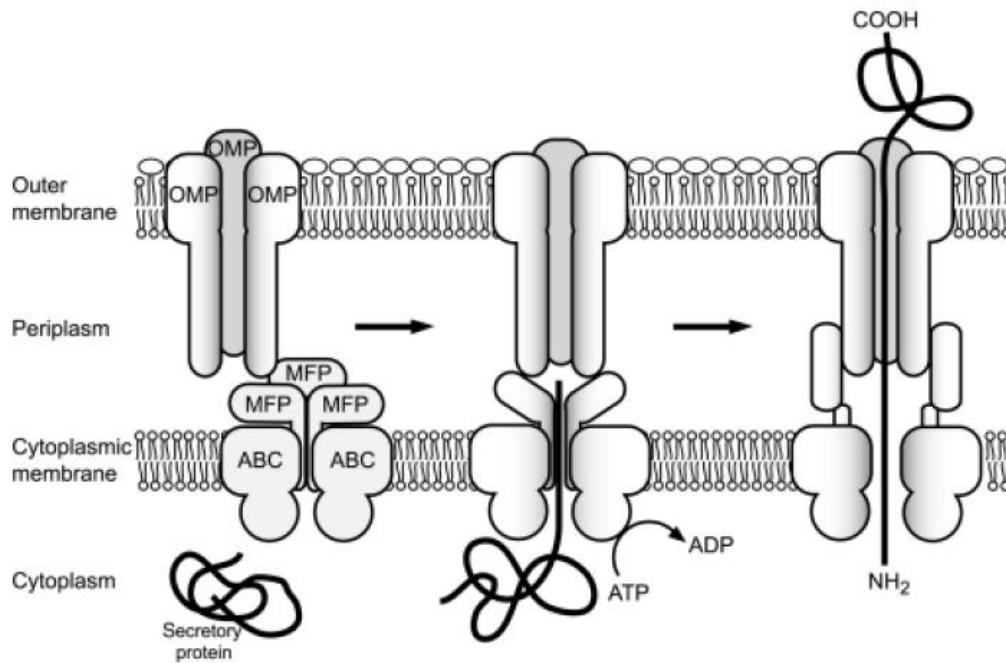


Figura 5: Esquema general de un sistema de secreción de tipo I. El sistema se ensambla una vez que es reconocida la señal de secreción C-terminal de la proteína a exportar.¹⁵⁵

Recientemente se ha reportado la expresión de la lipasa de *Pseudomonas fluorescens* SIK W1 mediante anclaje a la membrana interna de *E. coli*.¹⁵⁶ Este método previene el agregado de la enzima y permite su purificación a partir de los restos celulares en forma relativamente simple, pero los rendimientos de producción obtenidos fueron bajos.

Como se ha mencionado anteriormente, en sus cepas originales, las lipasas de la subfamilia I.3 son secretadas al medio de cultivo mediante un sistema de secreción del tipo I (SSTI, Figura 5).¹³⁵ Este sistema interviene en la traslocación de proteínas desde el citoplasma al exterior de la célula, por medio de un canal que atraviesa todas las capas de la pared celular de bacterias Gram negativas. El SSTI está formado por tres tipos de proteínas. Por una parte, las proteínas ABC se encuentran asociadas a la membrana interna, y poseen un sitio de unión a ATP (*ATP binding cassette*), donde se produce la hidrólisis del mismo para impulsar la secreción. El resto está constituido por las proteínas OMP (*outer membrane protein*), que se encuentran asociadas a la membrana externa, y por las proteínas MFP (*membrane fusion protein*), que tienen la función de unir las estructuras formadas por las proteínas ABC y las OMP.¹⁵⁵ El clonado de algunos SSTI de las lipasas de la subfamilia I.3 ha permitido la secreción de estas enzimas en cepas de *E. coli*^{153,157-158} y el aumento de la secreción en la cepa productora original.¹³⁵ También se ha logrado incrementar la secreción utilizando SSTI destinados a otras proteínas RTX. Por ejemplo, tanto la lipasa SML de *S. marcescens*¹⁵³ y como la lipasa PML de *Pseudomonas* sp. MIS38¹⁵⁴ han sido purificadas a partir de cultivos de *E. coli* que expresan concomitantemente el SSTI de *S. marcescens*.

La expresión de lipasas de la subfamilia I.3 en la levadura *P. pastoris* también ha sido explorada. Esta cepa se presenta como un huésped sumamente útil para la expresión de proteínas recombinantes,^{84,159} ya que el bajo nivel de secreción de proteínas propias lo hace adecuado para la secreción de proteínas heterólogas. La expresión de lipasas de la subfamilia

I.3 en *P. pastoris* ha sido llevada a cabo con éxito tanto para obtener la enzima en forma soluble y secretada,^{97,121,150,160} como para su direccionamiento acoplándola a la superficie de la levadura (*surface display*).¹⁴⁹

Aplicaciones biocatalíticas

Las lipasas de la subfamilia I.3 han sido poco exploradas en cuanto a sus aplicaciones biocatalíticas, siendo las más estudiadas las provenientes de distintas cepas de *Serratia marcescens*. La lipasa de *S. marcescens* Sr41 8000 ha sido utilizada con éxito en la hidrólisis del intermediario **1** (Figura 6), de utilidad en la síntesis de Diltiazem, un vasodilatador coronario ampliamente utilizado en clínica.^{124,161} La lipasa de *S. marcescens* ECU1010 también ha sido aplicada al mismo proceso de síntesis.^{127,162} Esta aplicación ha dado lugar a por lo menos dos patentes europeas¹⁶³⁻¹⁶⁴, una estadounidense¹⁶⁵ y dos chinas.¹⁶⁶⁻¹⁶⁷ Además, esta última lipasa se ha utilizado también para la resolución cinética de ketoprofeno,¹⁶⁸ mientras que la lipasa de *S. marcescens* ES-2 ha mostrado utilidad para la resolución cinética de (S)-flurbiprofeno.^{128,165}

Por último, la lipasa de *Pseudomonas fluorescens* HU380 puede degradar grasas y aceites que contienen ácido eicosapentanoico (EPA) y ácido dodecahexanoico (DHA) lo cual representa una potencial aplicación en la industria alimentaria.^{145,169}

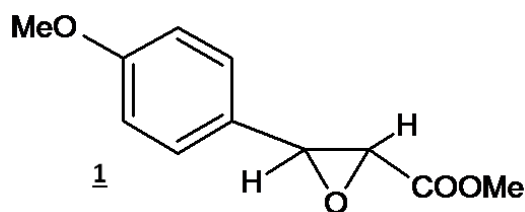


Figura 6: Intermediario **1**: metil éster del ácido *trans*-3-(4-metoxifenil) glicídico ((±) MPGM, *trans*-3-(4-methoxyphenyl)glycidic acid methyl ester)

Lip I.3 de *Pseudomonas* sp. CR-611

La cepa *Pseudomonas* sp. CR-611 fue aislada a partir de suelo de un bosque subtropical de Puerto Iguazú, Argentina,⁸² y se encuentra relacionada con cepas de *Pseudomonas fluorescens*.¹⁷⁰ Esta cepa presenta alta actividad lipolítica frente a tributirina y aceite de oliva.⁸² En trabajos anteriores realizados en el grupo de la Dra. Pilar Díaz (Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Barcelona, España), se identificó y clonó en *E. coli* una esterasa de la familia VI perteneciente a esta cepa.¹⁷⁰ Posteriormente, utilizando métodos moleculares, fue identificada y clonada una lipasa que presentaba alta homología con lipasas de *Pseudomonas fluorescens* incluidas en la subfamilia I.3.¹⁷¹⁻¹⁷² Se expresó esta lipasa en una cepa de *E. coli*, y se inició la caracterización de la actividad lipolítica de un extracto proteico sin purificar obtenido a partir del clon recombinante. Sin embargo, para poder realizar un estudio adecuado de las propiedades catalíticas de la lipasa I.3 de *Pseudomonas* sp. CR-611, se hace necesaria la purificación de la misma y su caracterización bioquímica.

Objetivo general

Esta tesis tiene como objetivo principal la búsqueda y desarrollo de nuevos biocatalizadores con actividad lipolítica. Se centra la atención en el estudio de la lipasa Lip I.3, proveniente de la cepa *Pseudomonas* sp CR-611, la cual fue aislada en base a su actividad, así como en la exploración de la biodiversidad no cultivable por estrategias de metagenoma. Se plantea también la caracterización de estos nuevos biocatalizadores y el desarrollo de sistemas de expresión adecuados para la producción de los mismos. Se aplican técnicas de ingeniería genética para mejorar las propiedades biocatalíticas de los catalizadores encontrados.

Objetivos específicos

- 1 Producción y purificación de Lip I.3. Desarrollo de un método de purificación de Lip I.3 a partir de la cepa recombinante *E. coli* (pGEMT-Lip I.3),¹⁷² mediante recuperación a partir de los cuerpos de inclusión. Desarrollo de sistemas de expresión alternativos en los cuales la lipasa sea producida en forma soluble.
- 2 Estudio de las propiedades catalíticas de Lip I.3 Realización del modelado estructural y caracterización bioquímica de la lipasa Lip I.3.
- 3 Exploración de la diversidad presente en dos ambientes distintos, uno altamente contaminado y otro libre de contaminación, en busca de nuevas enzimas lipolíticas. Mediante técnicas de metagenómica es posible acceder a parte de la diversidad no cultivable presente en dichos ambientes. Se plantea el desarrollo de genotecas representativas de cada hábitat y el rastreo de clones con actividad lipolítica.
- 4 Evaluación de la utilidad de la lipasa Lip I.3 y otras lipasas aisladas por nuestro grupo de trabajo en aplicaciones de síntesis. Realizar ensayos de síntesis de biodiesel, esterificación de glicerol, e hidrólisis de una serie de ésteres, utilizando la lipasa Lip I.3 y otras lipasas aisladas por nuestro grupo de trabajo.
- 5 Estudio de la relación estructura-actividad en lipasas de la subfamilia I.3 mediante el desarrollo de mutantes de Lip I.3. Desarrollo de mutantes de Lip I.3 por mutagénesis sitio dirigida y mutagénesis de saturación con dos objetivos: mejorar la especificidad de sustratos hacia ácidos grasos de cadena larga, estudiar la correlación entre características estructurales y la activación interfacial.

Capítulo 1

Capítulo 1

Desarrollo de sistemas de expresión y purificación de Lip I.3

Lipasa Lip I.3 de *Pseudomonas* sp CR-611

La cepa *Pseudomonas* sp. CR-611 fue aislada a partir de suelo de un bosque subtropical¹⁸² y se encuentra relacionada con cepas de *Pseudomonas fluorescens*.¹⁷⁰ Esta cepa presenta una alta actividad lipolítica frente a tributirina y aceite de oliva, por lo que en trabajos previos se estudió su sistema lipolítico, determinándose la presencia de al menos 2 enzimas con dicha actividad.¹⁷⁰ Mediante métodos moleculares fue posible identificar y clonar en *E. coli* una esterasa de la familia VI perteneciente a esta cepa.¹⁷⁰ Posteriormente, también utilizando métodos moleculares, se identificó una lipasa que presentó alta homología con lipasas de *Pseudomonas fluorescens* incluidas en la subfamilia I.3.¹⁷¹⁻¹⁷² El gen de la nueva lipasa, que se denominó Lip I.3, fue amplificado y clonado en el vector pGEMT (Promega). Fue posible detectar un aumento de la actividad lipolítica en los extractos de los clones recombinantes que contenían el plásmido; sin embargo, para poder llevar a cabo la caracterización de la enzima es necesario obtener un preparado purificado de la misma. Este trabajo comienza con el desarrollo de métodos de producción y purificación para Lip I.3.¹⁷¹

Extracción de Lip I.3 a partir de *E. coli* 5K (pGEMT-lipI.3)

El plásmido pGEMT-LipI.3, obtenido en trabajos previos,¹⁷² fue utilizado para transformar células competentes de *E. coli* 5K, obteniéndose la cepa recombinante *E. coli* 5K (pGEMT-lipI.3). A partir de esta cepa, mediante ruptura de las células utilizando ultrasonido y posterior centrifugado (*Metodología - Método 1*) se obtuvieron dos fracciones: los extractos celulares y los restos celulares particulados. El análisis de las fracciones se realizó por SDS-PAGE, utilizando revelado mediante zimograma y tinción con azul de coomasie. El zimograma permite detectar actividad lipolítica en las proteínas presentes, la cual es evidenciada por la hidrólisis de derivados de 4-metil umbeliferona (MUF). Tanto en los extractos celulares como en los restos celulares particulados se observó la presencia de dos bandas con actividad sobre MUF-butirato, de aproximadamente 30 y 70 kDa (Figura 7a). Se observa que la mayor actividad, debida a la proteína de 70 kDa, se encuentra en los restos celulares, detectándose sólo una pequeña cantidad en el extracto sin diluir. La proteína de 30 kDa, que se encuentra principalmente en el extracto celular en forma soluble, corresponde a una lipasa presente en la cepa huésped *E. coli* 5K (Figura 7b). Se conoce que la cepa *E. coli* K12, de la cual deriva la cepa *E. coli* 5K, tiene una lipasa con un peso molecular calculado de 32 kDa (Nº de acceso BAA14305); esta lipasa podría corresponder a la proteína observada en el zimograma.

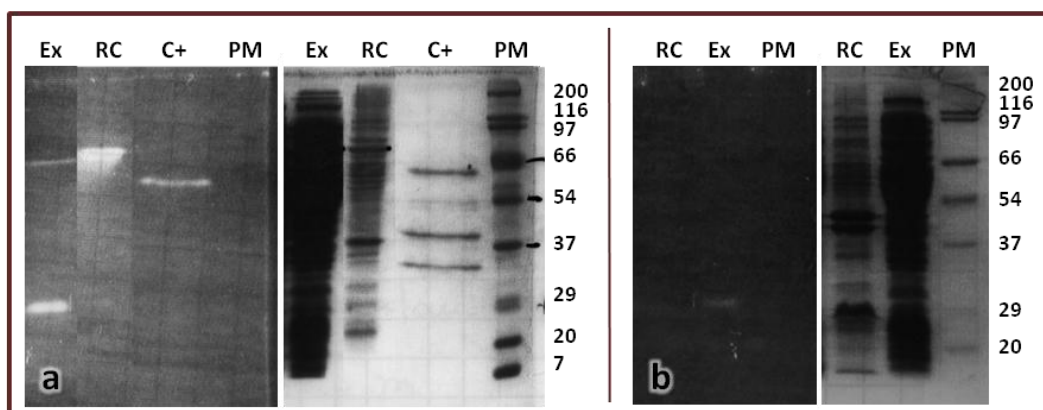


Figura 7: Extracción de Lip I.3 utilizando el *Método 1* a) Extracción a partir de *E. coli* 5K (pGEMT-Lip I.3) b) Control negativo (Extracción a partir de la cepa huésped). Ex: extractos celulares; RC: restos celulares particulados; C+: control positivo, Lip A de *Pseudomonas* sp. 42A2;¹⁷³ PM: Escalera de peso molecular (se indican a la derecha de los geles los PM de las proteínas de referencia en kDa)

La presencia de Lip I.3 en los restos celulares indica la formación de agregados o cuerpos de inclusión, lo que se ha sido observado previamente para otras enzimas de esta subfamilia.^{98,117,143,146-147} La utilización de urea como agente caotrópico promueve la solubilización de los cuerpos de inclusión. Se realizó una nueva extracción de Lip I.3, agregando distintas cantidades de urea como paso previo a la ruptura de las células mediante ultrasonido (*Metodología - Método 2*). Se determinó que una concentración de 2 M de urea permitía obtener la mayor parte de la actividad lipasa en los extractos celulares (Figura 8a). Sin embargo, al realizarse la extracción en estas condiciones se observó que esta actividad se debía a la lipasa de *E. coli* de 30 kDa y no a Lip I.3 (Figura 8b). Sin embargo, se observó que ambas lipasas son fácilmente separables, debido a que existen condiciones en las cuales mientras Lip I.3 se agrega y precipita, la otra lipasa se mantiene en los extractos celulares solubles. Este principio fue utilizado con anterioridad por Kojima y colaboradores¹⁴³ para purificar una lipasa de *Pseudomonas fluorescens* HU380 expresada en *E. coli*, la cual presenta un 92 % de identidad con Lip I.3. Se aplicó el método de Kojima con algunas modificaciones (*Metodología - Método 3*) a la extracción de Lip I.3. Los restos celulares particulados se sometieron a un tratamiento con buffer fosfato (50 mM, pH 7) conteniendo urea 8 M y glicerol al 5%. Las concentraciones altas de urea desnaturalizan la enzima, por lo que se debió realizar posteriormente una etapa de diálisis para eliminar la urea y permitir el correcto repliegado de la lipasa¹⁴³. Se observa que tras la extracción con urea y posterior diálisis la lipasa mantiene su actividad (figura 8c, línea EK)

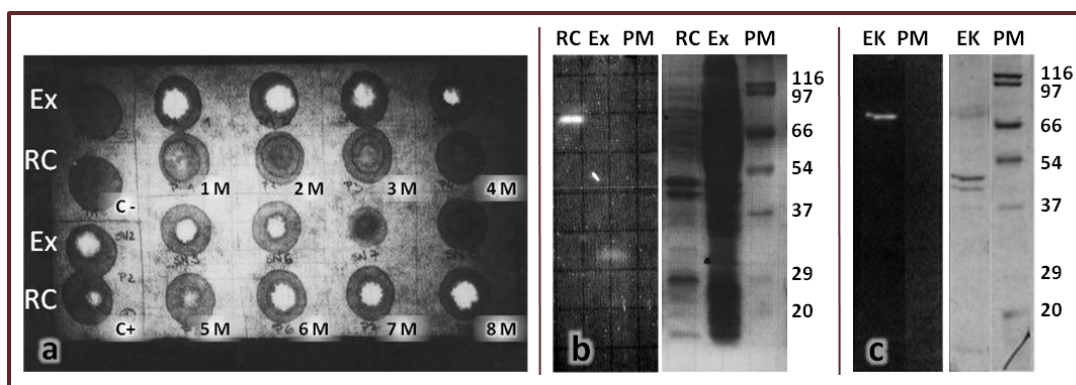


Figura 8: Extracción de proteínas de *E. coli* 5K (pGEMT-Lip I.3) utilizando urea a) Extracción usando distintas concentraciones de urea: actividad de las fracciones. Se indica en cada caso la concentración de urea utilizada (1 M– 8 M) b) Extracción utilizando urea 2M c) Extracción por el método de Kojima y purificación por intercambio iónico. Ex: extractos celulares; RC: restos celulares particulados; C-: control negativo (*E. coli* 5K); C+: control positivo (Extracción por el Método 1); EK: extracto crudo obtenido por el método de Kojima; PM: Escalera de peso molecular (se indican a la derecha de los geles los PM de las proteínas de referencia en kDa)

Purificación de Lip I.3

La extracción mediante el método de Kojima permite separar Lip I.3 de la mayoría de las proteínas presentes en la célula. En el extracto obtenido (figura 8c, EK), se observan unas pocas proteínas acompañando a Lip I.3. Se estudiaron distintos métodos para lograr la purificación de Lip I.3 a partir de este extracto. La purificación pudo lograrse mediante intercambio aniónico y cromatografía de afinidad, los cuales se describen a continuación.

Purificación por intercambio iónico

La mayoría de las lipasas de la subfamilia I.3 presentan puntos isoeléctricos bajos, por lo que la cromatografía de intercambio aniónico resulta un método de utilidad para su purificación.^{97, 117, 123-124, 131, 142-143} En el caso de Lip I.3, el punto isoeléctrico calculado para esta enzima es de 4,6, por lo que se aplicó esta técnica para su purificación. Se analizaron distintas condiciones, las cuales se resumen en la tabla 1.

Tabla 1: Condiciones para la purificación de Lip I.3 por intercambio iónico

Nº	Buffer de comienzo (A)	Buffer de elución (B)	pH	Concentración de Tritón X-100® (%)
1	Tris·HCl 20 mM	Tris·HCl 20 mM + NaCl 1 M	6	0
2			7	0
3			7	0,2
4			7	0,5

La detección de actividad se realizó mediante ensayos de hidrólisis de MUF butirato en papel y posterior análisis de las fracciones positivas en SDS-PAGE mediante zimograma y tinción con azul de Coomasie. En todas las condiciones utilizadas, una parte de la actividad lipasa se observa en el percolado, lo que significa que no es retenida por la columna. En el caso del buffer de pH 6, la actividad en esta fracción fue mayoritaria. Al utilizar los tampones sin Tritón se observa que cuando se llega a un porcentaje de buffer B del 20 % comienza a detectarse nuevamente la actividad lipasa, la cual aparece repartida en un gran número de fracciones, hasta un porcentaje de B de 55 %. Al utilizar los tampones con Tritón las fracciones con actividad disminuyen pero la actividad de estas fracciones aumenta, es decir que la enzima se concentra en menos fracciones, por lo que estas condiciones son más adecuadas para la separación.

En todos los casos, tanto en las fracciones iniciales como en las fracciones eluidas a partir de un porcentaje de buffer B del 20%, la proteína mayoritaria es la que se observa en la Figura 9, obteniéndose en algunos casos pura y en otras con mínimas cantidades de proteínas acompañantes. La elución de Lip I.3 en la fracciones iniciales puede deberse a la formación de agregados de la lipasa que no se unen al soporte de la columna.

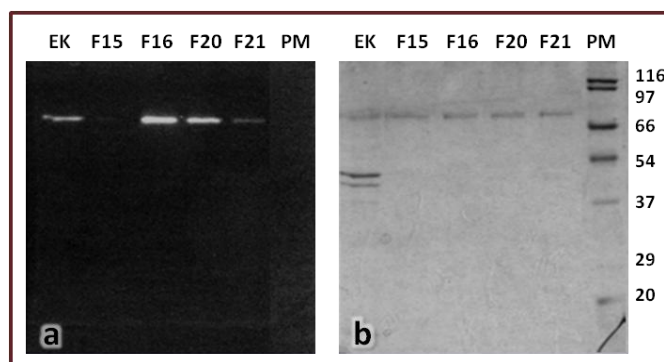


Figura 9: Purificación mediante intercambio iónico del extracto crudo producido mediante el método de Kojima. Separación por SDS-PAGE revelado mediante a) zimograma, b) tinción con azul de coomasie. EK: extracto crudo obtenido por el método de Kojima; F15-F21: Fracciones obtenidas en la purificación por intercambio aniónico, condición 2; PM: Escalera de peso molecular (se indican a la derecha los PM de las proteínas en kDa)

Purificación por afinidad

El soporte EP100, formado por un material microporoso de polipropileno, ha sido utilizado en trabajos anteriores para la inmovilización de lipasas.¹⁷⁴ Dado que Lip I.3 presenta afinidad por este soporte, al poner en contacto el extracto obtenido mediante el método de Kojima con el EP100 se logra separar la lipasa Lip I.3 de otras proteínas presentes. En la Figura 10 se muestra la disminución en la actividad lipasa en el sobrenadante durante la inmovilización de la lipasa Lip I.3 tras la unión al soporte.

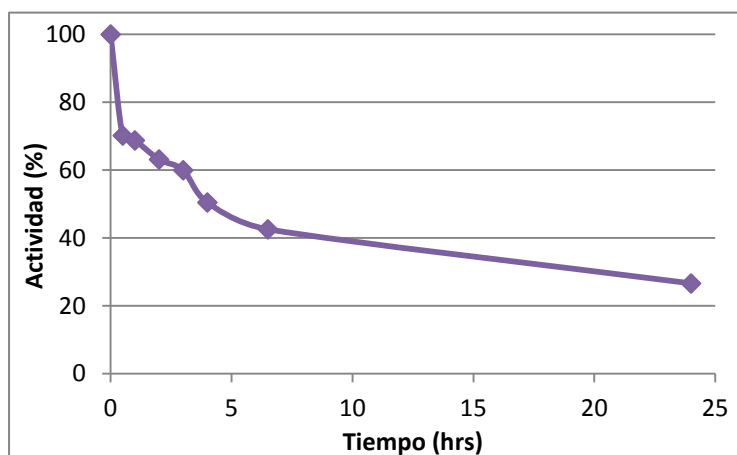


Figura 10: Actividad lipasa en el sobrenadante durante la inmovilización de Lip I.3 en el soporte EP100. La disminución en la actividad es un reflejo de la adsorción de la lipasa al soporte.

La elución de la lipasa se logró mediante la utilización de buffer acetato 50 mM con CaCl_2 10 mM y Tritón X-100® al 0,5 %, o agua con Tritón X-100® al 0,5 %. En la Figura 11 Se compara el extracto antes de la adsorción con la enzima recuperada tras la elución usando ambos métodos. Los porcentajes recuperados de actividad lipasa fueron bajos, entre un 5 y el 6 %. Sin embargo, este método permite obtener la enzima Lip I.3 con un alto grado de pureza en un solo paso y de forma muy sencilla. La optimización de este método mediante cargas sucesivas, o variando el soporte y las condiciones de inmovilización podrían mejorar los resultados obtenidos.

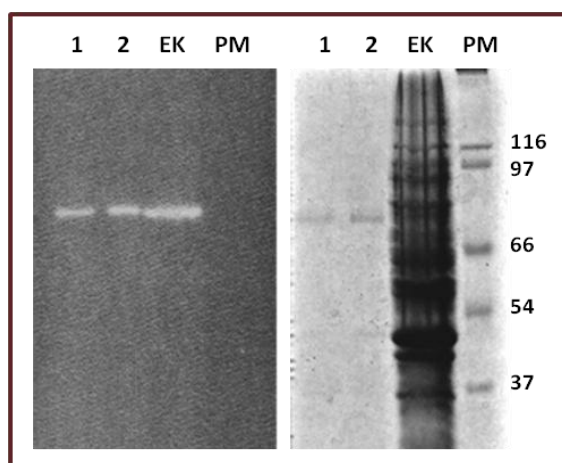


Figura 11: Purificación de Lip I.3 por afinidad mediante adsorción al soporte EP100. 1) Enzima purificada usando buffer acetato 50 mM con CaCl_2 10 mM y Tritón X-100® al 0,5 %; 2) Enzima purificada usando agua con Tritón X-100® al 0,5 %; EK: extracto crudo obtenido por el método de Kojima; PM: Escalera de peso molecular (se indican a la derecha los PM de las proteínas)

Desarrollo de sistemas de expresión de Lip I.3 en forma soluble

El método de purificación de Lip I.3 a partir de *E. coli* 5K (pGEMT-LipI.3) utilizando el método de Kojima¹⁴³ (*Metodología - Método 3*) resulta eficiente para la purificación de la enzima, pero implica largos pasos de diálisis que consumen mucho tiempo y lo vuelven tedioso. Además, no es adecuado para la realización de ensayos de alta eficiencia, necesarios para el análisis de mutantes con vista a la mejora de las propiedades catalíticas. Estos ensayos involucran la determinación simultánea de actividad en numerosas muestras, y requieren de sistemas de expresión que permitan analizar la actividad en los sobrenadantes. Si bien la lipasa Lip I.3 no ha sido purificada a partir de la cepa original *Pseudomonas* sp. CR-611, la presencia del motivo RTX indica que es probable que Lip I.3 sea secretada al medio por un sistema de secreción del tipo I (SSTI). Para agilizar los procedimientos de producción de Lip I.3 y permitir la realización de ensayos de alta eficiencia, nos planteamos el desarrollo de nuevos sistemas de expresión que permitieran la obtención de Lip I.3 secretada al medio extracelular en forma activa y soluble.

Sistema de expresión basado en *Pichia pastoris*

En trabajos anteriores se ha logrado la expresión de lipasas de la subfamilia I.3 en forma secretada y soluble utilizando sistemas de expresión basados en la levadura *Pichia pastoris*.^{97, 121, 150, 160} Esta levadura es capaz de expresar y secretar altos niveles de proteínas heterólogas mediante la expresión regulada por el promotor AOX1, el cual es inducido por metanol. Dado que la producción de proteínas extracelulares propias de la levadura es baja, resulta un sistema muy adecuado para la producción de proteínas recombinantes secretadas.¹⁵⁹ Por estos motivos, nos planteamos el desarrollo de un sistema de expresión para Lip I.3 basado en *P. pastoris*.

Desarrollo de un vector para la expresión en *P. pastoris*

Se desarrolló un vector de expresión adecuado para *P. pastoris* mediante la amplificación del gen de Lip I.3 a partir del plásmido pGEMT-LipI.3 utilizando los primers Pr LipI.3 PP2 Fwd y Pr LipI.3 PP2 Rev. El amplicón obtenido fue digerido con la enzima *KpnI* y ligado al vector pPINK α HC digerido con *StuI* y *KpnI*. De esta forma se obtuvo el vector pPINK α HC-Lip I.3, que se muestra en la figura 12.

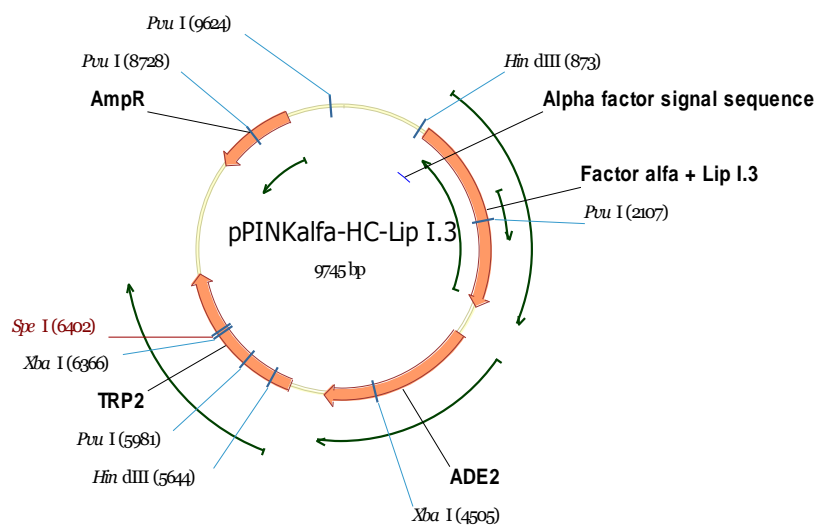


Figura 12: Esquema del vector recombinante pPINK α HC-Lip I.3

Transformación de la levadura *P. pastoris* con el plásmido construido

La transformación de *P. pastoris* se logra mediante la integración del plásmido en el locus *TRP2*. Para lograr esto, los plásmidos obtenidos fueron linearizados mediante digestión con la enzima *Spe I* (el sitio de restricción se muestra en la figura 12). El plásmido pPINK α HC, digerido con la misma enzima, fue utilizado como control positivo en las transformaciones.

Se prepararon células competentes de las cuatro cepas de *P. pastoris* provistas en el kit de Invitrogen *PichiaPink™ Expression System*. Estas cepas, denominadas *PichiaPink™* cepas 1, 2, 3 y 4, presentan distintas características en cuanto a la expresión de proteasas. La cepa 1 es la cepa original, mientras que las cepas 2 y 3 presentan deleciones en dos proteasas distintas (*pep4* y *prb1*, respectivamente). La cepa 4 combina ambas deleciones.¹⁷⁵

Se transformaron las cuatro cepas, obteniéndose transformantes de todas ellas. Las cepas *PichiaPink™* permiten la selección de aquellos clones que tienen mayor número de inserciones del gen mediante su coloración, por lo que se seleccionaron aquellos clones que presentaron colonias blancas para su posterior análisis.

Análisis de los clones obtenidos

Se analizó la presencia de LipI.3 en los transformantes blancos de *P. pastoris* mediante PCR según lo descrito en *Metodología*. No se observó amplificación en ningún caso, ni siquiera en los controles positivos, por lo que el ensayo quedó invalidado. Se analizaron numerosas condiciones de amplificación, se incluyeron diversos controles y se cambiaron los reactivos con el objetivo de dilucidar el problema, pero no fue posible solucionarlo. Los transformantes obtenidos fueron analizados también en ensayos de producción de proteínas tras inducción con metanol. Sin embargo, no fue posible detectar la proteína ni en el sobrenadante ni en los restos celulares. Si bien existen aún muchas posibilidades por explorar para dilucidar las causas de ese resultado negativo, se decidió buscar otro sistema de expresión que permitiera llegar al mismo objetivo de otra manera.

Sistema de expresión basado en *Pseudomonas*

La lipasa Lip I.3 posee una estructura susceptible de ser reconocida por los sistemas de secreción de tipo I (SSTI). Como se mencionó anteriormente, es probable que en su cepa de origen, *Pseudomonas* sp. CR-611, esta lipasa tenga una función como enzima secretada al medio. La producción de Lip I.3 en un huésped que exprese un SSTI adecuado puede dar lugar a la secreción de esta lipasa al medio de cultivo, como se ha demostrado anteriormente para otras enzimas de la misma subfamilia.¹⁵³⁻¹⁵⁴ En consecuencia, nos planteamos el desarrollo de sistemas de expresión de Lip I.3 basados en cepas de *Pseudomonas* que contaran con este sistema de secreción.

Clonado de Lip I.3 en un vector adecuado para *Pseudomonas*

Se digirió el vector pGEMT-Lip I.3 con las enzimas *Hind III* y *Xba I*. El fragmento de 1950 pb conteniendo el gen de Lip I.3 fue purificado y ligado al vector pBBR1MCS digerido con las mismas enzimas, generando el vector pBBR1MCS-Lip I.3, cuyo inserto fue secuenciado para corroborar la construcción (Figura 13). El plásmido pBBR1MCS consiste en un vector “lanzadera”, apto para la clonación y expresión de construcciones genéticas tanto en *E. coli* como en distintas cepas de *Pseudomonas*.

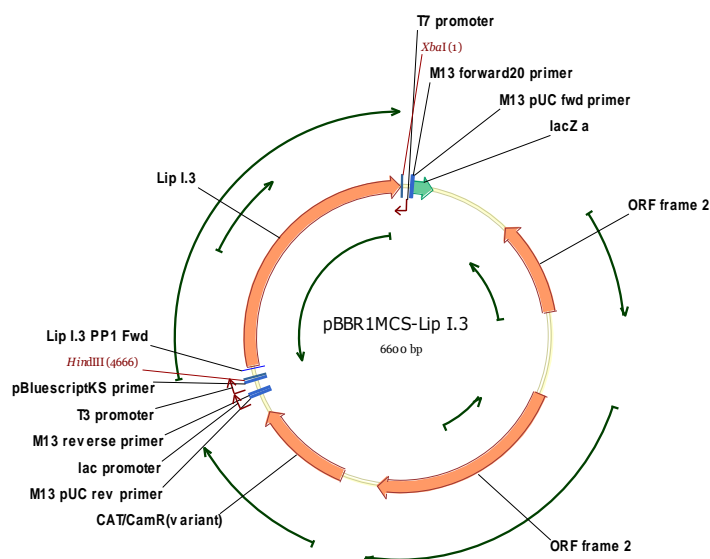


Figura 13: Esquema del vector recombinante tipo “lanzadera” pBBR1MCS-Lip I.3

Análisis de cepas de *Pseudomonas* para la expresión

Dado que el vector utilizado presenta el gen de resistencia a cloranfenicol, se debía utilizar como huésped una cepa sensible a dicho antibiótico. Por este motivo se analizó la sensibilidad a este antibiótico de las cepas *Ps. putida* KT2440, *Ps. aeruginosa* ATCC 15442, y dos cepas sin número de identificación, una de *Ps. fluorescens* y una de *Ps. putida*, pertenecientes a la colección de la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Química (Montevideo, Uruguay). Todas ellas resultaron resistentes al cloranfenicol a la concentración de 400 µg/mL, salvo la cepa *Ps. putida* KT2440. Al igual que esta última, las cepas *Pseudomonas* sp. CR-611 y *Ps. aeruginosa* PAO1 $\Delta lipH$ son sensibles al cloranfenicol a la concentración de uso.¹⁷⁶ La cepa *Ps. aeruginosa* PAO1 $\Delta lipH$ presenta una inserción del transposón ISphoA/hah en el gen *lipH*, que codifica para una foldasa. Esta foldasa es necesaria para el correcto plegamiento de sus principales lipasas, por lo que la actividad lipolítica de esta cepa es prácticamente inexistente.¹⁷⁷ Esto la hace un excelente huésped para la expresión de lipasas exógenas.

Se realizó la transformación de las cepas *Pseudomonas* sp. CR-611, *Pseudomonas putida* KT2440 y *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 $\Delta lipH$ con el plásmido pBBR1MCS-Lip I.3 para obtener las cepas productoras de Lip I.3, y también con el plásmido pBBR1MCS sin inserto, para obtener cepas control. Con la cepa *Pseudomonas putida* KT2440 (pBBR1MCS-Lip I.3) no fue posible observar actividad lipolítica. La cepa *Pseudomonas* sp. CR-611 presenta una alta actividad lipolítica basal, por lo que no fue posible observar una diferencia entre los clones que expresaban Lip I.3 y el control negativo. La cepa más adecuada para utilizarse como huésped en la producción de Lip I.3 fue *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 $\Delta lipH$. Como se observa en la figura 14a, en medio Agar tributirina conteniendo trioctanoilglicerol, la cepa *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 $\Delta lipH$ (pBBR1MCS-Lip I.3) produce un halo de hidrólisis del triglicérido alrededor de las colonias, mientras que la cepa *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 $\Delta lipH$ (pBBR1MCS) no muestra dicha actividad.

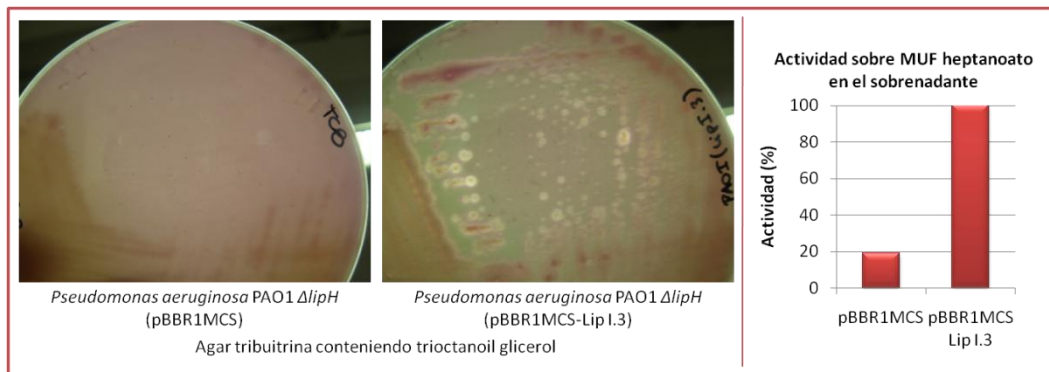


Figura 14: a) La cepa *Ps. aeruginosa* PAO1 Δ lipH (pBBR1MCS-Lip I.3) forma halos de hidrólisis en medio agar tributirina con trioctanoil glicerol, a diferencia de la misma cepa con el plásmido pBBR1MCS; b) Diferencia de actividad sobre MUF heptanoato entre los sobrenadantes de la cepa *Ps. aeruginosa* PAO1 Δ lipH (pBBR1MCS-Lip I.3) y la cepa control

La cepa con la lipasa y la cepa control fueron además crecidas en caldo LB durante 24 hrs y se analizó la actividad sobre MUF heptanoato en el sobrenadante del medio de cultivo de ambas. Se comprobó una actividad hidrolítica 5 veces mayor en la cepa *Ps. aeruginosa* PAO1 Δ lipH (pBBR1MCS-Lip I.3) que en la cepa control (Figura 14b). Por lo tanto, utilizando como huésped la cepa *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Δ lipH, se desarrolló un sistema de expresión de Lip I.3 que permite obtener la enzima en forma soluble, a partir del sobrenadante del medio de cultivo. Este sistema permite disminuir notablemente el tiempo de producción de la enzima, facilitando enormemente la utilización de Lip I.3 como biocatalizador, y permitiendo su análisis mediante métodos de cribado de alta eficiencia.

Capítulo 2

Capítulo 2

Caracterización de Lip I.3

Para poder establecer las propiedades catalíticas de Lip I.3 y su utilidad en biocatálisis, se hace necesario un estudio más profundo de esta enzima. Como primer paso se efectuó un análisis *in silico* de la secuencia de aminoácidos, el modelado de su estructura tridimensional y el cálculo teórico de algunas propiedades. El desarrollo de los métodos de producción y purificación de la lipasa Lip I.3 descritos en el *Capítulo 1* permitió obtener cantidades suficientes de enzima con una pureza adecuada para el estudio de sus propiedades catalíticas. Se realizó su caracterización bioquímica utilizando sustratos modelo derivados de *p*-nitrofenol (*p*NP) y 4-metil umbeliferona (MUF), determinándose las condiciones óptimas de reacción para Lip I.3.¹⁷¹

Análisis *in silico* de Lip I.3

El análisis de la secuencia del gen *lip* I.3 reveló un porcentaje en contenido de GC de 62,7%, lo cual está en concordancia con los resultados obtenidos para otras lipasas de la misma subfamilia. Los promotores -10 y -35, junto con una región de Shine-Dalgarno canónica fueron identificados en la región 3' anterior al codón de comienzo, pero no fue posible encontrar una señal de terminación dentro de la región amplificada a partir de *Pseudomonas* CR-611.¹⁷² En función de lo determinado mediante métodos computacionales, la secuencia codifica para una proteína de 617 aminoácidos, con un peso molecular de 65 kDa y un punto isoeléctrico calculado de 4,63. No hay residuos de cisteína en la proteína, por lo que se descarta la presencia de enlaces disulfuro. Como en otras lipasas de la subfamilia I.3, no se encontró un péptido señal en el extremo N-terminal.¹³⁵ En cambio, fue posible identificar una secuencia señal en el extremo C-terminal, formada por un pentapéptido hidrofóbico VTLVG (599-603) y el motivo DGIVIA (612-617), separados por 8 aminoácidos. Estos motivos se encuentran conservados entre los miembros de la subfamilia I.3, y están relacionados con la secreción y la estabilidad de las enzimas.^{125,141}

El análisis de la estructura secundaria de Lip I.3 reveló el plegamiento α/β típico de las lipasas, junto con una importante región hidrofóbica, y la presencia del característico codo nucleofílico, constituido por el pentapéptido Gly-His-Ser-Leu-Gly, el cual contiene la serina catalítica. Sorprendentemente se encontraron dos motivos similares conteniendo el pentapéptido G-X-S-X-G característico de las lipasas en las posiciones 152-156 (Gly-Asp-Ser-Ile-Gly) y 268-272 (Gly-Ala-Ser-Leu-Gly), lo cual es poco frecuente en las lipasas descritas y cuya función por el momento se desconoce.

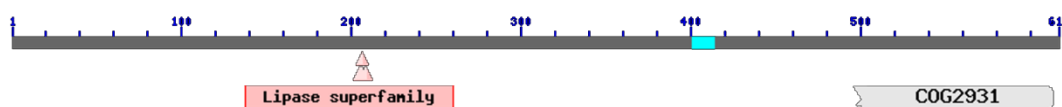


Figura 15: Dominios conservados encontrados en Lip I.3. La región COG2931 corresponde a un motivo de unión a calcio conservado en peptidasas y toxinas RTX¹⁵⁵

Se comparó la secuencia de aminoácidos de Lip I.3 con las bases de datos de proteínas utilizando el programa BLAST¹⁷⁸. Se encontró un dominio conservado dentro de la superfamilia de las lipasas, que incluye el sitio activo. También se identificó una región de unión a calcio, conservado entre toxinas y enzimas que son secretadas por el sistema de secreción de tipo I (toxinas RTX), el cual posee un papel en la secreción de este tipo de proteínas^{155,179} (Figura 15). En la tabla 2 se indican las secuencias más cercanas encontradas en la base de datos.

Las secuencias con mayor porcentaje de identidad con Lip I.3 corresponden a proteínas que no han sido caracterizadas. Una de ellas, proveniente del genoma secuenciado de *Ps. fluorescens* Pf0-1,¹⁸⁰ ha sido clasificada como lipasa en base a homología de secuencia. La lipasa lipB52 de *Pseudomonas fluorescens* B52, clonada y caracterizada por Jiang y colaboradores,¹²¹ que presenta buena estabilidad al pH y la temperatura, tiene también un 97 % de identidad con Lip I.3. La lipasa PML de *Pseudomonas* sp. MIS38, cuya estructura cristalina ha sido determinada tanto en forma cerrada¹³³ como abierta,¹³⁸ presenta un 93 % de identidad con Lip I.3. Esto permitió realizar un modelo tridimensional de Lip I.3 utilizando el programa Swiss-Model.¹⁸¹⁻¹⁸⁴ El resultado tanto para la estructura cerrada como la abierta se muestra en la figura 16.

Tabla 2: Proteínas que presentan mayor homología con Lip I.3 (NP: no publicado)

% ident.	Microorganismo	Nombre de la proteína	Nº de acceso	Ref.
98	<i>Pseudomonas</i> sp. GM25	Proteína de union a calcio (putativa).	ZP_10684787.1	185
97	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf0-1	Lipasa, clase 3	YP_348417.1	180
97	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Lipasa LipB52	AAT48728.1	121
96	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Lipasa LipB41	AAU25837.1	NP
94	<i>Pseudomonas</i> sp. GM30	Proteína de union a calcio (putativa).	ZP_10682314.1	185
93	<i>Acinetobacter</i> sp. MBDD-4	Lipasa BDZP5	ABI48028	NP
93	<i>Pseudomonas</i> sp. MIS38	Lipasa PML	2Z8X_A	131,133,138

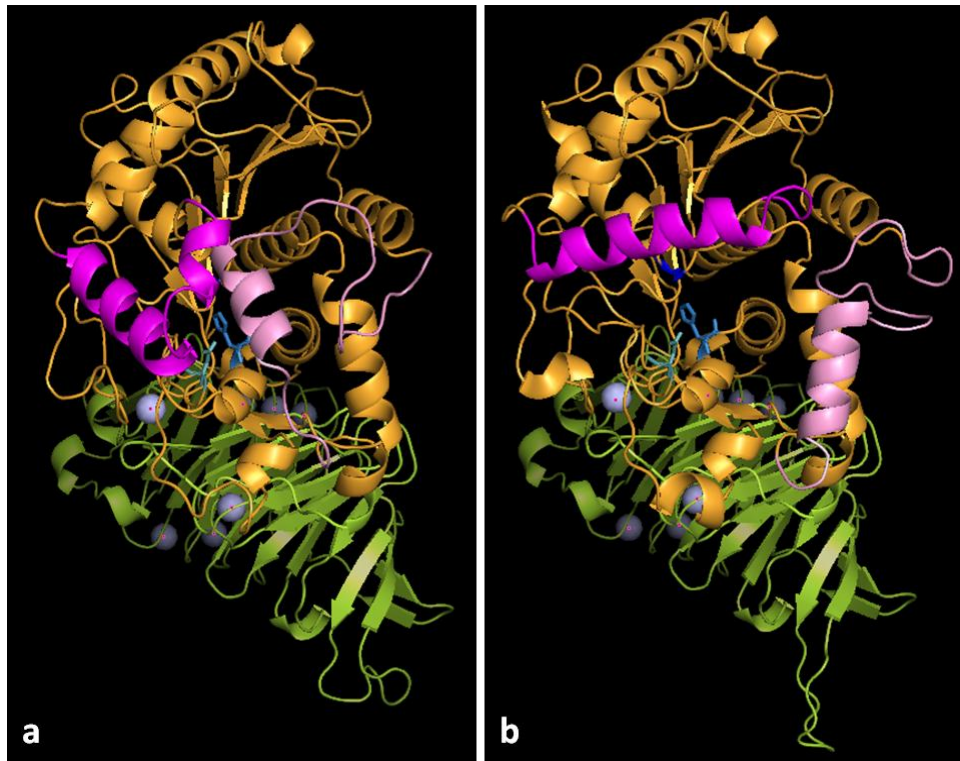


Figura 16: Modelos tridimensionales de las estructuras cerrada (a) y abierta (b) de Lip I.3. Los modelos se construyeron por comparación con la lipasa PML de *Pseudomonas* sp. MIS38, estructuras cerrada (2z8x) y abierta(2zvd) respectivamente. Naranja: dominio N-terminal; verde: dominio C-terminal; violeta: Lid 1; rosado: Lid 2. En tonos de azul se muestran los aminoácidos del sitio activo S²⁰⁷, D²⁵⁵ y H³¹⁰ y como esferas celestes los átomos de calcio

De acuerdo al modelo tridimensional obtenido y su homología con las estructuras reportadas previamente de PML y SML de *S. marcescens*,^{125,133} la tríada catalítica consiste en los aminoácidos Ser²⁰⁷, Asp²⁵⁵ e His³¹³, por lo que de momento se descarta la participación de Ser¹⁵⁴ y Ser²⁷⁰ en la catálisis. Al igual que en PML y SML, el dominio catalítico se encuentra en la región N-terminal, mientras que la región C-terminal corresponde a una estructura β -roll sandwich bien definida formada por varias hojas β -antiparalelas que actúan como sitios de unión a calcio (figura 17).¹³³ En la región C-terminal de Lip I.3 es posible encontrar 13 repeticiones de la secuencia GGXGDXUX, los cuales son responsables de la formación de dicha estructura. Sin embargo, el modelo muestra que sólo siete átomos de calcio se conservan en Lip I.3, tanto en la estructura abierta como en la cerrada. En el caso de PML, la estructura contiene 10 átomos de calcio, los cuales aumentan a 11 en la estructura abierta, debido a la incorporación de calcio en el sitio Ca1 para el anclaje del lid. En el caso de SML se dispone sólo de la estructura abierta, la cual contiene 8 átomos de calcio, pero sólo 5 coinciden con los encontrados en Lip I.3.

En Lip I.3 se encuentran presentes tanto el Lid 1 como el Lid 2, este último característico de la subfamilia I.3.¹³⁷ Es posible localizar también los residuos Asp¹⁵³, Asp¹⁵⁷, Ser¹⁴⁴ y Gln¹²⁰, responsables de la unión del ión calcio Ca1 que funciona como punto de anclaje del Lid 1.^{125,133} Sin embargo en el modelo tridimensional realizado este calcio no se encuentra presente (Figura 18). La única diferencia en el sitio de anclaje de Ca1 entre PML y Lip I.3 es el residuo Thr¹¹⁸, que se encuentra sustituido por Ser¹¹⁸. Si bien estos aminoácidos son muy similares y podrían cumplir la misma función en el anclaje del Ca1, la construcción del modelo tridimensional de PML T118S demostró que ese único cambio es suficiente para que se pierda el Ca1 en el modelo. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que en los estudios de dinámica molecular realizados sobre PML¹³⁸ no fue posible establecer el mecanismo de anclaje del Ca1, dado que las simulaciones siempre concluían con la exclusión de dicho átomo de calcio; por lo tanto existe la posibilidad de que la ausencia de calcio en el modelo sea un artefacto del método de modelado.

Los sitios de unión de Ca2 y Ca3 también están conservados entre PML, SML y Lip I.3. Sin embargo, Ca3 tampoco aparece en el modelo de Lip I.3.

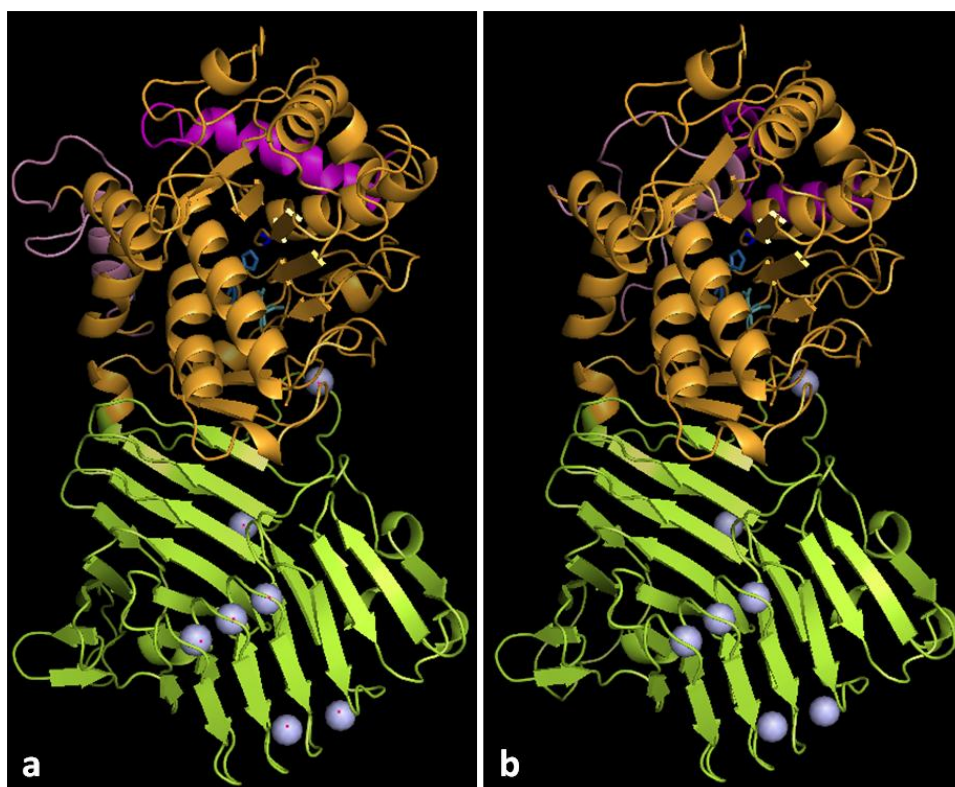


Figura 17: Modelos tridimensionales de las estructuras cerrada (a) y abierta (b) de Lip I.3 mostrando el dominio C-terminal en β -roll sandwich. Los modelos se construyeron por comparación con la lipasa PML de *Pseudomonas* sp. MIS38, estructuras cerrada (2z8x) y abierta (2zvd), respectivamente. Naranja: dominio N-terminal; verde: dominio C-terminal; violeta: Lid 1; rosado: Lid 2. En tonos de azul se muestran los aminoácidos del sitio activo S²⁰⁷, D²⁵⁵ y H³¹⁰ y como esferas celestes los átomos de calcio

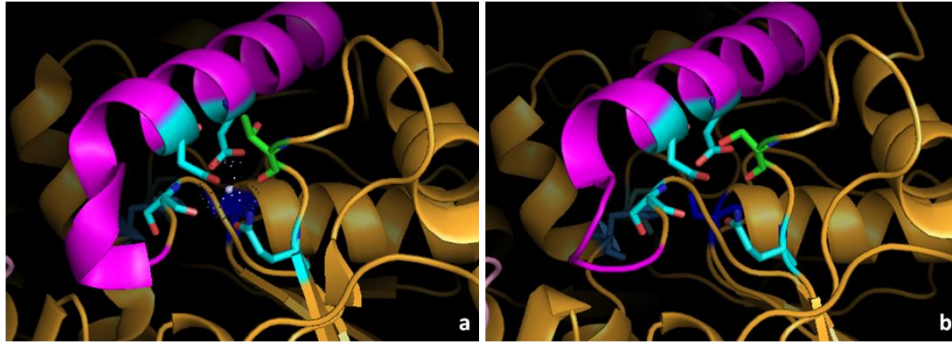


Figura 18: Sitio de unión a Ca1 en a) PML b) Lip I.3. Se muestra la ausencia de Ca1 en el modelo de Lip I.3. Naranja: dominio N-terminal; violeta: Lid 1. Para los aminoácidos que unen Ca1 los colores indican los distintos elementos. C: verde en a)Thr118 b) Ser 118; cian en el resto; O: rojo, N: azul El átomo de calcio en a) se muestra como una esfera de puntos para facilitar la visualización.

Caracterización bioquímica

Con el objetivo de estudiar las propiedades de la lipasa Lip I.3 como catalizador y determinar las condiciones óptimas de reacción, se llevó a cabo la caracterización de la enzima. Los ensayos de actividad se basaron en la hidrólisis de sustratos modelo derivados de *p*-nitrofenol (*p*NP)¹⁸⁶⁻¹⁸⁹ y de 4-metil umbeliferona (MUF),¹⁸⁹⁻¹⁹⁰ los cuales permiten una rápida cuantificación de la actividad hidrolítica. Las condiciones para los ensayos con derivados de MUF utilizando placas de microtitulación fueron optimizadas en el inicio de este trabajo de tesis.

Especificidad de sustrato

Se estudió la especificidad de sustrato de Lip I.3 tanto para los sustratos derivados de *p*NP como para los sustratos derivados de MUF. Los resultados obtenidos se indican a continuación.

Sustratos derivados de *p*NP

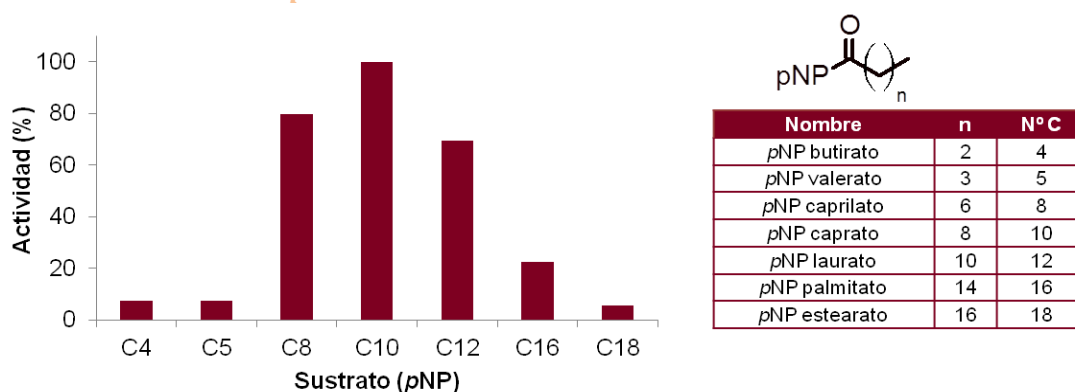


Figura 19: Porcentaje de actividad de Lip I.3 en función del sustrato para los derivados de *p*NP. El 100 % corresponde al sustrato para el cual Lip I.3 presenta máxima actividad. En la gráfica los derivados se indican por el número de átomos de C.

Se observa que la máxima actividad se presenta cuando el sustrato es el *p*NP-caprato, manteniéndose un 70 % de la actividad para el *p*NP-laurato y un 80 % de la actividad para el *p*NP-caprilato (Figura 19). Esto indica que esta lipasa presenta preferencia por sustratos de cadena media.

Sustratos derivados de MUF

En el caso de los derivados de MUF, entre los sustratos analizados la lipasa Lip I.3 muestra preferencia por el MUF-heptanoato, también de cadena media (Figura 20). De acuerdo con los resultados obtenidos con los derivados de *p*NP, la actividad de la enzima podría tener su máximo sobre sustratos con largos de cadena un poco mayores que el heptanoato, pero dado que se dispone de un espectro más reducido de sustratos derivados de MUF que en el caso de los derivados de *p*NP, no fue posible ensayar la actividad sobre sustratos con largos de cadena entre 8 y 12. La actividad sobre MUF-estearato (C18) y MUF-oleato (C18:1Δ9) es menor que sobre los derivados de MUF de cadena más corta.

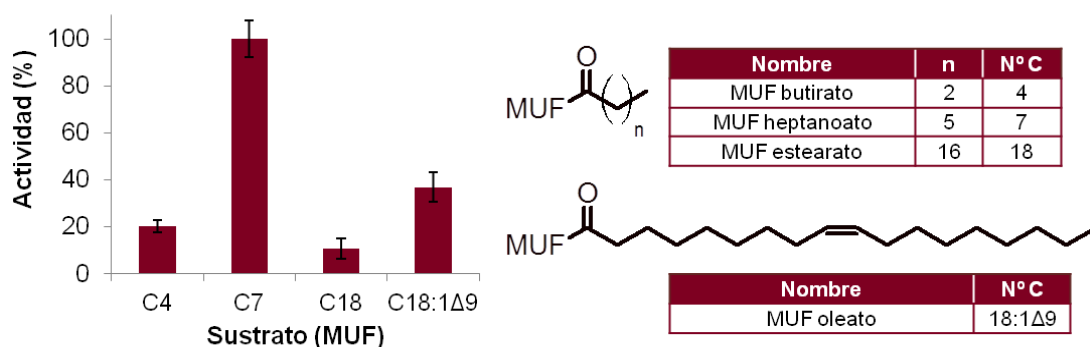


Figura 20: Porcentaje de actividad de Lip I.3 en función del sustrato para los derivados de MUF. El 100 % corresponde al sustrato para el cual Lip I.3 presenta máxima actividad. En la gráfica los derivados de MUF se indican por el número de átomos de C.

De los resultados obtenidos con ambos tipos de sustrato se puede concluir que Lip I.3 presenta preferencia por sustratos de cadena media, lo que se encuentra en concordancia con los resultados reportados para otras lipasas de la misma subfamilia.^{117,124,131,135,149} Teniendo en cuenta esto, los ensayos de actividad posteriores se realizaron utilizando los sustratos sobre los cuales la enzima presentó mayor actividad, es decir *p*NP caprato y MUF- heptanoato.

Condiciones óptimas de reacción

pH

Se determinó el pH óptimo para la actividad de la enzima mediante espectrofluorimetría, utilizando como sustrato MUF heptanoato. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 21.

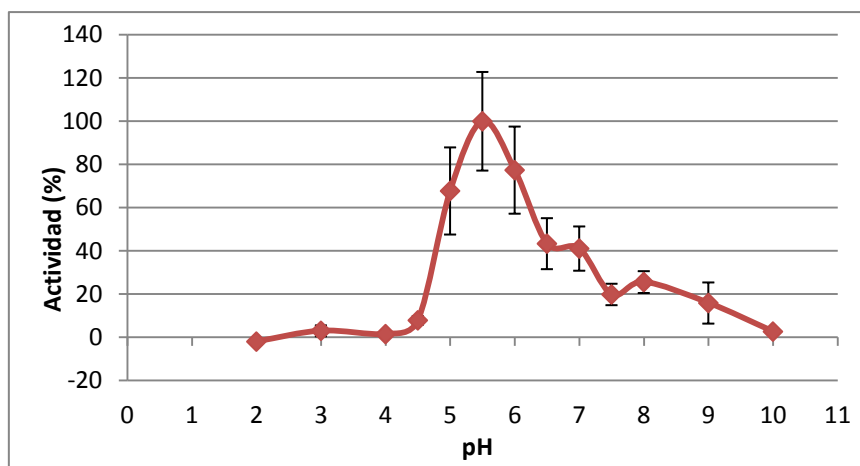


Figura 21: Actividad de Lip I.3 en función del pH. El 100 % corresponde al punto de máxima actividad.

Se observa que el pH óptimo para la actividad de esta lipasa se encuentra a pH 5,5. Las lipasas de la subfamilia I.3 reportadas con anterioridad a este trabajo presentaron pH óptimos entre 7 y 9,¹⁸ por lo que Lip I.3 de *Pseudomonas* CR-611 constituye la primera lipasa acidófila reportada perteneciente a esta subfamilia. A partir de estos resultados se decidió utilizar buffer acetato pH 5,5 para mantener el pH en el medio de reacción.

Temperatura

Se determinó la temperatura óptima de la enzima por espectrofluorimetría, utilizando MUF heptanoato como sustrato modelo. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 22.

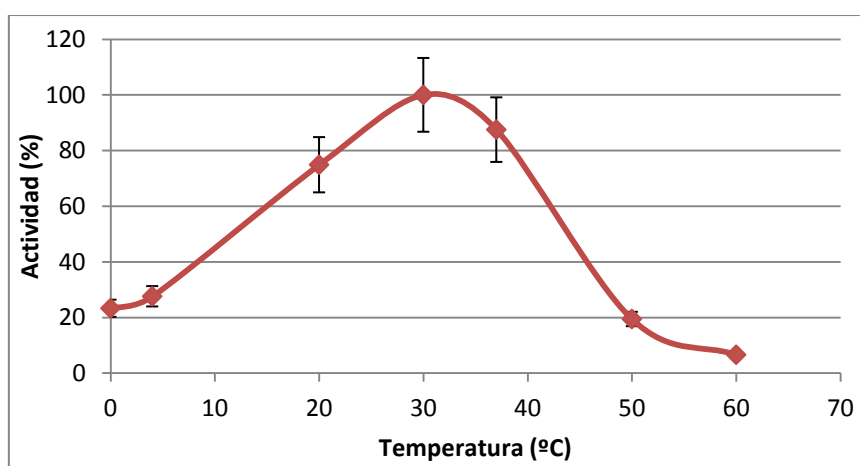


Figura 22: Porcentaje de actividad de Lip I.3 en función de la temperatura. El 100 % corresponde al punto de máxima actividad.

Se observa que la lipasa Lip I.3 tiene una temperatura óptima de 30 °C, con buena actividad entre 20 y 40 °C. A 50 °C su actividad cae por debajo de 20 %. Se realizaron también ensayos con derivados de *p*NP, obteniéndose la misma temperatura óptima (datos no mostrados). Si bien muchas lipasas de la subfamilia I.3 presentan temperaturas óptimas un poco mayores, entre 40 y 55 °C, el origen de las lipasas parece condicionar esta característica. Las lipasas reportadas previamente que provienen de metagenomas de suelos presentan temperaturas óptimas de 30 °C.^{97-99,134} La cepa *Pseudomonas* sp. CR-611 fue aislada de un suelo de bosque subtropical y su temperatura óptima de crecimiento es de 30 °C,¹⁷² por lo que el resultado obtenido para Lip I.3 está también relacionado con su origen y es esperable. En vista de los resultados obtenidos, los ensayos posteriores se realizaron a 30 °C.

Concentración de calcio

Se ha descrito previamente que las lipasas de la familia I.3 requieren la presencia de ión calcio para su actividad^{128,131,133,145}. Por este motivo se estudió la influencia de la concentración de calcio en la actividad de Lip I.3. Los resultados obtenidos para la hidrólisis de *p*NP-caprato en presencia de calcio en concentraciones entre 0 y 40 mM se muestran en la Figura 23.

En ausencia de calcio la enzima Lip I.3 es prácticamente inactiva sobre *p*NP-caprato. Sin embargo, al agregar calcio a una concentración de 1 mM la actividad de la enzima se multiplica por un factor de 38. A medida que se incrementa la concentración de este ión la actividad continúa aumentando hasta alcanzar un nivel de 20 mM, donde llega a su máximo, con una actividad 67 veces mayor a la obtenida en ausencia de calcio. Como se indicó anteriormente, este efecto de la concentración de calcio ha sido señalado en trabajos anteriores.^{128,131,133,145} Para SML y PML, se determinó que la influencia de la concentración de calcio en la actividad viene dada por la necesidad de fijar el Lid 1 mediante el ion calcio coordinado en la posición Ca1.^{125,133} El modelado molecular de Lip I.3 indica que es probable que ese sitio de unión a calcio se encuentre también en esta enzima; la evidencia experimental obtenida apoya esta hipótesis.

En consecuencia, se decidió utilizar para los ensayos posteriores una concentración de calcio de 10 mM, concentración a la cual la enzima presenta una actividad 60 veces superior a la obtenida en ausencia de este ión.

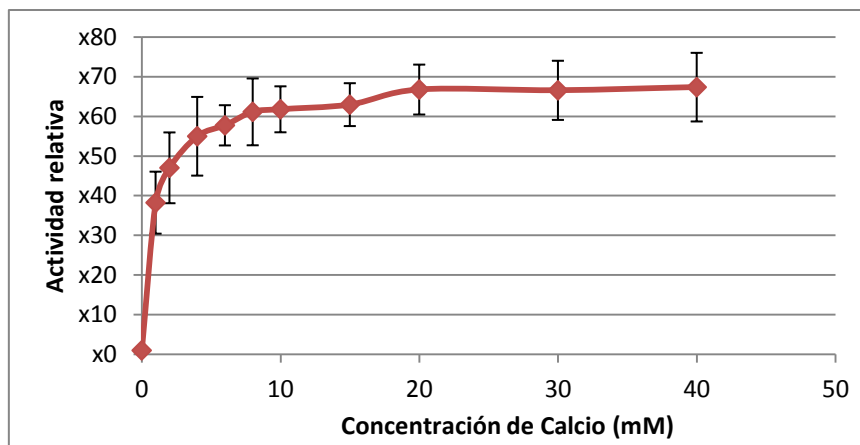


Figura 23: Actividad de Lip I.3 en función de la concentración de Ca^{++} . Se indica la actividad relativa respecto a la obtenida en ausencia de Ca^{++} .

Parámetros cinéticos

Se determinaron los parámetros cinéticos de la hidrólisis de MUF-heptanoato catalizada por Lip I.3, llevada a cabo en las condiciones óptimas de temperatura y pH, y en presencia de calcio 10 mM. En la Figura 24 se observa la relación entre la velocidad inicial y la concentración de sustrato. La enzima Lip I.3 presenta una cinética tipo Michaelis-Menten, sin evidencia de activación interfacial en las condiciones utilizadas para el análisis.

El modelo de la estructura tridimensional de Lip I.3 muestra que en esta enzima se encuentran presentes tanto el Lid 1 como el Lid 2, este último característico de lipasas de la subfamilia I.3. Sin embargo los resultados experimentales evidencian la ausencia de activación interfacial. Es posible que aunque los elementos estructurales estén presentes, no se requiera la formación de micelas del sustrato para que se produzca su apertura. Si bien la presencia de Tritón X-100® en el buffer de reacción podría estar influyendo en los resultados, se ha comprobado que en las condiciones de trabajo es posible observar la presencia de activación interfacial, dado que Bofill y colaboradores¹⁷³ detectaron activación interfacial en una lipasa de *Pseudomonas* sp. 42A2 utilizando la misma técnica. La lipasa PML de *Pseudomonas* sp. MIS38, cuya secuencia de aminoácidos es muy similar a Lip I.3, ha demostrado tener activación interfacial, mientras que la lipasa SML de *Serratia marcescens*, también muy cercana filogenéticamente, no la presenta. Se requiere de un estudio más detallado de las causas estructurales de la presencia o ausencia de activación interfacial para determinar con certeza las razones para estas diferencias.

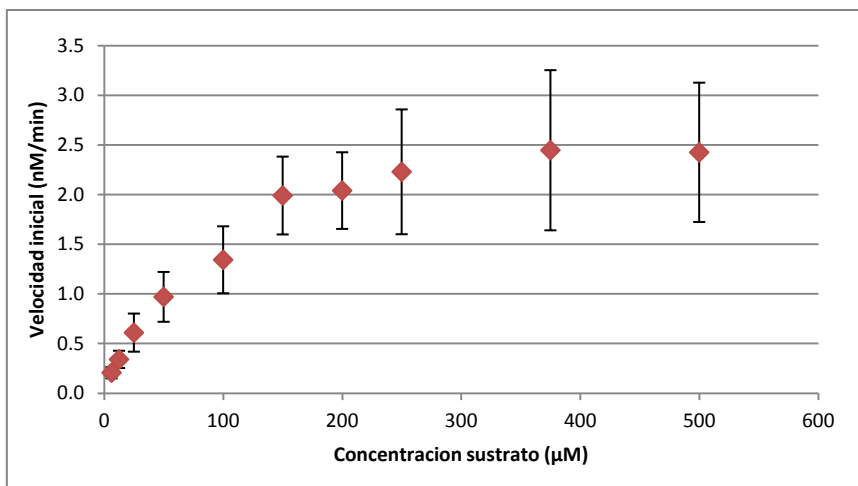


Figura 24: Velocidad inicial en función de la concentración de sustrato.

Utilizando estos valores se realizó el diagrama de Lineweaver-Burk (Figura 25), a partir del cual se obtuvo un valor de V_{max} aparente de $2,48 \pm 0,75 \times 10^3 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ y una K_m aparente de $382 \pm 47 \mu \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, constantes cinéticas cercanas a las descritas para otras lipasas con actividad sobre sustratos de similares características.¹⁹¹⁻¹⁹² El valor de Kcat para Lip I.3 es $8,0 \pm 2,4 \text{ min}^{-1}$.

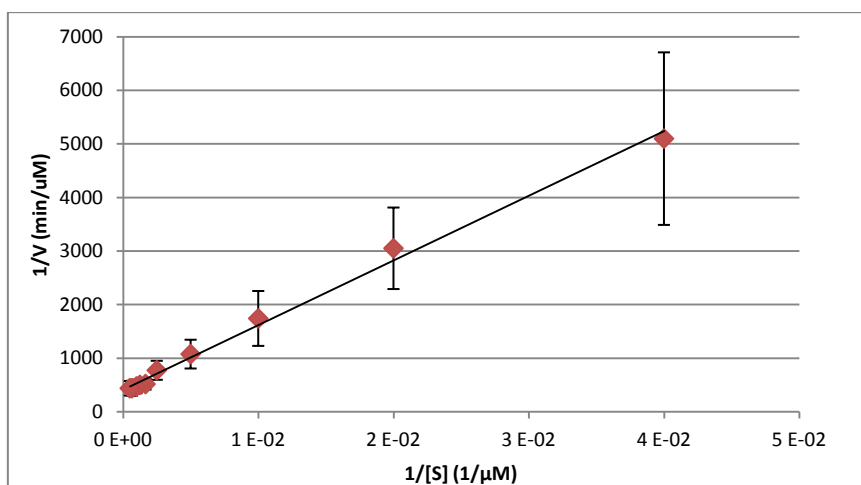


Figura 25: Diagrama de Lineweaver-Burk para Lip I.3

Estudio de inhibidores y activadores de Lip I.3

Se realizó un estudio de la influencia de distintas sustancias sobre la actividad de la lipasa Lip I.3 purificada. Las sustancias utilizadas fueron el agente caotrópico urea, los tensoactivos Tritón X-100® y dodecil sulfato de sodio (SDS, *sodium dodecyl sulfate*), y el inhibidor de serina hidrolasas fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride). También se analizó el efecto de la presencia de diversos iones y sales minerales, agentes frecuentemente utilizados en la industria o que podrían encontrarse en las aguas de los tratamientos. Todos los ensayos se realizaron valorando la actividad de la enzima por espectrofluorimetría en las condiciones óptimas de reacción, y en cada caso se incluyó en el medio de reacción el compuesto a estudiar. A continuación se muestran los resultados para los distintos compuestos.

Urea

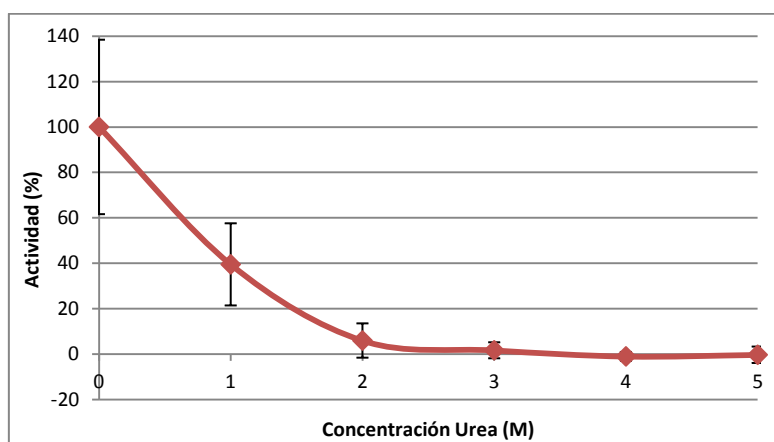


Figura 26: Porcentaje de actividad de Lip I.3 en función de la concentración de urea. El 100 % corresponde a la actividad de la enzima en ausencia de urea.

La presencia de urea no resultó favorable para la actividad de la enzima Lip I.3 (Figura 26). Concentraciones de urea de 1 M producen una disminución del 60 % en su actividad, y concentraciones mayores a 2 M la inhiben por completo. Durante la preparación del extracto crudo mediante el *Método 2* descrito en *Metodología*, la enzima es expuesta a una concentración de urea de 8M, que luego es eliminada mediante diálisis. Después de este procedimiento la actividad enzimática es restaurada, por lo que se concluye que la inhibición es reversible y que es fundamental un adecuado tratamiento mediante diálisis para la recuperación del 100% de la actividad. Esto también es así para otras lipasas de la subfamilia I.3 que han sido purificadas a partir de cuerpos de inclusión.^{98,117,143,146-147}

Tritón X-100®

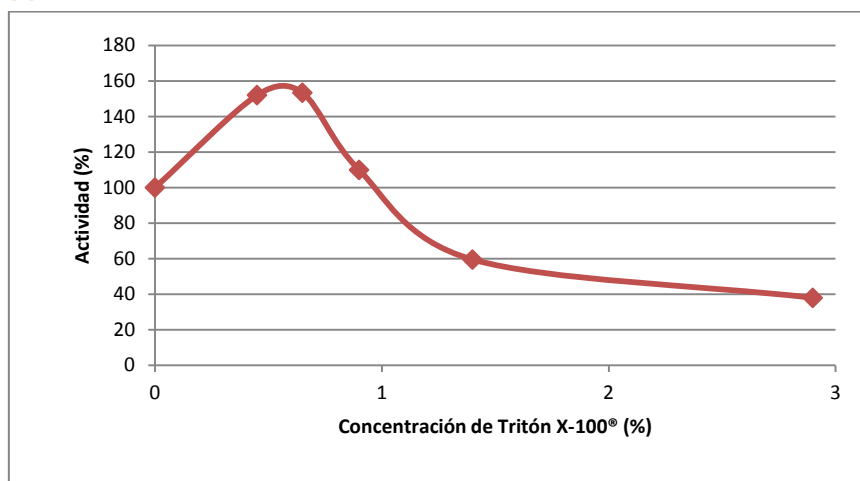


Figura 27: Actividad de la lipasa Lip I.3 en función de la concentración de Tritón X-100®. El 100 % corresponde a la actividad de la enzima en ausencia de Tritón X-100®.

Se observa que la presencia de Tritón X-100® a concentraciones menores a 1 % aumenta la actividad de la enzima (Figura 27). Sin embargo, a concentraciones mayores el efecto es el contrario, disminuyendo la actividad. Esto ha sido observado para otras lipasas,¹⁹³⁻¹⁹⁴ y se ha atribuido a que el detergente ayuda a estabilizar la conformación en la cual la lipasa se encuentra abierta y por lo tanto es activa.¹⁹⁴ Al sobrepasar cierta concentración el detergente comienza a desestabilizar la estructura terciaria de la lipasa, por lo que la actividad disminuye. Helistö y colaboradores obtienen el máximo de actividad a 0.015 % de Tritón X-100®, lo que se corresponden con la concentración micelar crítica (CMC) de este tensoactivo. Sin embargo otros autores han encontrado para otros tensoactivos no iónicos que el máximo de actividad se obtiene muy por debajo de la CMC.¹⁹⁵ Según los resultados mostrados anteriormente (ver Parámetros cinéticos), no se ha podido demostrar activación interfacial para Lip I.3, por lo que no sería de esperar que la apertura del Lid 1 estuviera involucrada. Además, en este caso, el máximo de actividad se encuentra cercano a 0.5 %, muy por encima de la CMC, lo que indica que no existe una relación directa entre el aumento en la actividad y la formación de micelas.

Se ha reportado también que el Tritón X-100® evita la formación de agregados de lipasas.¹⁹⁴ Durante las etapas de purificación de Lip I.3 se constató que esta enzima tiene tendencia a formar agregados, observándose turbidez en las muestras y precipitados al centrifugar, como ocurre con muchas lipasas descritas.^{173,188} Por lo tanto la acción activadora del Tritón X-100® a baja concentración puede deberse también a que este tensoactivo evite la agregación de la lipasa Lip I.3, manteniéndola en su estado activo. Esto se ve apoyado por el hecho de que el Tritón X-100® a concentraciones de 0,2 % y 0,5 % evita la agregación y la pérdida de actividad durante el almacenamiento a largo plazo de Lip I.3 (ver Estudios de estabilidad de Lip I.3). Además, el Tritón X-100® contribuye a mantener una emulsión más homogénea de los sustratos lipídicos,¹⁹⁶ lo que también puede contribuir favorablemente a la actividad lipolítica.

SDS

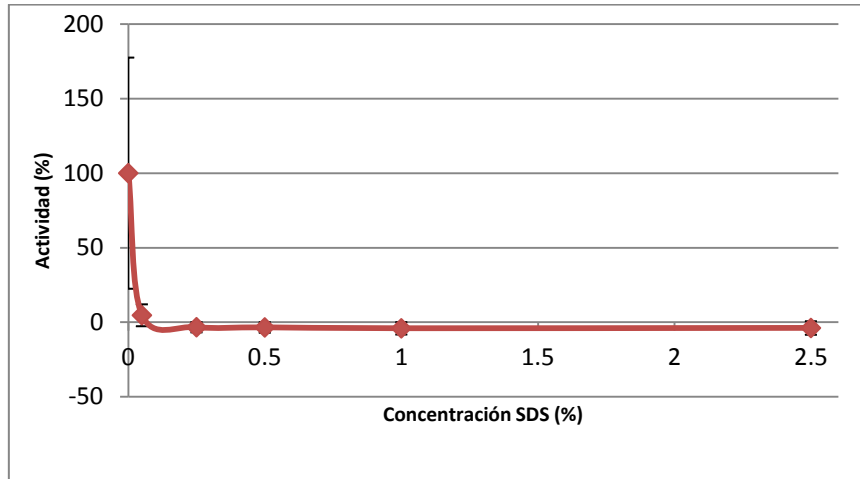


Figura 28: Actividad de Lip I.3 en función de la concentración de SDS
El 100 % corresponde a la actividad de la enzima en ausencia de SDS

El SDS también inhibe la actividad de Lip I.3, incluso a concentraciones bajas (Figura 28). Esto se observó también para la lipasa de *Ps. fluorescens* SIK W1,¹¹⁷ aunque para la lipasa de *S. marcescens* Sr41 8000 el efecto fue el contrario, observándose un aumento en la actividad.¹²⁴ Al igual que en el caso de la urea, los datos experimentales comprueban que esta inhibición es reversible, dado que en los zimogramas realizados sobre geles de SDS-PAGE es posible detectar la actividad de esta lipasa una vez que se ha eliminado el SDS con los lavados.

PMSF

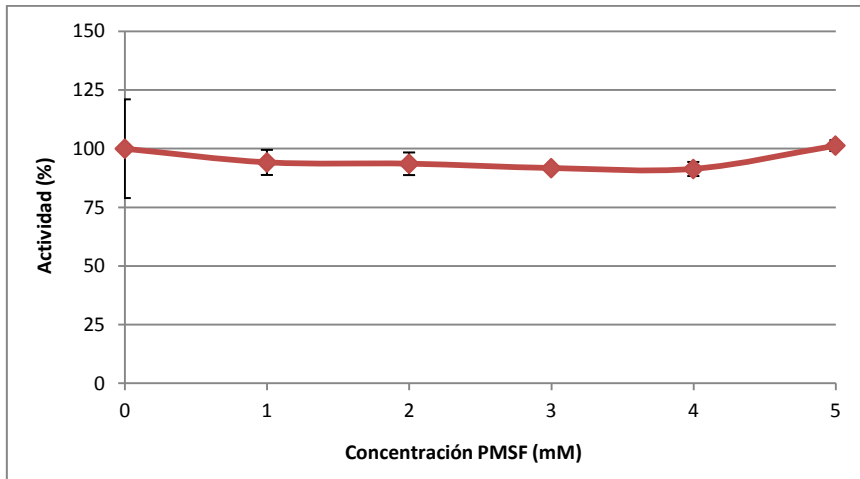


Figura 29: Actividad de Lip I.3 en función de la concentración de PMSF.
IF: incremento de fluorescencia

La lipasa Lip I.3 posee serina como aminoácido catalítico y es por lo tanto esperable que sea inhibida por PMSF como la mayoría de las serina hidrolasas. Sin embargo, los resultados experimentales muestran que el PMSF no influye en la actividad de esta lipasa, manteniéndose en el 100 % incluso a concentraciones de PMSF de 5 mM (Figura 29). La falta de inhibición se ha observado previamente en otras serina hidrolasas,¹⁹⁷⁻²⁰⁰ incluyendo la lipasa de *Ps. fluorescens* SIK W1¹¹⁷ y la lipasa de *S. marcescens* Sr41 8000.¹²⁴ Se ha postulado que esto puede deberse a factores estructurales, que no permiten que el PMSF ingrese al sitio activo.^{117,198,200} Tanto Lip I.3 como la lipasas de *Ps. fluorescens* SIK W1 y la lipasa de *S. marcescens* Sr41 8000 actúan preferentemente sobre sustratos de cadena media, lo que indica una restricción en el tamaño de los sustratos que ingresan al sitio activo. Por lo tanto, es posible que haya factores estéricos que impidan la entrada del PMSF al mismo, evitando la inhibición por este compuesto.

Sales minerales

Se realizó un estudio de la influencia de diversas sales minerales sobre la actividad de Lip I.3, incluyendo sales metálicas y sales de amonio. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 30.

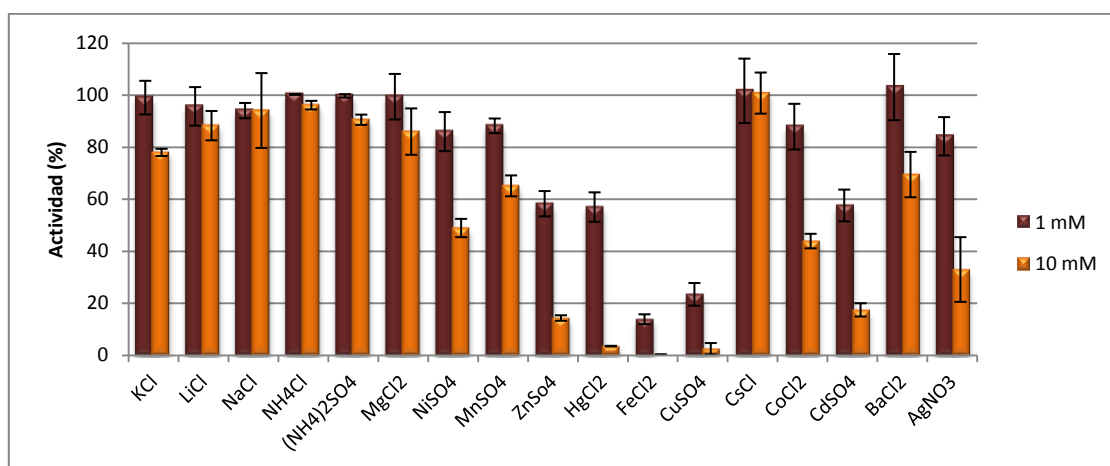


Figura 30: Efecto de la presencia de diversos compuestos sobre la actividad de Lip I.3. El 100 % corresponde a la actividad de la enzima en ausencia de las sales indicadas

Entre los compuestos ensayados muchos no influyen en la actividad de la enzima a 1 mM, aunque al aumentar la concentración a 10 mM también aumenta la inhibición. LiCl, NaCl, NH₄Cl, (NH₄)₂SO₄, MgCl₂, y CsCl prácticamente no influyen en ninguna de las dos concentraciones. KCl y BaCl₂ no influyen a 1 mM, pero disminuyen la actividad por debajo de 80 % a concentraciones de 10 mM. La presencia de FeCl₂ 1mM inhibe casi completamente a Lip I.3, y su actividad disminuye hasta el 20 % en presencia de CuSO₄ 1 mM. Fe(II) y Cu(II) han mostrado inhibir también la actividad de las lipasas de *S. marcescens* Sr41 8000¹¹⁷ y de *Ps. fluorescens* HU380.¹⁴⁵ Zinc, mercurio y cadmio también son inhibidores de la enzima, aunque menos drásticos. Níquel, manganeso y cobalto producen una acción negativa sobre la actividad aún más moderada. Otras lipasas de la subfamilia I.3 son activadas por los iones divalentes magnesio y manganeso,^{117,124,134} pero no fue posible observar activación con ninguna de las sales ensayadas para Lip I.3.

Estudio de estabilidad de Lip I.3

Estabilidad a la temperatura

Se realizaron dos tipos de estudios de estabilidad frente a diferentes temperaturas de incubación o de almacenamiento. Por una parte se analizó la resistencia a la temperatura mediante la determinación de la actividad residual tras una pre-incubación de 1 hora a distintas temperaturas. En segundo lugar se analizó también la estabilidad de la enzima durante el almacenamiento a largo plazo a tres temperaturas diferentes. Ambos ensayos se realizaron por espectrofluorimetría, sobre MUF-heptanoato.

Ensayos de resistencia a la temperatura

La resistencia de Lip I.3 a la temperatura se determinó por medio de ensayos en los cuales se pre-incubó el *Mix de enzima* (ver Metodología) conteniendo la lipasa, por 1 hora a las distintas temperaturas indicadas. Luego se realizó el ensayo de actividad en la forma usual. Para determinar el 100 % de actividad se midió la actividad de la enzima en el momento de comenzar la pre-incubación.

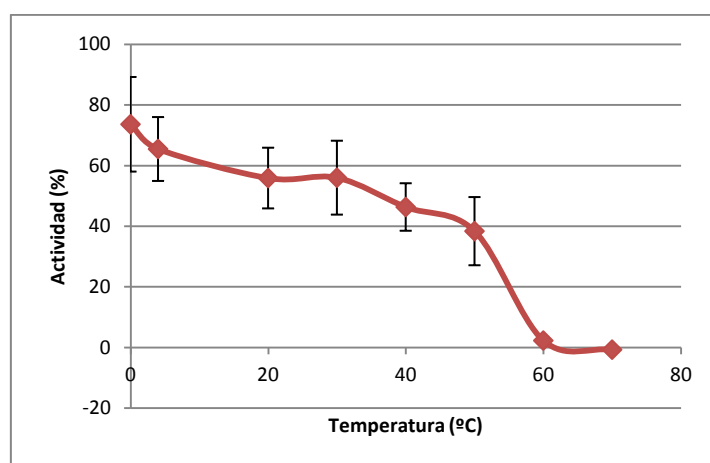


Figura 31: Actividad en función de la temperatura de pre-incubación. El 100 % corresponde a la actividad de la enzima antes de la pre-incubación.

Se observa en la Figura 31 que la enzima presenta el 60% de su actividad inicial tras una incubación de 1 hora a 30 °C, por lo que la actividad de la enzima disminuye en un 40 % durante el tiempo de los ensayos. A 50 °C aún se mantiene un 40 % de la actividad, que disminuye prácticamente a 0 cuando la temperatura de preincubación es de 60 °C, probablemente por desnaturalización de la enzima. Debe señalarse que estos ensayos fueron realizados en ausencia de Tritón X-100®. Como se comprobó anteriormente y como se verá en la próxima sección, este compuesto influye notoriamente en la actividad de Lip I.3, por lo que se deberían repetir estos ensayos en presencia de Tritón X-100®.

Ensayos a largo plazo

Se analizó la resistencia en el almacenamiento a largo plazo de Lip I.3. Estos ensayos fueron realizados a tres temperaturas, -20 °C, 4 °C y temperatura ambiente (aprox. 25 °C). Como buffer para el almacenamiento de la enzima se utilizó Tris-HCl 20 mM pH 7, tanto en ausencia como en presencia de Tritón X-100® al 0,2 % y al 0,5 %. En la Figura 32 se muestran los resultados obtenidos.

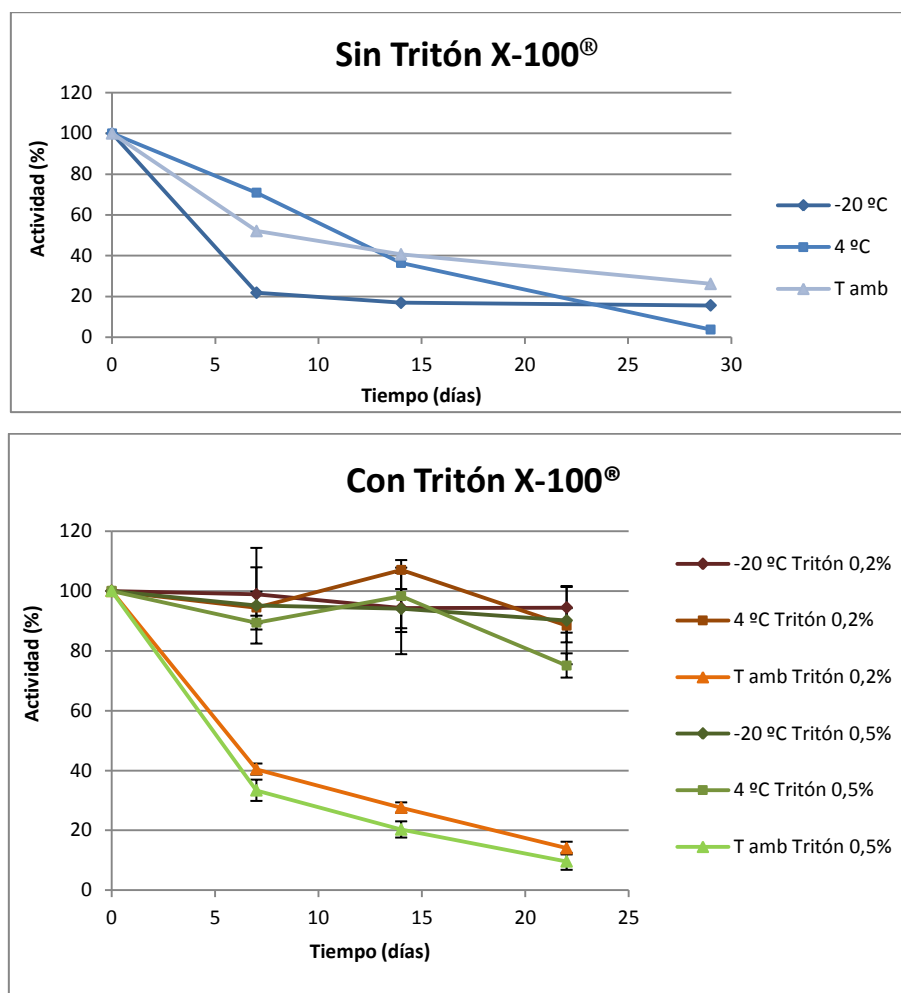


Figura 32: Estabilidad de Lip I.3 frente al almacenamiento a largo plazo. El 100 % corresponde a la actividad del día 0. Sin tritón X-100®: La enzima se almacenó en buffer Tris 20 mM pH 7; Con tritón X-100®: La enzima se almacenó en buffer Tris 20 mM pH 7 con Tritón X-100® a dos concentraciones, 0,2 y 0,5 %.

Se observa que en ausencia de Tritón X-100® la lipasa Lip I.3 pierde actividad durante el almacenamiento a las tres temperaturas ensayadas. En cambio al agregar Tritón X-100®, a 4 °C y a -20 °C la actividad se mantiene cerca del 100 %. Esto puede ser consecuencia de que la pérdida de actividad a estas temperaturas se deba a la formación de agregados, que se ve favorecida a temperaturas bajas y que puede evitarse al añadir un tensoactivo como el Tritón X-100®.¹⁹³ La pérdida de actividad a temperatura ambiente podría deberse a otras causas como el deterioro de la enzima por acción de proteasas, que no son evitadas por la presencia de Tritón X-100®, observándose incluso un aumento significativo en la pérdida de actividad al aumentar la concentración de Tritón X-100® de 0,2 a 0,5 %. A los 22 días se observa que la actividad de la enzima almacenada con Tritón X-100® 0,5 % disminuye más que cuando la enzima es almacenada con 0,2 % de Tritón X-100®. Sin embargo, las diferencias encontradas

no son significativas, por lo que podrían usarse cualquiera de las dos concentraciones de Tritón X-100®. En consecuencia, se decidió utilizar buffer Tris 20 mM con Tritón 0,2 % para el almacenamiento de Lip I.3 a temperaturas inferiores a 20 °C. Se deberán realizar ensayos a tiempos mayores para determinar si hay diferencias entre el almacenamiento a -20 °C y a 4 °C. En el margen de tiempo analizado, al utilizar Tritón X-100® a una concentración de 0,2 % Lip I.3 presenta buena estabilidad a -20 °C y a 4 °C.

Estabilidad al pH

Se analizó también la resistencia al pH de Lip I.3 mediante la determinación de la actividad residual tras una pre-incubación de 1 hora con buffer ATB con distintos valores de pH y a temperatura ambiente. El ensayo se realizó por espectrofluorimetría, utilizando como sustrato MUF-heptanoato.

En la Figura 33 se observa que Lip I.3 no resiste bien los valores de pH muy ácidos, perdiendo más del 80 % de su actividad tras una incubación de 1 hora a pH 4 o menor. Sin embargo muestra buena resistencia a los valores de pH de 5 o mayores, manteniendo el 80 % de su actividad después de 1 hora de incubación en estas condiciones. Estos resultados son similares a los obtenidos por Jiang y colaboradores para la lipasa lipJ02 proveniente de metagenomas.⁹⁷ La lipasa lipJ03 reportada en el mismo trabajo y la lipasa de *Ps. fluorescens* B52 reportada por el mismo grupo¹²¹ presentan también buena resistencia a valores de pH entre 5 y 10, pero su actividad residual es menor (65%). Por el contrario, otras lipasas de la subfamilia I.3 presentan resistencia a rangos de pH más restringidos.^{99,117,124,127,134,145}

Debe señalarse además que es posible que la disminución de actividad observada para Lip I.3 a pH mayores de 5 se deba a la temperatura y no al pH. Los resultados mostrados anteriormente en *Ensayos de resistencia a la temperatura* indican una pérdida de actividad tras incubar 1 hora a temperatura ambiente. Los resultados obtenidos para pH y temperatura se realizaron en distintas condiciones, por lo que resulta difícil compararlos. Deberán realizarse ensayos de estabilidad combinando distintas condiciones de pH y temperatura para determinar de qué forma influye cada factor en la pérdida de actividad.

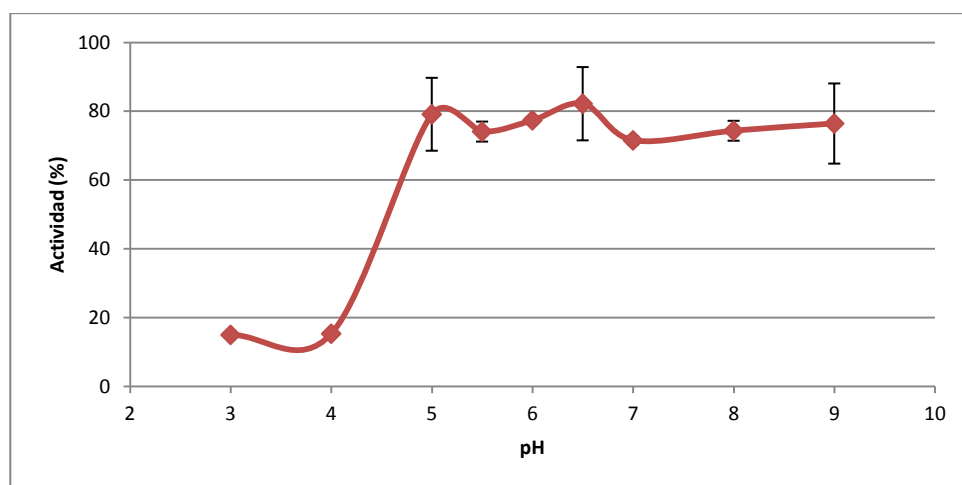


Figura 33: Actividad en función del pH de pre-incubación durante 1 hora. El 100 % corresponde a la actividad de la enzima antes de la pre-incubación.

Capítulo 3

Capítulo 3

Búsqueda de nuevas lipasas mediante genotecas

Las lipasas disponibles actualmente han permitido numerosos avances en el campo de la biocatálisis y la biotecnología. Sin embargo, existen aún muchos procesos para los que no se cuenta con lipasas adecuadas. La biodiversidad existente en nuestro planeta posee un enorme potencial como fuente de biocatalizadores novedosos, pero muchos de los organismos presentes en el ambiente no pueden ser cultivados. La exploración de metagenomas nos permite acceder a parte de la biodiversidad no cultivable y nos brinda la oportunidad de descubrir enzimas con actividad novedosa.^{79,92}

Con el objetivo de explorar la biodiversidad presente en nuestro país, en este trabajo se planteó la búsqueda de nuevas lipasas en los metagenomas de dos ambientes diferentes. Se eligió un ambiente afectado por la contaminación, cuya comunidad microbiana está altamente influenciada por los desechos resultantes de la actividad humana, y otro libre de contaminación. Para la detección de lipasas, se cuenta con un método en placa que permite evidenciar actividad hidrolítica sobre triglicéridos, lo que permitió realizar un análisis funcional de la genoteca metagenómica construida.

Extracción y purificación de ADN

Se recolectaron muestras de lodo de dos ambientes acuáticos: un ambiente contaminado (L1, playa de la Bahía de Montevideo adyacente a la refinería de ANCAP en La Teja) y un ambiente libre de contaminación (L2, lago de reserva de agua de OSE del arroyo Canelón Grande), según se muestra en la figura 34. Las muestras se guardaron a -20 °C hasta su procesamiento.

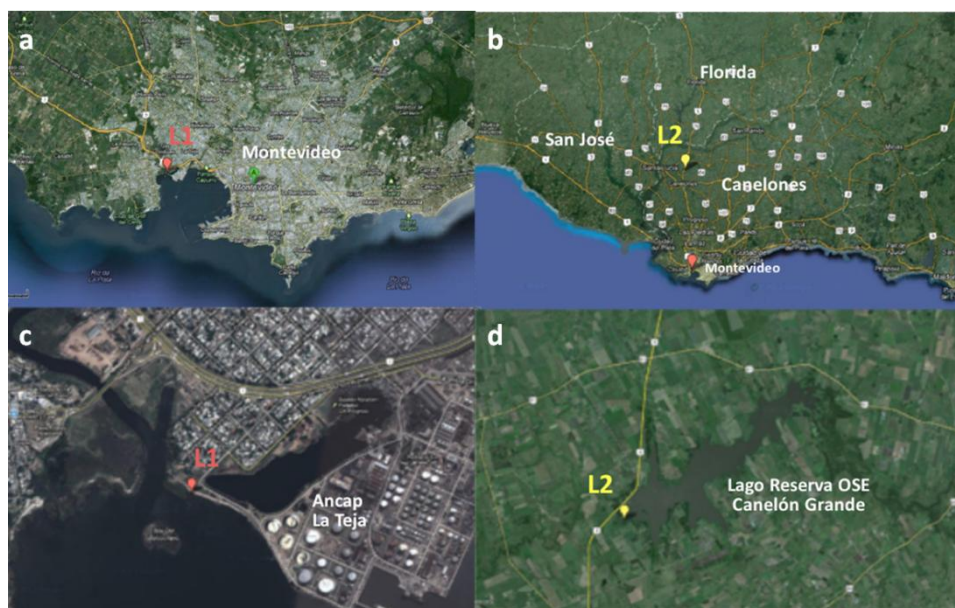


Figura 34: Sitios de recolección de muestras para extracción de ADN metagenómico. En b se pueden ver los dos sitios. a y c) detalle de la zona en donde se tomó la muestra de ambiente contaminado (L1); d) detalle de la zona donde se tomó la muestra de ambiente libre de contaminación (L2).

Extracción, purificación y digestión del ADN de la muestra L1

Para la extracción de ADN metagenómico se realizó un procedimiento basado en el descrito por Uchiyama y Watanabe.²⁰¹ Este método implica la lisis de las células utilizando lisozyrna y el tensoactivo CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio), e incluye un paso de purificación mediante extracción con fenol. En el mencionado paso de purificación surgieron dificultades para separar las fases en la extracción con fenol, lo que produjo pérdida de parte del ADN de la muestra. Por este motivo se debieron realizar modificaciones a la misma, cambiando la extracción con fenol por una extracción con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), y realizando la segunda extracción con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Mediante este procedimiento modificado fue posible obtener ADN de calidad adecuada, con un tamaño promedio superior a los 15 Kpb. Para la construcción de la genoteca, es necesario digerir el ADN metagenómico obtenido. Se seleccionó para ello la enzima *BfuC* I (isozima de *Sau3A* I), de corte frecuente, lo que permite obtener una mayor diversidad en los fragmentos, comparado con enzimas de corte menos frecuente. Para evitar la degradación escasa o excesiva del ADN, es necesario optimizar previamente las condiciones para la digestión, por lo que se realizaron ensayos a pequeña escala utilizando distintas concentraciones de enzima para un mismo tiempo de digestión. Sin embargo, en todo el rango de concentraciones de enzima estudiado (de 8 a 40 mU/ μ L), se encontró una fuerte inhibición de la actividad enzimática (figura 35a). La presencia de compuestos que inhiben la digestión se confirmó mediante el ensayo de actividad de *BfuC* I frente al plásmido purificado pET22b(+) en presencia y ausencia de la muestra de ADN metagenómico (figura 35b).

Para lograr eliminar los compuestos contaminantes que producían inhibición de la digestión se analizaron tres métodos distintos de purificación del ADN metagenómico, los que se describen en la tabla 3.

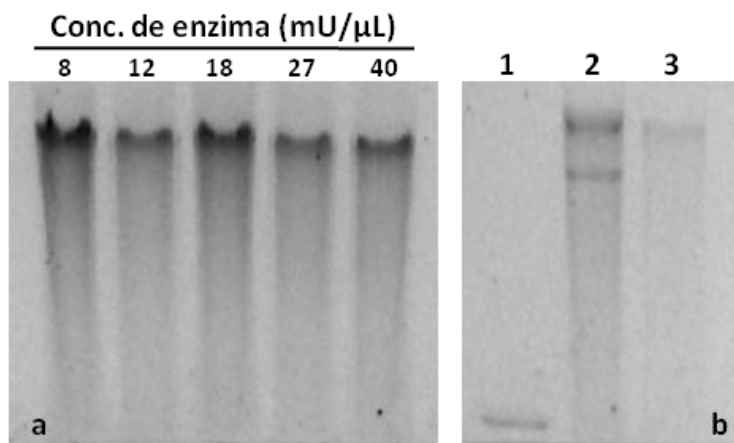


Figura 35: Evidencia de la presencia de inhibidores de la digestión en las muestras de ADN metagenómico. a) Digestión de ADN metagenómico con distintas concentraciones de *BfuC* I; b) Controles de la digestión. 1: pET22b+ digerido con *BfuC* I; 2: digestión de pET22b+ con *BfuC* I en presencia de ADN metagenómico; 3: pET22b+ sin digerir

Tabla 3: Métodos utilizados para la purificación del ADN metagenómico para L1

Método	Descripción
1	Almacenamiento de la muestra a 4 °C y separación del precipitado coloreado que se forma a en frío.
2	Extracción con fenol y posterior extracción con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1)
3	Lavado del ADN con buffer TE utilizando concentradores Millipore UFC4LGC25 (10000 NMWL)..

Al almacenar la muestra en frío se observó la aparición de un precipitado con coloración marrón, que podía corresponder a impurezas presentes en la muestra, por lo que el método 1 planteado consistió en la remoción de dicho precipitado. Sin embargo, se comprobó que el precipitado contenía ADN además de las impurezas, siendo mayor la cantidad de éste en el precipitado que en el sobrenadante (figura 36a), por lo que se descartó este método. El método de extracción de ADN utilizado fue modificado cambiando una etapa de extracción con fenol por una con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). Esto puede haber ocasionado que algunas impurezas no hayan sido completamente eliminadas, de modo que para compensar el cambio realizado se plantea el método 2. El ADN purificado se somete a una extracción con fenol y luego se aplica una etapa de extracción con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) para disminuir la concentración de fenol. Una forma de eliminar las impurezas solubles consiste en el lavado de la muestra con buffer TE mediante la utilización de concentradores que dejen pasar las impurezas pero no el ADN (método 3). Se lava la muestra varias veces, eliminando un filtrado de color marrón-amarillo. Las muestras recuperadas luego de aplicar los tres métodos de purificación fueron analizadas para determinar la presencia de inhibidores de la digestión (figura 36b). Los tres métodos ensayados resultaron eficientes para eliminar la inhibición, si bien el método 1 afecta fuertemente el rendimiento por lo cual se descarta su uso. Se decide utilizar el método 3 para la purificación del ADN metagenómico, debido a que la muestra obtenida resulta más limpia que en el caso de la extracción con fenol (figura 36a), y el método es menos nocivo para el operador y el medioambiente.

Sin embargo, al llevar este método a mayor escala se recuperó poca cantidad de ADN, probablemente debido a la pérdida de solución durante el centrifugado dentro del concentrador. Se realizó una nueva extracción de ADN metagenómico, la cual se purificó mediante el método 3 disminuyendo tanto la velocidad de centrifugado como el volumen de muestra utilizado en cada concentrador. Luego de limpiar la muestra, se obtuvieron aproximadamente 26 µg de ADN entre las dos purificaciones realizadas.

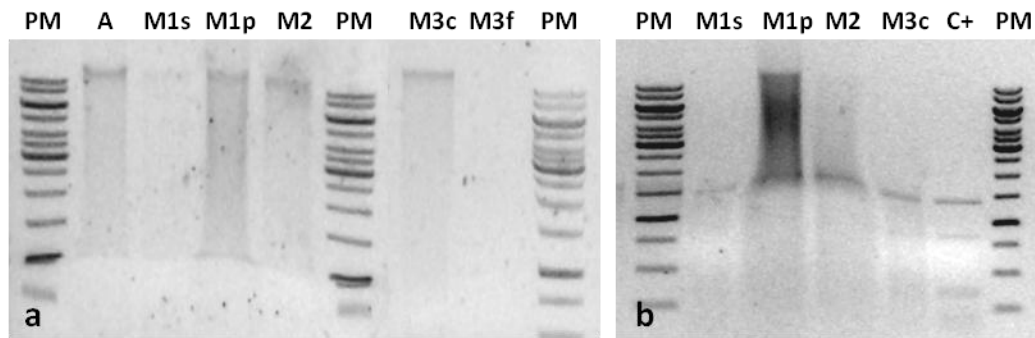


Figura 36: Comparación de métodos de purificación del ADN metagenómico. a) ADN recuperado luego de la purificación b) Análisis de la presencia de inhibidores de la digestión mediante digestión de pET22b+ en presencia de las muestras de ADN. A: ADN metagenómico sin purificar (muestra de partida); M1: método 1; s: sobrenadante; p: precipitado; M2: método 2; M3: método 3; c: concentrado; f: filtrado; C+: digestión de pET22b+; PM: escalera de peso molecular (GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, Fermentas)

Una vez obtenida una cantidad adecuada de ADN, se comprobó nuevamente la eliminación de los compuestos inhibidores de la digestión, y se procedió a optimizar las condiciones para la digestión con la enzima *BfuC I*. Se determinó que la concentración de enzima necesaria para lograr una digestión adecuada era de 80 mU/μL, utilizando un tiempo de incubación de 1hr a 37 °C, al digerir 26 ng/μL de ADN (figura 37a y b). Sin embargo, al realizar la digestión a mayor escala de la muestra en las condiciones determinadas como óptimas, la digestión no se produjo como se esperaba (figura 37c). Se realizó una nueva digestión de la misma muestra con *BfuC I* en una concentración de 40 mU/μL, también con 1 hr. de incubación a 37 °C. Luego de la segunda digestión se obtuvo un tamaño promedio adecuado para la construcción de la genoteca (figura 37d). Los fragmentos de ADN con tamaño entre 2500 y 6000 pb fueron aislados mediante cromatografía en gel y purificados utilizando el kit SNAP (Invitrogen).

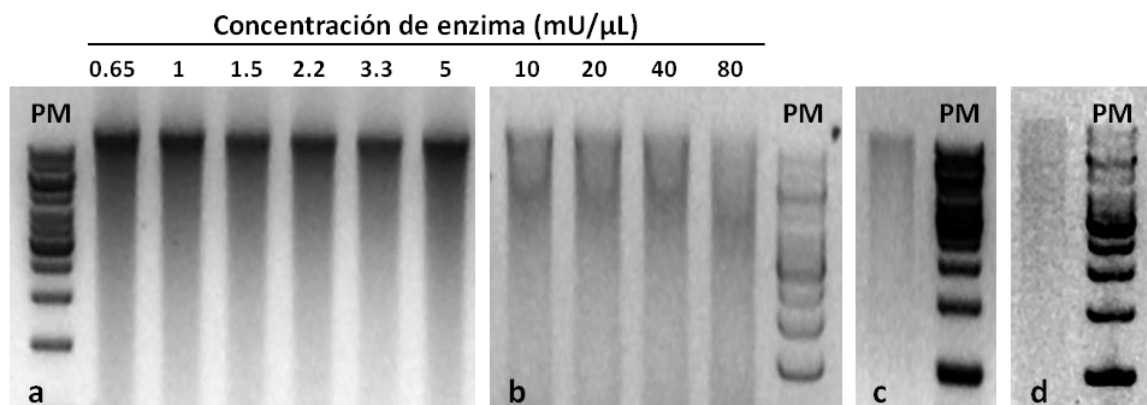


Figura 37: a y b) Optimización de la digestión con *BfuC I*. Se indica en cada caso la concentración de enzima utilizada. c) Digestión a mayor escala de la muestra purificada de ADN metagenómico con *BfuC I* (ADN 26 ng/μL, enzima 80 mU/μL, 37 °C, 1hr). d) Segunda digestión del ADN metagenómico. Se agregaron 40 mU/μL de *BfuC I* y se incubó a 37 °C por 1hr. PM: escalera de peso molecular (GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, Fermentas)

Extracción, purificación y digestión del ADN de la muestra L2

Dado que la muestra L1 fue procesada con anterioridad a la muestra L2, el procedimiento inicial realizado sobre L2 se basó en los resultados obtenidos con L1. Se siguió el procedimiento descrito por Uchiyama y Watanabe,²⁰¹ con las modificaciones utilizadas para L1. Luego de la extracción, las muestras de ADN obtenidas a partir del Lago del Canelón Grande (L2) presentaron una coloración marrón más intensa que las muestras obtenidas a partir de la Bahía de Montevideo (L1). Sin embargo, todas contenían ADN de alto peso molecular sin degradar (figura 38a). Al igual que para L1, se procedió a eliminar los posibles inhibidores de la digestión con *BfuC I* de la muestra mediante lavados con buffer TE en concentradores Millipore UFC4LGC25 (10000 NMWL). Este procedimiento, que había dado buenos resultados con la muestra L1, no logró remover la inhibición para la muestra L2. En este caso se observó la obstrucción de los filtros utilizados, lo cual impidió el adecuado lavado del ADN. En el gel de la figura 38b se observa que no fue posible digerir el ADN, dado que en todos los casos se mantuvo la inhibición de la enzima.

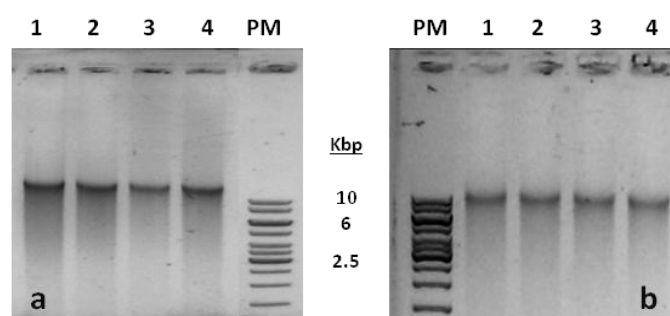


Figura 38: a) Muestras de ADN metagenómico extraídas del lodo proveniente de L2 b) Digestión del las mismas muestras de ADN metagenómico con *BfuC I*. Los números sobre las filas corresponden a distintas fracciones de la misma muestra. PM: Marcador de peso molecular. Se indica el peso molecular en Kpb de las bandas más importantes

Con el fin de eliminar la inhibición se realizaron diversos intentos de purificación del ADN obtenido, utilizando distintos métodos (Tabla 4). Al aplicar el método 1, basado en un kit comercial, se recuperó muy baja cantidad de ADN. Este kit generalmente da muy buenos resultados para la extracción de ADN de suelo en pequeñas cantidades, pero no fue adecuado para la purificación del ADN ya extraído. El método de electroelución (método 2) también resultó en una muy baja recuperación de ADN, el cual además presentó degradación parcial. El método 3 se basó en la afinidad del ADN por la capa orgánica o la acuosa en diferentes condiciones. Esta afinidad depende del grado de disociación de los ácidos desoxirribonucleicos, el cual está relacionado con el pH. Al acidificar el medio el ADN se protona, por lo que forma una especie no cargada con preferencia por la fase orgánica. Al aumentar el pH se produce la disociación del ácido, formando especies cargadas con preferencia por la capa acuosa. Al aplicar este método, no fue posible lograr una buena extracción en la capa orgánica. Se requeriría optimizar las condiciones para lograr que el método sea aplicable. La purificación con carbón activado (método 4), resultó en la clarificación de la muestra. El carbón activado se separó por centrifugado, obteniéndose un ADN de buena calidad. Por último se analizó un método basado en la diálisis de la muestra frente a buffer TE (pH 8.0) y posterior purificación utilizando columnas de Sepharosa S-200 (método 5).

Tabla 4: Métodos utilizados para la purificación del ADN metagenómico para L2

Método	Descripción
1	MOBIO PowerSoil DNA isolation kit (Kit comercial)
2	Electroelución
3	Extracción secuencial: Disminución de pH y posterior extracción con CHCl ₃ , para luego extraer con buffer de pH básico.
4	Agregado de carbón activado y separación por por centrifugado.
5	Diálisis de la muestra frente a buffer TE (pH 8.0) y posterior purificación utilizando columnas de Sepharosa S-200.

La presencia de compuestos que inhiben la digestión fue ensayada para la muestra original, así como para las purificaciones mediante los métodos 3 y 4, mediante un ensayo de actividad de *BfuC* I frente al plásmido pUC19 digerido en presencia y ausencia de la muestra de ADN metagenómico (Fig. 39a). Como ninguno de estos métodos funcionó, se analizó posteriormente el método 5. En este caso se observó digestión con la enzima *BfuC* I sobre el ADN metagenómico, por lo que se concluye que la inhibición fue eliminada (Figura 39b)

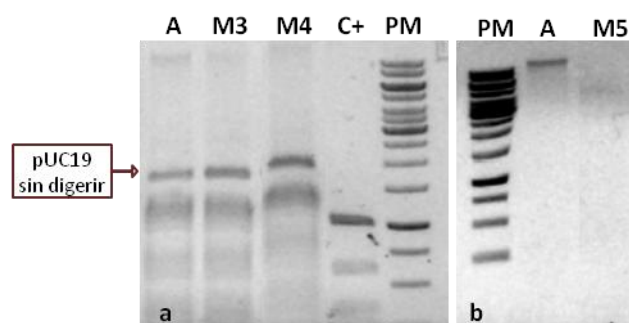


Figura 39: a) Análisis de la presencia de inhibidores de la digestión en las muestras de ADN purificadas. Para los métodos 1 a 4 se analizó la digestión de pUC19 con *BfuC* I en presencia de la muestra. Para el método 5 se analizó la digestión directa de la muestra con *BfuC* I. A: ADN metagenómico sin purificar (muestra de partida); M3: método 3; M4: método 4; M5: método 5; C+: digestión de pUC19 con *BfuC* I; PM: escalera de peso molecular (GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, Fermentas).

Construcción de la genoteca

Dado que no se logró obtener suficiente cantidad de ADN a partir de la muestra L2, no fue posible construir genotecas metagenómicas a partir del hábitat no contaminado. Por lo tanto los resultados que siguen se refieren a la muestra L1, obtenida de la playa de la Bahía de Montevideo adyacente a la refinería de ANCAP en La Teja. Como se indicó anteriormente, el ADN fue digerido con la enzima *BfuC I*, y se aislaron los fragmentos con tamaños entre 2.5 y 6 Kpb. Posteriormente, se construyó una genoteca mediante el clonado de los fragmentos purificados en el vector pUC19. El procedimiento completo se esquematiza en la figura 40.

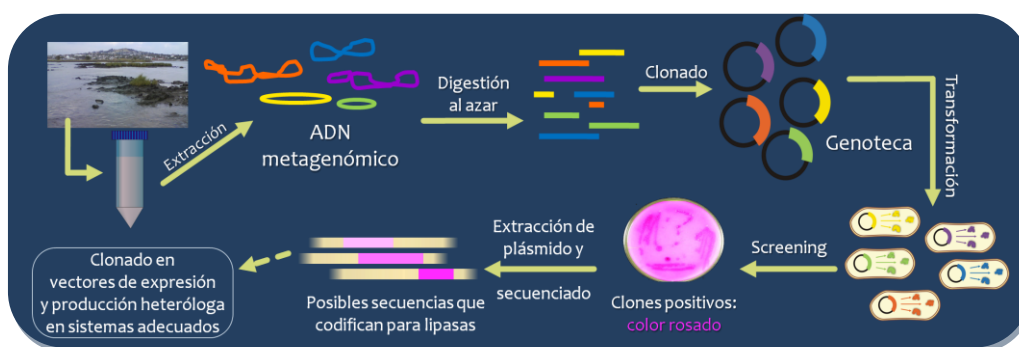


Figura 40: Construcción y análisis de la genoteca metagenómica

Análisis de la genoteca

La genoteca construida se utilizó para transformar la cepa *E. coli* TOP10 mediante electroporación. Se analizaron aproximadamente 25000 transformantes, conteniendo cerca de 137 Mpb de ADN, lo cual representa un grado de cobertura similar a lo reportado previamente para otros metagenomas.⁹² Se analizó la genoteca mediante siembra en agar nutriente conteniendo aceite de oliva y rodamina (MLip), en el cual los clones con actividad lipolítica pueden distinguirse por su coloración rosada. Se encontraron 19 clones con coloración rosada fuerte, y numerosos clones con coloración rosada más suaves.

Análisis de los clones positivos

Se realizó la extracción de plásmido de 7 clones positivos. Entre ellos, algunos tenían insertos muy pequeños o presentaron inestabilidad, por lo que fueron descartados. Se enviaron a secuenciar tres plásmidos de clones positivos. Los nombres y tamaños de inserto de estos plásmidos se indican en la tabla 5.

Tabla 5: Plásmidos enviados a secuenciar

Nombre	Tamaño de inserto (pb)
PPIV11A	4000
PPIV11B	4000
PPIV15A	3500

PPIV11A

El secuenciado del inserto presente en este clon permitió detectar la presencia de un marco abierto de lectura (Figura 41), el cual mostró 65% de identidad con una carboxipeptidasa previamente reportada perteneciente a la cepa *Thermus aquaticus* YT-1.²⁰² Las carboxipeptidasas catalizan la hidrólisis de enlaces peptídicos, por lo que poseen dominios conservados entre las enzimas hidrolíticas, de forma que este gen podría ser el responsable de la actividad observada en el análisis funcional de las genotecas.

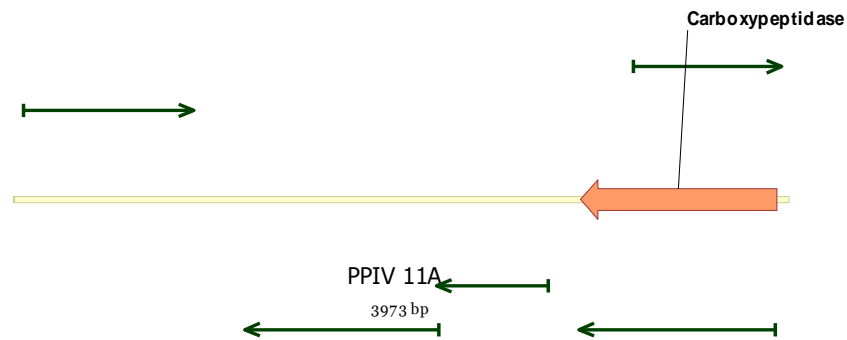


Figura 41: Inserto presente en el plásmido PPIV11A

PPIV11B

En este caso se encontraron tres marcos abiertos de lectura para los cuales se encontró similitud con secuencias identificadas (Figura 42). Uno de ellos presentó alta homología con transposasas. Los otros dos presentaron homología con metiltransferasas. En principio estas actividades no explicarían la actividad lipolítica observada. Sin embargo, las transposasas son capaces de hidrolizar los enlaces fosfato presentes en el ADN. Diversos fosfonatos han sido utilizados como haptenos para el desarrollo de anticuerpos catalíticos con actividad lipasa,²⁰³ dado a que el grupo fosfato emula el estado de transición que se produce en la hidrólisis de ésteres catalizada por lipasas. Por lo tanto existe la posibilidad de que la transposasa encontrada exhiba promiscuidad catalítica, produciendo la hidrólisis de los triglicéridos contenidos en el medio de cultivo y produciendo un resultado positivo. Se deberá clonar el gen de la transposasa y expresarlo en un huésped adecuado para determinar si esta posibilidad es cierta. Alternativamente se podrían subclonar fragmentos menores de este inserto de forma de obtener el mínimo fragmento que mantenga la actividad.

Los otros marcos abiertos de lectura encontrados en el clon PPIV11B no pudieron correlacionarse con ninguna actividad conocida.

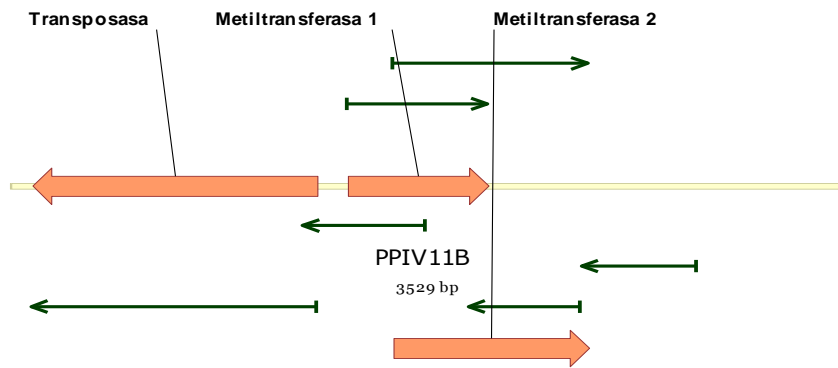


Figura 42: Inserto presente en el plásmido PPIV11B

PPIV15A

En este clon fue posible identificar seis marcos abiertos de lectura, tres de los cuales presentaron similitud con acetil-CoA deshidrogenasas. La presencia de estos genes no justifica la actividad lipolítica manifestada por este clon. Si bien esta tesis no contempla el clonado de este tipo de enzimas, el grupo en el cual se desarrolló la misma trabaja también en la identificación de nuevas deshidrogenasas a partir de metagenomas, por lo que se amplificó y clonó el marco abierto de lectura identificado como ORF 4 –AcylCoA DH en la figura 43, con el objetivo de analizar la actividad de esta posible reductasa.

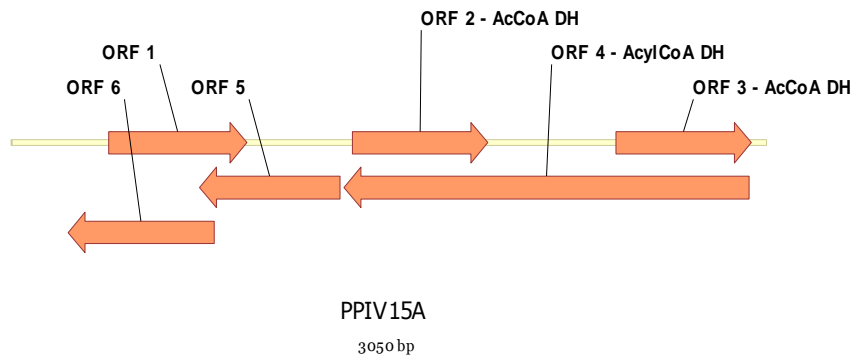


Figura 43: Inserto presente en el plásmido PPIV15A

Clonado del gen identificado en PPIV 11A

La exploración de metagenomas provenientes de lodos de un ambiente contaminado (L1) y uno no contaminado (L2) permitió descubrir, en base a lo secuenciado hasta el momento, un único gen codificante para una enzima con posible actividad lipolítica. Este gen presenta homología con secuencias correspondientes a carboxipeptidasas; sin embargo, fue identificado por su actividad lipolítica. Es posible que la enzima que codifica sea promiscua en su actividad catalítica, hidrolizando más de un tipo de sustrato. Para estudiar más en profundidad el gen encontrado, se decidió expresar la enzima en un sistema recombinante. En particular, se eligió un sistema basado en la levadura *Pichia pastoris*. Como se mencionó en el *Capítulo 1*, este sistema ha resultado exitoso en la expresión de diversas proteínas secretadas, incluyendo enzimas provenientes de la cepa *Thermus aquaticus* YT-1.²⁰⁴

Amplificación y clonado de la carboxipeptidasa en el plásmido pPINK α -HC

Utilizando los primers CP1 Fwd y CP1 Rev (ver Metodología) se logró amplificar el gen de la carboxipeptidasa presente en el plásmido PPIV 11A. El amplicón fue digerido con las enzimas de restricción *Mly* I y *Kpn* I, y fue ligado con el vector pPINK α -HC digerido con *Stu* I y *Kpn* I, para formar el plásmido pPINK α HC-CP (figura 44). Con el vector construido de esta manera se transformó la cepa *E. coli* DH10B. Esta cepa fue utilizada para realizar una producción del plásmido a mediana escala, obteniéndose 5 μ g del plásmido. A pesar de que la cantidad obtenida fue baja, se decidió seguir adelante con la transformación de *P. pastoris*, pero no se lograron obtener transformantes de ninguna de las 4 cepas de esta levadura. Se realizó una preparación en mayor escala, obteniéndose 20 μ g de vector. El mismo fue linealizado con *Spe* I, y utilizado para transformar las cuatro cepas *PichiaPink*TM 1-4. Se obtuvieron respectivamente 13, 40, 13 y 10 clones positivos. Se realizaron ensayos de actividad en placa de dichos clones,¹²¹ pero los mismos no fueron concluyentes. Se repetirán estos ensayos, al igual que ensayos de producción en medio líquido, para determinar si estos clones presentan actividad lipolítica.

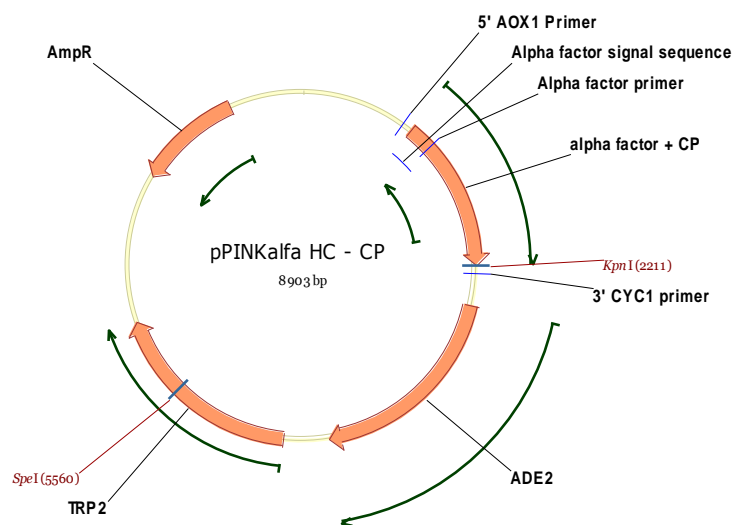


Figura 44: Esquema del vector pPINK α HC-CP

Capítulo 4

Capítulo 4

Aplicaciones de las nuevas lipasas

Las lipasas han sido utilizadas como catalizadores para una multitud de reacciones tanto de hidrólisis como de síntesis de ésteres. Con el objetivo de analizar la utilidad catalítica de la lipasa Lip I.3, se utilizó esta enzima en reacciones de hidrólisis, síntesis de ésteres y transesterificación, comparándola con enzimas comerciales disponibles. Como paso previo, fue necesario estudiar el procedimiento de liofilización de la lipasa Lip I.3, y poner a punto las condiciones de reacción y las técnicas de análisis para las distintas reacciones.

Paralelamente, se ensayó también la utilidad de otras lipasas descubiertas por nuestro grupo de trabajo para la síntesis de biodiesel y la derivatización del glicerol. Como se mencionó anteriormente, la búsqueda de nuevas lipasas en ambientes naturales puede proveer de enzimas con actividad novedosa. Nuestro grupo ha realizado búsquedas de nuevos biocatalizadores en muestras muy diversas, con el objetivo de acceder a una mayor amplitud de la biodiversidad. En el estudio de los endofíticos de la especie *Fortunella margarita* (quinoto o kumquat), se encontró una cepa de *Aureobasidium pullulans* con alta actividad lipolítica. Esta cepa produce una lipasa extracelular, que es recuperada fácilmente del sobrenadante del medio de cultivo, y que presenta potencial como biocatalizador. A partir de una muestra de suelo proveniente de la Antártida, se aisló la cepa *Staphylococcus hominis* R06, la cual también produce una lipasa extracelular. Estas dos lipasas, junto con Lip I.3, fueron estudiadas en su aplicación a la síntesis de biodiesel y la derivatización del glicerol.

Liofilizado de Lip I.3

Para poder aplicar Lip I.3 en reacciones de esterificación o transesterificación en solventes no acuosos, era necesario contar con un preparado enzimático libre de agua, de forma de evitar las reacciones de hidrólisis. La liofilización es el método más utilizado para la preparación de enzimas para biocatálisis. Si bien este método puede producir la desnaturalización de la enzima debido a las bajas temperaturas y a la eliminación del agua, la presencia de compuestos lioprotectores puede contrarrestar la pérdida de agua, manteniendo la estructura de la proteína y su actividad.²⁰⁵

Se realizó la liofilización de la lipasa Lip I.3 a partir del crudo obtenido mediante el método de Kojima. La solución sometida a liofilización contenía la enzima en buffer tris 20 mM (pH=7) con glicerol al 5% y Tritón® X-100 al 0,2 %. Tanto el glicerol como el Tritón® X-100 pueden proteger a la enzima durante la liofilización, por lo que no fue necesario agregar otros compuestos que cumplieran esta función. La presencia de calcio es un requerimiento para la actividad de la lipasa Lip I.3. Además, el agregado de sales antes de liofilizar puede mejorar la actividad observada en las enzimas que han sufrido este proceso.²⁰⁵⁻²⁰⁶ Por estos motivos, se agregó a una parte de las muestras CaCl₂ hasta una concentración de 10 mM. Luego del proceso de liofilización, una alícuota del preparado enzimático fue recuperado en agua hasta el mismo volumen inicial y su actividad fue analizada mediante ensayos cualitativos con el sustrato modelo MUF-butarato en papel de filtro,¹⁹⁰ obteniéndose actividad tanto en presencia como en ausencia de calcio (Figura 45).

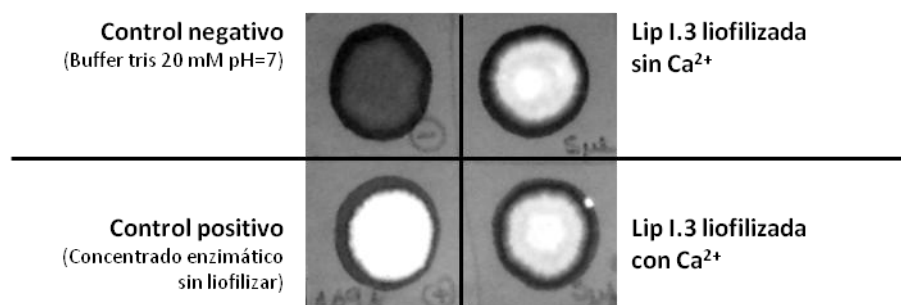


Figura 45: Análisis cualitativo de la actividad de Lip I.3 liofilizada

A partir de los resultados obtenidos se pudo determinar que la lipasa Lip I.3 resiste el proceso de liofilizado en las condiciones ensayadas, lo que resulta muy conveniente para su potencial aplicación como reactivo para síntesis química. La presencia de calcio no parece influir en la actividad, aunque sería necesario realizar ensayos cuantitativos para determinar si hay diferencias de actividad entre los preparados. La lipasa Lip I.3 liofilizada según el método descrito se aplicó posteriormente a la síntesis de biodiesel y la esterificación del glicerol y el 1,3-propanodiol.

Aplicaciones sintéticas: Síntesis de biodiesel

La síntesis de biodiesel consiste en la transesterificación de triglicéridos de distinto origen con un alcohol de cadena corta como metanol o etanol. Para ello se debe utilizar un catalizador, que puede ser químico o enzimático. La biocatálisis presenta claras ventajas sobre el método químico, pero aún son muy pocas las enzimas que han encontrado aplicación industrial en este proceso.⁶²⁻⁶³ Se requiere del descubrimiento de nuevas enzimas que puedan ser utilizadas con esta aplicación. Por este motivo, se planteó estudiar la utilidad de las nuevas lipasas en la síntesis de este biocombustible.

Como primer paso se determinaron las condiciones de análisis de los productos mediante cromatografía gaseosa. Para ello se utilizó un estándar de metilésteres (nº 1891, Sigma), el cual se comparó con los productos de la metilación química de los aceites de partida altooleico y de girasol, y con la transesterificación enzimática obtenida con la enzima CAL B, la cual ha sido utilizada en numerosos trabajos anteriores con ese fin.⁴² La comparación entre la metilación y la etilación química del aceite de partida permitió determinar las condiciones de análisis de la síntesis de biodiesel utilizando etanol.

Se utilizó Lip I.3 liofilizada según lo descrito anteriormente para la reacción de transesterificación, utilizando tanto metanol como etanol. También se utilizaron los extractos crudos con actividad lipolítica de las cepas *A. pullulans* CQA y *S. hominis* R06 (los que serán nombrados como CQA y R06 respectivamente). Las condiciones de reacción se muestran en la tabla 6.

Tabla 6: Condiciones para los ensayos de síntesis de biodiesel

Función	Reactivo	Cantidad
Triglicérido	Aceite altooleico COUSA	50 mg
	Aceite de girasol	50 mg
Alcohol	Metanol	11 mg
	Etanol	16 mg
Enzima	CAL-B (Novozyme 435)	5 mg
	Lip I.3 liofilizada	70 mg
	CQA (crudo)	500 mg
	R06 (crudo)	500 mg
Solvente	Hexano saturado en agua	2 mL
Las reacciones se llevaron a cabo a 30 °C con agitación		

Los resultados obtenidos en las síntesis de biodiesel con Lip I.3 y las lipasas de CQA y R06 no fueron alentadores. No se logró la transesterificación utilizando estas enzimas en ninguna de las condiciones ensayadas. Se realizaron también ensayos de hidrólisis de los aceites en presencia de Lip I.3 utilizando medio acuoso, en las mismas condiciones en las cuales es posible visualizar la actividad de Lip I.3 mediante la hidrólisis de pNP-palmitato y utilizando como control positivo la enzima CAL-A. Estos ensayos indicaron que la Lip I.3 no es capaz de hidrolizar estos aceites. Esto se encuentra en concordancia con los resultados obtenidos para los sustratos modelo derivados de pNP y MUF, dado que Lip I.3 prácticamente no tiene actividad frente a los derivados de cadena larga. La subfamilia I.3, a la cual pertenece esta lipasa, ha sido poco estudiada desde el punto de vista biocatalítico, y hay pocos reportes donde se estudie la especificidad de sustrato de estas enzimas.^{117,124,131,149} Si bien todas presentan preferencia por sustratos de cadena media, la mayoría son capaces de hidrolizar triglicéridos de cadena larga con buena actividad, a excepción de la lipasa de *S. marcescens* Sr41 8000.¹²⁴ Por ejemplo, la PML de *Pseudomonas* sp. MIS38, la cual se encuentra muy relacionada con Lip I.3, presenta sobre trioleína el 77% de la actividad que presenta sobre tributirina, su sustrato óptimo. El resultado obtenido para la Lip I.3 la aleja de las enzimas filogenéticamente más relacionadas que han sido caracterizadas hasta el momento.

Aplicaciones sintéticas: Esterificación del glicerol y sus derivados

En el proceso de síntesis de biodiesel, se obtiene como subproducto una gran cantidad de glicerol, equivalente al 10 % del producto total. El glicerol puede venderse para aumentar la rentabilidad del proceso, pero su precio ha disminuido a causa de un aumento en la oferta.⁵¹⁻⁵³ La valorización del glicerol mediante su conversión en derivados de mayor valor agregado se presenta como una opción para favorecer el balance económico de la producción y disminuir las trabas a la utilización del biodiesel como combustible renovable.

Una opción para la valorización consiste en su transformación en 1,3 o 1,2 propanodiol, así como en derivados de estos compuestos. Nuestro grupo ha trabajado en la biotransformación de glicerol en 1,3 y 1,2 propanodiol. Tanto el glicerol como sus dioles derivados son alcoholes, por lo que las lipasas pueden catalizar reacciones de esterificación de sus grupos hidroxilo, con el objetivo de sintetizar moléculas más complejas. Los ésteres del glicerol han sido utilizados como emulsificantes en la industria alimenticia, en cosméticos y en la industria farmacéutica⁶⁷⁻⁶⁸, es así que la esterificación del glicerol y sus derivados utilizando lipasas representa una alternativa válida para la valorización de este subproducto⁷⁰⁻⁷⁷ y la consecuente mejora del balance económico del proceso.

Se realizaron ensayos de esterificación de glicerol y del 1,3 propanodiol. Para la optimización de las condiciones de reacción y analíticas se utilizaron las enzimas comerciales CAL-A (Fluka) y *Pseudomonas* lipase (PSL, Sigma). Las condiciones utilizadas se muestran en la tabla 7.

Tabla 7: Condiciones de esterificación del glicerol y sus derivados

Función	Reactivo	Cantidad
Alcohol	Glicerol	100 µL
	1,3-propanodiol	120 µL
Dador de acilo	Acetato de vinilo	451 µL
	Propionato de vinilo	531 µL
	Butirato de vinilo	619 µL
Enzima	CAL-A (Fluka)	30 mg
	PSL (Sigma)	10 mg
	Lip 1.3 liofilizada	74 mg
	CQA (Crudo)	500 mg
	R06 (Crudo)	500 mg
Solvente	Hexano saturado en agua	2 mL
Las reacciones se llevaron a cabo a 30 °C con agitación		

Esterificación de glicerol

Se analizó la actividad de Lip I.3, CQA y R06 en la esterificación del glicerol con tres dadores de acilo distintos, acetato, propionato y butirato de vinilo. El análisis de los productos se realizó mediante GC y GC-MS. Los resultados se compararon con los obtenidos para las enzimas CAL-A y PSL.

Para el glicerol sólo se obtuvieron buenos resultados con las enzimas comerciales, mientras que las lipasas CQA, R06 y Lip I.3 presentaron bajas conversiones. Se ha observado inhibición por glicerol en la síntesis de biodiesel,⁵⁶ por lo que es posible que este reactivo afecte la actividad enzimática.

Esterificación de 1,3 propanodiol

A diferencia de lo observado para el glicerol, al utilizar 1,3 propanodiol como alcohol fue posible detectar productos de esterificación en las reacciones catalizadas por las enzimas no comerciales. Se utilizaron tres dadores de acilo distintos, acetato, propionato y butirato de vinilo. El análisis de los productos se realizó mediante GC y GC-MS.

Esterificación utilizando acetato de vinilo

Al utilizar acetato de vinilo como dador de acilo y 1,3 propanodiol como alcohol, fue posible obtener esterificación (figura 46), aunque las conversiones obtenidas fueron menores en el caso de las enzimas Lip I.3, CQA y R06 que para las enzimas comerciales. Sin embargo, se determinó que mientras CAL-A produce una mezcla de productos mono y diacilados, en el caso de Lip I.3, CQA y R06 se obtiene como producto mayoritario el compuesto monoacilado, en porcentajes mayores al 90 % en todos los casos. Si bien PSL también presenta selectividad por el producto monoacilado, esta selectividad es menor que para las nuevas enzimas. La capacidad de acilar una sólo de los grupos hidroxilo puede resultar útil para la aplicación de estas enzimas en síntesis orgánica.

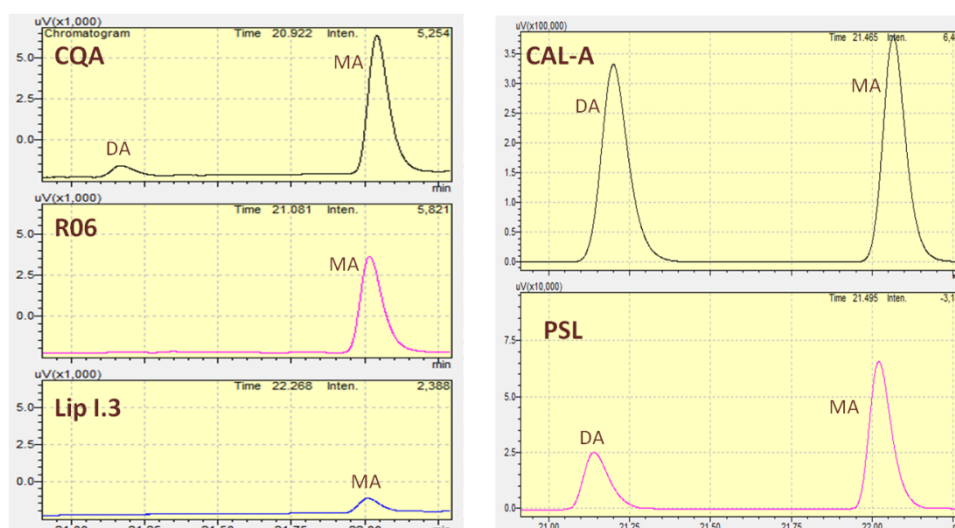


Figura 46: Cromatogramas de GC de los productos de esterificación del 1,3 propanodiol con acetato de vinilo utilizando distintas enzimas. MA: producto monoacilado; DA: producto diacilado (determinados mediante GC-MS)

Esterificación utilizando propionato de vinilo

Al utilizar propionato de vinilo como dador de acilo y 1,3 propanodiol como alcohol, también se pudo observar esterificación (figura 47), observándose resultados similares a la esterificación con acetato de vinilo. Si bien en este caso no se pudieron encontrar condiciones de GC que permitieran resolver completamente los picos, se puede distinguir los productos mono y di acilado, y fue posible identificar los picos mediante GC-MS. En este caso Lip I.3 presentó muy baja conversión, resultando más adecuadas CQA y R06. Las enzimas comerciales, al igual que en el caso anterior, presentaron mayores conversiones. Sin embargo, la selectividad también fue mayor en el caso de las nuevas enzimas, lo que podría resultar de utilidad para su aplicación en síntesis orgánica.

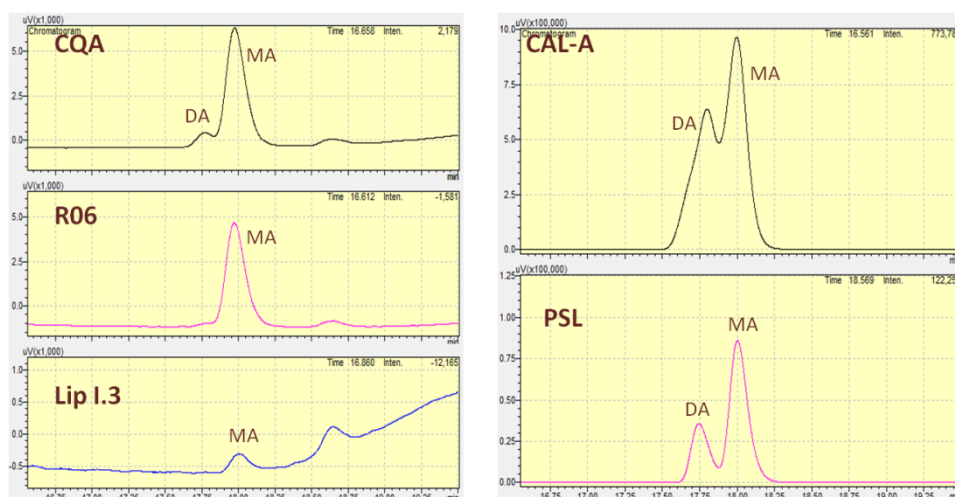


Figura 47: Cromatogramas de GC de los productos de esterificación del 1,3 propanodiol con propionato de vinilo utilizando distintas enzimas. MA: producto monoacilado; DA: producto diacilado (determinados mediante GC-MS)

Esterificación utilizando butirato de vinilo

Al utilizar butirato de vinilo la tendencia fue similar a la observada para los otros dos dadores de acilo. En este caso, con CAL-A se obtiene únicamente el producto diacilado, mientras que con CQA y R06 es posible obtener el monoacilado como producto ampliamente mayoritario (figura 48). Lip I.3 prácticamente no presenta actividad con este dador de acilo. Como se señaló anteriormente, esta selectividad podría ser explotada con fines sintéticos.

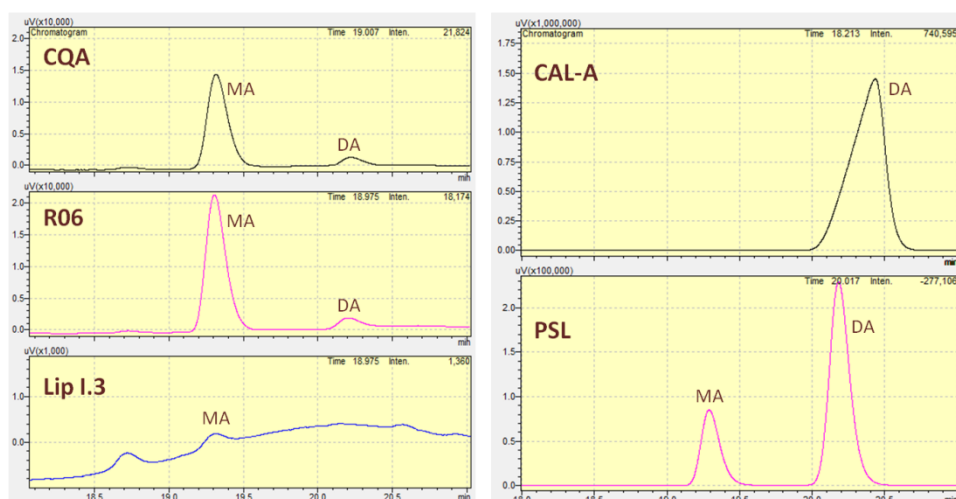


Figura 48: Cromatogramas de GC de los productos de esterificación del 1,3 propanodiol con butirato de vinilo utilizando distintas enzimas. MA: producto monoacilado; DA: producto diacilado (determinados mediante GC-MS)

Aplicaciones sintéticas: Análisis de la actividad de Lip I.3 en reacciones de hidrólisis

Para estudiar con mayor profundidad la especificidad de sustrato de Lip I.3 y poder compararla con lipasas disponibles comercialmente, nos planteamos analizar la actividad hidrolítica de Lip I.3 frente a distintos ésteres. Como se estableció en el *Capítulo 2*, esta lipasa presenta buena actividad frente a ésteres derivados de p-nitrofenol (pNP) y de 4-metil umbeliferona (MUF), especialmente aquellos de cadena media ($n = 5 - 8$). Naik y colaboradores²⁰⁷ utilizaron un set de ocho sustratos para comparar diversas lipasas comerciales. De acuerdo a los resultados obtenidos establecieron tipos de conformación del sitio activo, según permitieran ubicar mejor unos sustratos y otros. Dado que cuatro de estos sustratos se encuentran accesibles a través de proveedores comerciales, se ensayó la actividad de Lip I.3 sobre ellos (figura 49).

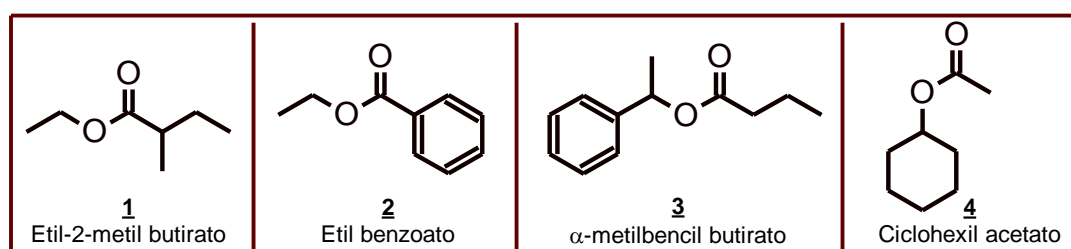


Figura 49: Sustratos utilizados para analizar la actividad de Lip I.3

Se realizaron ensayos de actividad de la Lip I.3 frente a estos cuatro sustratos, obteniéndose los resultados que se observan en la tabla 8. Si bien la actividad es baja con todos los compuestos ensayados, el compuesto con el que presenta mejor actividad el α -metilbencil butirato, el cual, al igual que los derivados de MUF y pNP (figura 50), es un éster de un alcohol aromático, lo cual puede ser interesante desde el punto de vista biocatalítico. Además, el exceso enantiomérico obtenido para este sustrato fue muy alto, por lo que la lipasa Lip I.3 presenta una clara preferencia por la hidrólisis de uno sólo de los enantiómeros, lo que también podría resultar de utilidad biocatalítica.

Tabla 8: Resultados obtenidos para la hidrólisis de los sustratos 1 a 4 con Lip I.3

Sustrato	Conversión (%)	% ee producto
<u>1</u> Etil-2-metil butirato	(4)*	80
<u>2</u> Etil benzoato	1	-
<u>3</u> α -metilbencil butirato	7	99
<u>4</u> Ciclohexil acetato	2	-

*En relación a lo obtenido con CAL-B (Novozyme 435)

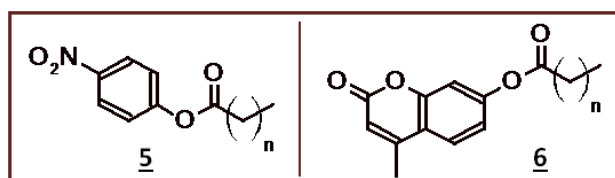


Figura 50: Ésteres derivados de p-nitrofenol (5) y 4-metil umbeliferona (6)

Capítulo 5

Capítulo 5

Modificación de las propiedades de Lip I.3 mediante mutagenesis por diseño racional

Los métodos de ingeniería genética han sido ampliamente utilizados para modificar las propiedades enzimáticas de las lipasas. Con este fin se han aplicado tanto métodos basados en la incorporación de mutaciones al azar asociadas a la evolución dirigida como el diseño racional de sustituciones, basado en información preexistente sobre la relación estructura-actividad.¹⁰¹ Lip I.3 presenta alta homología con las lipasas de *Pseudomonas* sp. MIS38 (PML) y *S. marcescens* SM6 (SML). Las estructuras tridimensionales de estas enzimas han sido determinadas experimentalmente,^{125,133,138} y se han estudiado además algunos aspectos de la relación estructura-actividad.^{138,208} Por homología con la estructura reportada de PML, y utilizando el programa Swiss-Model,¹⁸¹⁻¹⁸⁴ fue posible construir un modelo tridimensional de Lip.3 (Ver Capítulo 2). La información disponible nos permitió considerar una aproximación racional para el desarrollo de variantes de Lip I.3 con actividad modificada.

Como se dijo anteriormente, Lip I.3 presenta alta homología con otras lipasas de la subfamilia I.3, y especialmente con PML. Sin embargo, esta similitud de secuencia, no se refleja en las propiedades biocatalíticas. Mientras todas las lipasas de la subfamilia I.3 que han sido reportadas hasta el momento presentan un pH óptimo entre 7 y 9, Lip I.3 es acidófila, con un pH óptimo de 5,5. Además, mientras PML presenta activación interfacial,¹³¹ este fenómeno no ha sido reportado para otros integrantes de la subfamilia como Lip I.3 o la lipasa SML de *Serratia marcescens*.¹²⁵ Además, como se comprobó en *Capítulo 4*, si bien todas presentan preferencia por sustratos de cadena media, la mayoría pueden hidrolizar triglicéridos de cadena larga con buena actividad, incluyendo a la lipasa PML, filogenéticamente muy cercana a Lip I.3. Por lo tanto, las pequeñas diferencias encontradas en la secuencia de aminoácidos parecen tener una gran importancia en la actividad catalítica de la enzima, lo que ha sido notado previamente por otros autores al comparar otros integrantes de la subfamilia I.3.¹³⁰ Con el objetivo de dilucidar la magnitud de este hecho, se planteó la realización de mutaciones puntuales en Lip I.3, sustituyendo los aminoácidos nativos por los presentes en PML y SML. Dado que una de las diferencias observadas entre PML, SML y Lip I.3 es la presencia o ausencia de activación interfacial, inicialmente se decidió restringir estas mutaciones a la zona del Lid1 (Figura 51), descrito como funcional en PML.¹³¹ Las mutaciones seleccionadas fueron I149N, I149S, G152L, I149N/G152L, S154T y A165G.

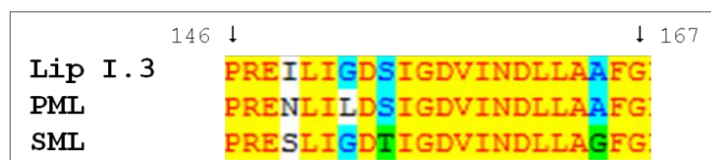


Figura 51: Secuencias comparadas del Lid1 para Lip I.3, PML y SML

Paralelamente, se planteó explorar la modificación de Lip I.3 con el objetivo de extender el rango de sustratos aceptados. Las lipasas de la subfamilia I.3 muestran preferencia por sustratos de cadena media. Esta tendencia no es favorable para algunas aplicaciones posibles, como la síntesis de biodiesel. Como se demuestra en el *Capítulo 2*, Lip I.3 prácticamente no presenta actividad sobre sustratos de cadena larga, por lo que nos planteamos la generación de variantes con actividad aumentada frente a estos sustratos. Utilizando el modelo tridimensional de Lip I.3 obtenido en el *Capítulo 2*, se identificaron diferentes aminoácidos voluminosos que podían estar dificultando el acceso de sustratos de cadena larga al sitio activo. Los sitios elegidos fueron los aminoácidos Y29, F166 y W310 (Figura 52).

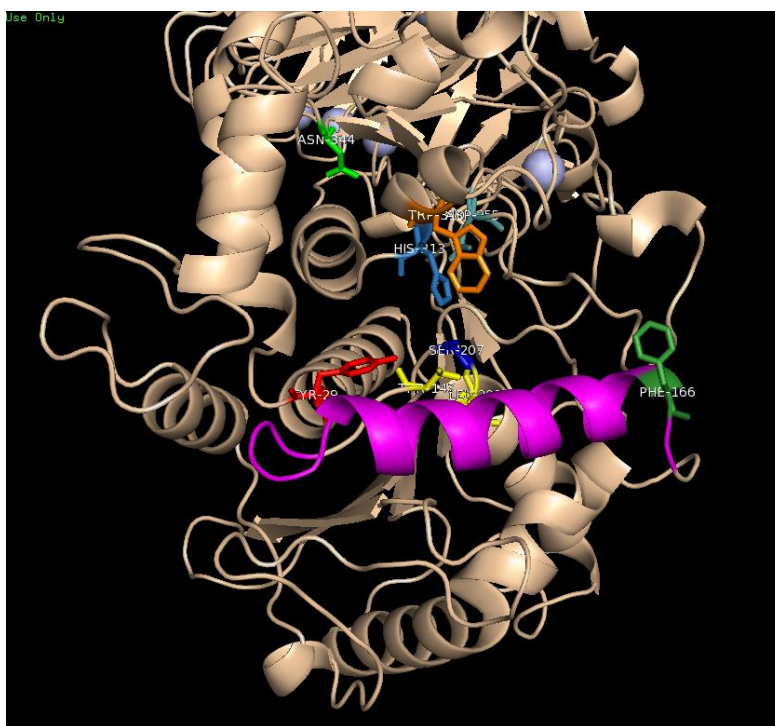


Figura 52: Modelo estructural de Lip I.3. Se muestran en tonos de azul los aminoácidos del sitio catalítico (Ser207, Asp255, His313), y en amarillo los residuos que forman el hueco del oxianión (Thr143 y Leu 208). El Lid1 se muestra en violeta. Los aminoácidos seleccionados para las mutaciones se muestran en rojo (Tyr29), naranja (Trp310), verde oscuro (Phe166) y verde claro (Asn 344). Los átomos de calcio aparecen en celeste.

Lee y colaboradores¹¹⁰ encontraron que para la lipasa LIP4 de *Candida rugosa* (CRL), la mutación V344Q producía un cambio en la preferencia de sustratos hacia aquellos de cadena más corta. En Lip I.3 esa posición está ocupada por asparagina, la cual tiene una cadena lateral similar a la de la glutamina. La sustitución de este aminoácido por valina o por otro aminoácido apolar de cadena pequeña podría producir el cambio inverso al observado en LIP4 y favorecer la entrada de sustratos más voluminosos al sitio activo. Si bien en Lip I.3 la posición 344 no está tan cercana a la entrada del sustrato como en la LIP4 de CRL, igualmente se decidió analizar el efecto de esta mutación por encontrarse en una región próxima al sitio activo.

A excepción del trabajo de Lee y colaboradores, no se cuenta con información previa sobre el efecto de las mutaciones seleccionadas, y no existe información suficiente para calcular con certeza cuál sería el mejor cambio a realizar. Por lo tanto se decidió introducir mutaciones por saturación en las posiciones elegidas, de forma que no se descartara ninguna posibilidad capaz de producir un aumento en la actividad sobre sustratos de cadena larga.

Mutaciones puntuales sobre el Lid1

Utilizando como molde el plásmido pBBR1MCS-Lip I.3 se aplicó un método de mutagenesis basado en Quikchange^{®209} para generar las variantes modificadas de Lip I.3 en las posiciones seleccionadas. Este método consiste en la amplificación completa del plásmido utilizando primers que contienen la mutación a incorporar. Los primers utilizados se describen en *Metodología*. Una vez realizada la amplificación, el plásmido parental es digerido con la enzima *DpnI* para eliminar las moléculas de vector que no han incorporado la modificación. En el caso de las mutaciones puntuales I149N, I149S, G152L, I149N/G152L, S154T y A165G, una vez realizadas la amplificación y la digestión con *DpnI* se transformó la cepa *E. coli*. TOP10. Los plásmidos obtenidos fueron secuenciados para corroborar la incorporación de las mutaciones. Una vez confirmada la secuencia, los plásmidos conteniendo las mutaciones fueron utilizados para transformar la cepa *Ps. aeruginosa* PAO1 Δ *lipH*, que no presenta actividad lipasa.^{177,210} Se determinó la actividad hidrolítica de las variantes obtenidas sobre MUF heptanoato y MUF oleato en los sobrenadantes del medio de cultivo, comparándolos con el control negativo *Ps. aeruginosa* PAO1 Δ *lipH* (pBBR1MCS). Los resultados obtenidos se muestran en la figura 53.

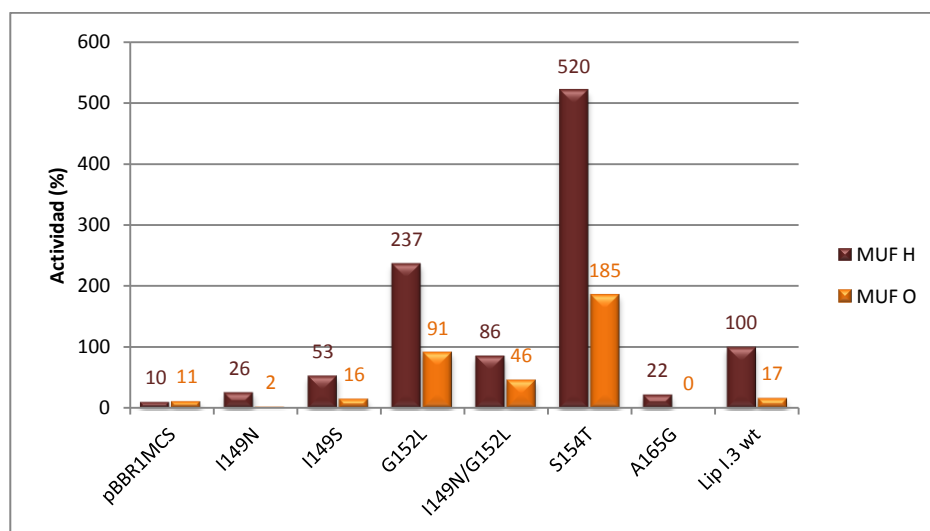


Figura 53: Actividad hidrolítica en los sobrenadantes de cultivo para los diferentes mutantes obtenidos. El 100 % corresponde a la actividad de Lip I.3 wt sobre su sustrato óptimo, MUF heptanoato. MUF H: MUF heptanoato, MUF O: MUF oleato

Se observa que los mutantes G152L y S154T tienen una actividad mucho mayor que la Lip I.3 nativa (Lip I.3 wt), tanto sobre MUF heptanoato como sobre MUF oleato. El aumento de actividad sobre MUF heptanoato es mayor a 5 veces para S154T, mientras que la actividad sobre este sustrato de G152L es más del doble que la de Lip I.3 wt. Cabe destacar que el aumento de actividad sobre MUF oleato es aún mayor, de casi 11 veces para S154T y más de 5 veces en el caso de G152L. Estas mutaciones implican cambios en los aminoácidos del Lid1, por lo que es muy probable que influyan en la apertura de esta estructura, favoreciendo la

hidrólisis. En el caso de S154T, se produce una sustitución por un residuo presente en PML, enzima para la cual la Lid1 ha sido descrita como funcional.¹³¹ Además, ambas mutaciones se encuentran situadas en la región central-proximal del Lid1, contribuyendo probablemente a la formación de una hélice alfa con mayor capacidad de apertura. Esta mayor flexibilidad en la estructura del Lid1 podría en consecuencia favorecer la apertura del canal de entrada al centro activo, incrementando así la eficiencia catalítica de ambos mutantes, no sólo sobre su sustrato habitual sino también sobre sustratos de mayor tamaño como es el caso del MUF Oleato, cuya hidrólisis se ve significativamente incrementada en ambas variantes de Lip I.3.

En el mutante G152L se produce el cambio de un aminoácido polar, pequeño y flexible (glicina) por otro ramificado, poco flexible e hidrofóbico (leucina). Este aminoácido se encuentra próximo a la zona de “bisagra” entre el Lid1 y el resto de la molécula. En la conformación cerrada de Lip I.3 G152L (Figura 54c) se observa que la leucina podría tener mayor dificultad para acomodarse en el Lid1 cerrado que la glicina (Figura 54a) al interactuar con otros aminoácidos del Lid1, lo que proporciona un impedimento estérico para el cierre. En cambio en la estructura abierta la cadena lateral de la leucina se ubica en un espacio libre. Esto podría favorecer la conformación abierta del Lid1, con un consecuente aumento en la actividad hidrolítica.

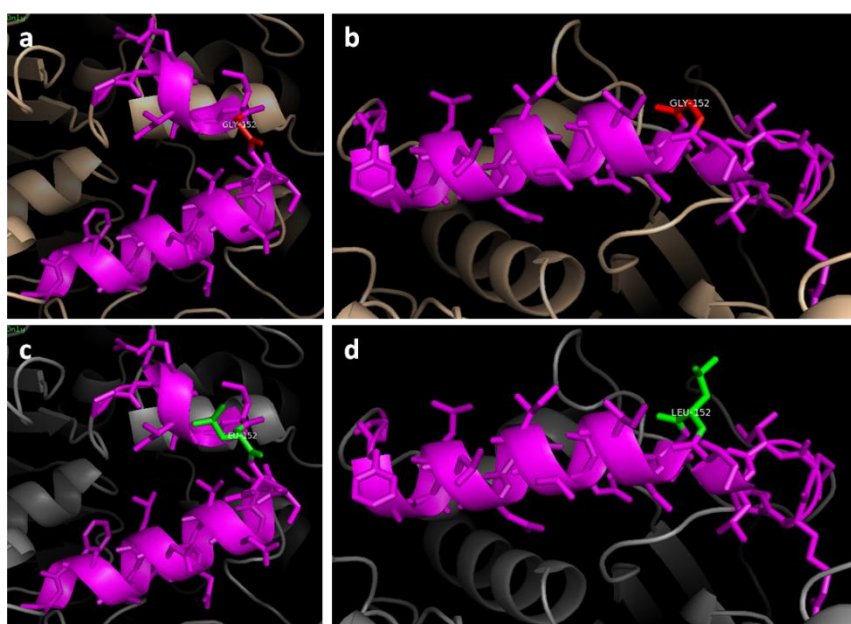


Figura 54: Lid1 en las estructura cerrada (a y b) y abierta (b y d) de Lip I.3 wt (a y b) y Lip I.3 G152L (c y d). Se muestra G152 en rojo, L152 en verde y el resto de los aminoácidos del Lid1 en violeta.

Sorprendentemente, el mutante I149N/G152L presenta una actividad ligeramente menor a la de la Lip I.3 wt. Por lo tanto, la mutación I149N tiene el efecto de contrarrestar el aumento de actividad observado para G152L. Esto puede explicarse por el impedimento estérico que genera el residuo N149 en el mutante (figura 55). Se observa que en el modelo abierto del mutante I149N/G152L el residuo N149 interactúa con L152, lo que podría desfavorecer la conformación abierta. En cambio en el mutante G152L esto no pasa, al ser mayor la distancia entre I149 y L152.

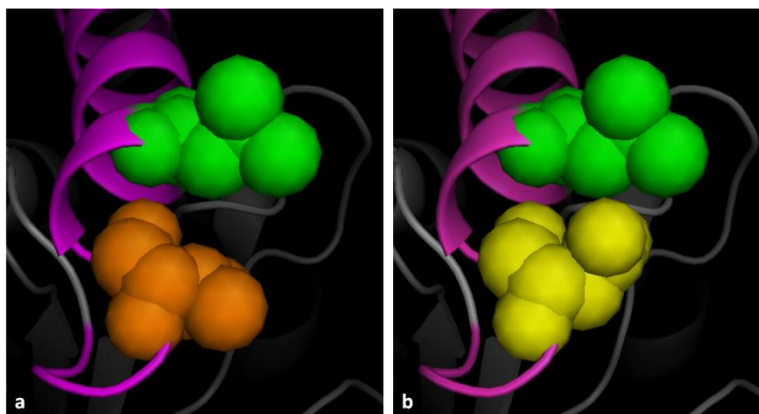


Figura 55: Detalle de las posiciones 149 y 152 en a) Lip I.3 G152L y b) Lip I.3 I149N/G152L. Se muestra L152 en verde, I149 en naranja, N149 en amarillo y el resto de los aminoácidos del Lid1 en violeta.

En el caso de la mutación S154T resulta más difícil dilucidar las posibles causas del aumento en la actividad, dado que el cambio es muy sutil. En el modelo de Lip I.3 S154T en la conformación cerrada se observa que el hidroxilo de la treonina tiene la misma orientación que el de la serina en Lip I.3 wt. Sin embargo, en la conformación abierta el hidroxilo de la treonina se encuentra en una posición distinta en la enzima mutada a la que presenta en la enzima nativa (Figura 56), lo que podría resultar en la formación de puentes de hidrógeno distintos.

En el modelo obtenido para Lip I.3 descrito en el *Capítulo 2*, se pudo observar que el sitio de fijación de Ca1 se ve alterado con respecto a la estructura de PML, perdiéndose este átomo de calcio. La causa de esta alteración es una diferencia en el aminoácido 188, que es treonina en PML y serina en Lip I.3. Al construir la mutante PML T118S *in silico* se pudo observar que este cambio es suficiente para que se pierda el átomo de calcio en el modelo. El aminoácido 154 se encuentra muy cerca del sitio de unión del Ca1, y podría estar interactuando con el mismo. Esta variante podría estar recuperando el sitio de unión a calcio, generando un fuerte anclaje del Lid1 que aumentara la actividad. En base a los modelos estáticos resulta difícil establecer si esto es posible, dado que sería una nueva interacción que no está presente en PML. Se deberán realizar estudios dinámicos o de cristalización para dilucidar este aspecto. La construcción de la variante Lip I.3 S118T y el análisis de su actividad también podrían ayudar a aclarar la influencia de la unión del Ca1 en la misma.

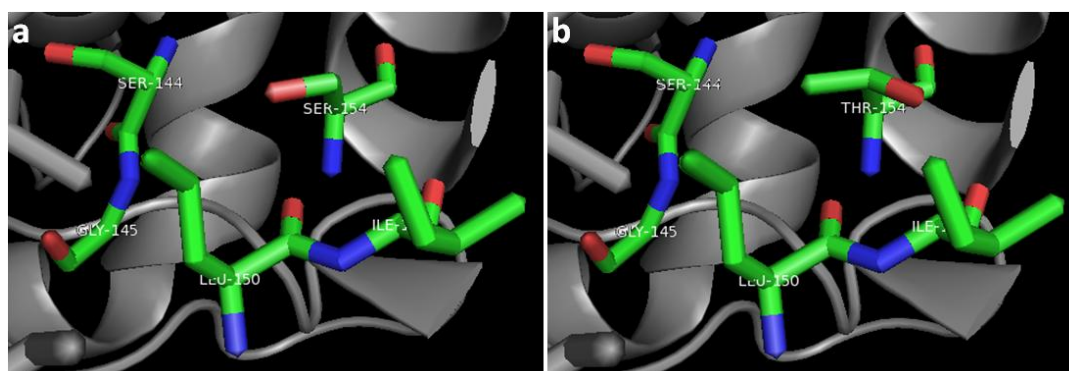


Figura 56: Detalle de la estructura de Lip I.3 wt (a) y Lip I.3 S154T (b) mostrando el sitio mutado y algunos aminoácidos cercanos. Los colores indican los distintos elementos. C: verde, O: rojo, N: azul.

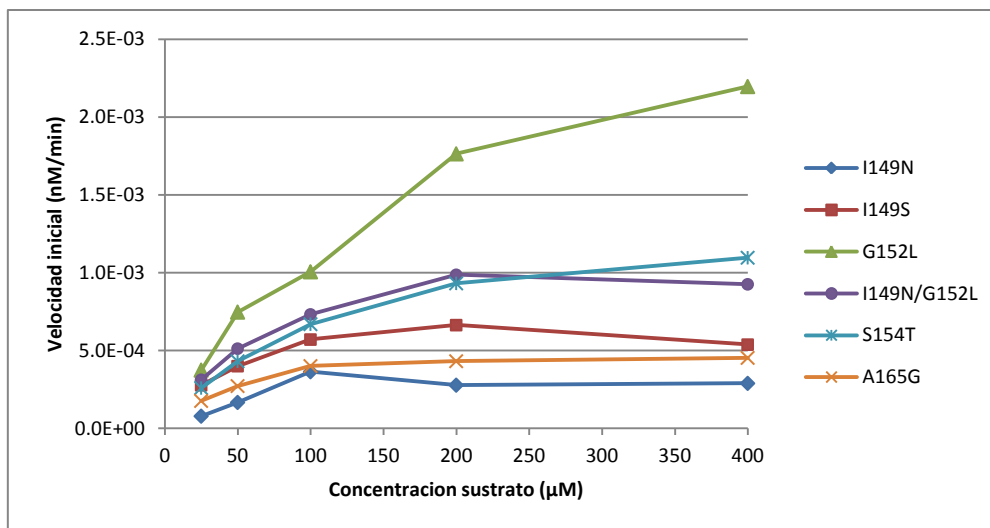


Figura 57: Velocidad inicial en función de la concentración de sustrato para los mutantes puntuales de Lip I.3 en el Lid1. Las variantes con mayor actividad fueron diluidas para facilitar los ensayos, por lo que las concentraciones de enzima no son equivalentes.

En el futuro se realizarán también mutaciones por saturación en las posiciones 152 y 154, para determinar si la sustitución por otros aminoácidos puede aumentar aún más la actividad de Lip I.3. También se analizará la actividad de la doble mutante G152L/S154T, la cual ya ha sido construida.

Se realizaron ensayos para valorar los parámetros cinéticos de los mutantes puntuales I149N, I149S, G152L, I149N/G152L, S154T y A165G. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 57, donde se puede observar que todas las variantes obtenidas se comportaron igual que Lip I.3 wt en cuanto a su perfil cinético. A pesar de que, de acuerdo con los resultados observados más arriba, algunas de las variantes mejoradas de Lip I.3 como el mutante G152L muestran una mayor velocidad inicial, los cambios realizados en la estructura del Lid1 no fueron suficientes para causar la manifestación de la activación interfacial observada en PML. Estos resultados además demuestran que los cambios efectuados sobre el Lid1 no son los únicos determinantes de esta característica. En cambio, las posiciones 152 y 154 sí presentan gran influencia en la actividad y en la especificidad de sustrato, por lo que estos resultados sugieren que el Lid1 puede ser un sitio diana interesante para futuras modificaciones.

Obtención de mutaciones por saturación

Al igual que para las mutaciones sitio dirigidas, para obtener variantes enzimáticas de Lip I.3 por saturación se utilizó como molde el plásmido pBBR1MCS-Lip I.3. Sobre la secuencia de *lip* I.3 se introdujeron las mutaciones Y29X, F166X, W310X y N344X mediante el método de Quikchange®. En este caso se utilizaron primers conteniendo codones degenerados NNK, los cuales codifican para todos los posibles aminoácidos y un codón de terminación²¹¹ (tabla 9), que permiten generar una librería de variantes enzimáticas para cada una de las posiciones a modificar. Los primers utilizados se describen en *Metodología*.

Tabla 9: Aminoácidos codificados por las distintas posibilidades presentes en el codón degenerado NNK, situado en la posición correspondiente al aminoácido a modificar en la secuencia de Lip I.3.²¹¹

Codón degenerado NNK					
Aminoácido	Codones	Aminoácido	Codones	Aminoácido	Codones
Ala [A]	2	Leu [L]	3	Pro [P]	2
Arg [R]	3	Lys [K]	1	Ser [S]	3
Asn [N]	1	Met [M]	1	Thr [T]	2
Asp [D]	1	Phe [F]	1	Trp [W]	1
Cys [C]	1	Gly [G]	2	Tyr [Y]	1
Gln [Q]	1	His [H]	1	Val [V]	2
Glu [E]	1	Ile [I]	1	Stop	1
Total					
Codones		32	AA		20

Luego de la amplificación y la digestión del plásmido parental con *DpnI* para eliminar las moléculas no modificadas del vector, se transformó la cepa *Ps. aeruginosa* PAO1 Δ lipH con la genoteca de plásmidos mutados. Los transformantes se recuperaron en medio LB suplementado con cloranfenicol, y luego se sembraron en placas de Agar Tributirina base conteniendo trioctanoilglicerol (TC8) o aceite de oliva (AO), y rodamina para evidenciar la actividad lipasa. En total se prepararon 4 genotecas de mutantes, cada una de ellas dirigida a una de las 4 posiciones a modificar. Mediante el sistema de detección de actividad en placa se analizaron 120 clones correspondientes a la mutación W310X, 112 clones correspondientes a cada una de las mutaciones Y29X y N344X, y 96 clones correspondientes a la mutación F166X, por lo que todas las genotecas tuvieron más del 95% de cobertura.²¹¹ Como se observa en la figura 58, en el medio TC8 se observó actividad en numerosos clones. Sin embargo, en el medio conteniendo aceite de oliva la actividad no fue tan evidente. Se detectaron halos de precipitación de rodamina, pero no fue posible observar la clarificación del medio, probablemente debido a la baja sensibilidad del sistema y a la escasa proporción de biomasa disponible en las estrías.

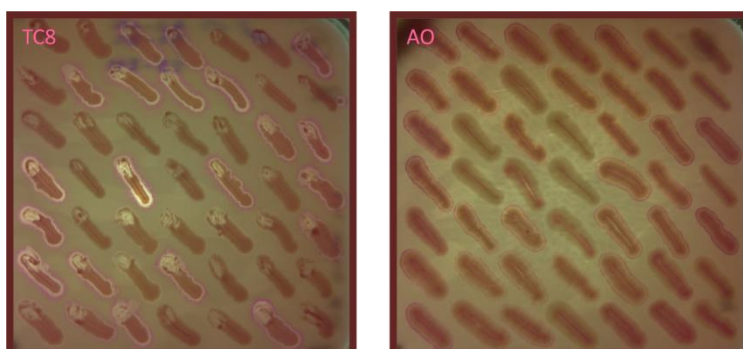


Figura 58: Ejemplo de análisis en placa para detectar la actividad de las variantes obtenidas para las mutaciones generadas por saturación. TC8: Agar tributirina base con trioctanoil glicerol, AO: Agar tributirina base con aceite de oliva. Ambos medios contienen rodamina como indicador de actividad.

Como las diferencias observadas entre los clones mutantes y la cepa conteniendo la Lip I.3 wt no era evidente, y además se contaba con un método rápido para medir actividad basado en el análisis en placas de microtitulación, se procedió a estudiar por este método todos los clones recuperados. Se determinó la actividad relativa sobre MUF oleato presente en el sobrenadante del medio de cultivo de los mismos, mediante ensayos de hidrólisis en placas de microtitulación. Se tomó como 100% la actividad de Lip I.3 wt sobre este sustrato. El resumen de los resultados obtenidos en cuanto a la hidrólisis de MUF oleato se muestra en la Tabla 10. Los resultados indican una mayor influencia de las posiciones 29 y 310 en la actividad de Lip I.3, en comparación con una menor influencia de los sitios 166 y 344, siendo este último el de menor incidencia. Los aminoácidos F166 y N344 se encuentran más alejados del sitio activo que Y29 y W310, como se puede ver en el modelo estructural de la figura 52. Se ha observado previamente que las modificaciones en la actividad catalítica se producen más frecuentemente cuanto más cercano se encuentra el aminoácido mutado del sitio activo.¹⁰⁵ Los resultados obtenidos son concordantes con esta tendencia, ya que los cambios más significativos en cuanto a la posibilidad de aceptar sustratos de cadena larga aparecieron en las posiciones más próximas al centro catalítico de la enzima.

Tabla 10: Resultados de actividad sobre MUF oleato de los mutantes obtenidos por saturación

	Mutación			
	Y 29X	F166X	W310X	N344X
Actividad máxima obtenida (% relativo a Lip I.3 wt)	140.5	131.4	141.8	124.1
Porcentaje de mutantes con actividad \geq 130 %	4.5	1.0	2.5	0.0
Porcentaje de mutantes con actividad < 50 %	3.6	2.1	3.3	0.9

Los mutantes que presentaron mayor actividad fueron subcultivados y los plásmidos que contenían fueron secuenciados para determinar la sustitución responsable del aumento de actividad. En la tabla 11 se muestran los clones secuenciados y el porcentaje de actividad obtenido para cada uno de ellos tras cultivo en medio líquido.

Tabla 11: Clones que presentaron mayor actividad.

Mutación	Clon	Actividad relativa (%) ^a
W310X	P6C3	142
Y29X	P1C3	141
Y29X	P4A5	137
W310X	P6C5	137
Y29X	P1D4	136
Y29X	P4C11	136
Y29X	P4A4	135
W310X	P5B11	133
F166X	P3H3	131
N344X^b	P2F10	124

^a Se calcula la actividad relativa como $100 \times \text{Act mutante} / \text{Act Lip I.3 wt}$

^b Si bien otros clones Y29X, W310X y F166X no analizados presentaron mayor actividad, se eligió el clon P2F10 para tener datos sobre la mutación N344X

Variantes Y29X

Se secuenciaron 5 clones correspondientes a modificaciones en la posición Y29, pero para 3 de ellos no fue posible obtener secuencias adecuadas. Uno de ellos presentó repetidamente secuencias de baja calidad, mientras que para los otros dos se pudo obtener una secuencia legible, pero ésta no coincidía con lo esperado. Es posible que hayan ocurrido eventos de recombinación que hayan alterado la estructura del plásmido en estos dos mutantes. Otros dos clones provenientes de esta biblioteca presentaron secuencias coherentes. En éstos se encontraron las mutaciones Y29C (P4A5, Act 137 %) e Y29T (P1D4, Act 136 %). En ambos casos se produce la sustitución de un aminoácido voluminoso como es la tirosina por aminoácidos más pequeños, como son la cisteína y la treonina. Se realizó el modelado de la estructura tridimensional de los mutantes, tomando como molde las estructuras cerrada y abierta de PML, y se superpusieron sus estructuras con la obtenida para Lip I.3 wt con objetivo de detectar diferencias que pudieran justificar el incremento de actividad sobre sustratos de cadena larga. En la figura 59a se muestra el resultado obtenido para la conformación cerrada, siendo similar el obtenido con la conformación abierta. Se puede observar que al cambiar la tirosina en la posición 29 por cisteína o por treonina, se duplica la distancia entre el oxígeno de la serina catalítica y el átomo más cercano del aminoácido en la posición 29 (Figura 59b-d). Esto resulta en un mayor espacio para la entrada de sustrato, lo que justificaría plenamente el aumento de actividad sobre un sustrato de cadena más larga como es el MUF oleato.

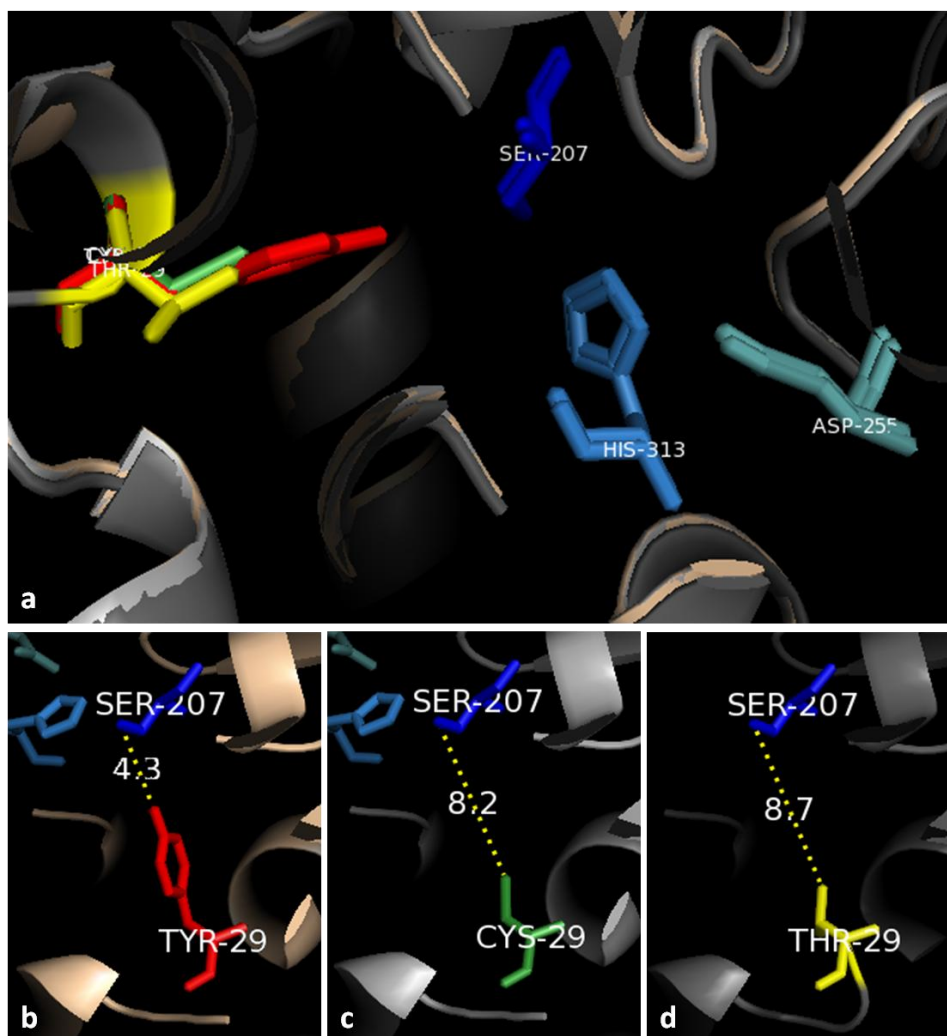


Figura 59: a) Superposición de las estructuras de Lip I.3 wt con las mutantes Y29C e Y29 T. Abajo: Detalle de las distancias en Å entre el oxígeno de la serina catalítica y el átomo más cercano del aminoácido en la posición 29 para b) Lip I.3 wt, c) Lip I.3 Y29C y d) Lip I.3 Y29T. Se muestran tonos de azul los aminoácidos de la tríada catalítica. En rojo se indica el aminoácido Y29 mientras que los cambios efectuados se pueden ver en verde (C29) y en amarillo (T29)

Variantes F166X

En el caso de las mutaciones sobre el sitio F166, el secuenciado del clon P3H3 determinó la presencia de una mutación silenciosa, cambiando el codón TTC por TTT. La cepa *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 presenta preferencia por el codón TTC,²¹²⁻²¹³ por lo que no parece adecuado explicar el aumento de actividad por un aumento en la expresión de la lipasa al incrementarse la velocidad de traducción. De hecho, se esperaría una menor expresión dado que el codón TTT es mucho menos utilizado que TTC. Es probable que la actividad medida para el clon P3H3 no haya sido correcta a causa de una mayor producción de biomasa, lo cual hace que se requiera una nueva determinación de actividad. Además se cuenta con otros clones con buena actividad pertenecientes a la genoteca en posición F166, los cuales serán secuenciados y analizados próximamente.

Variantes W310X

Para la biblioteca W310X se secuenciaron 3 mutantes, todos ellos con buena actividad sobre MUF oleato, en los cuales se encontraron las mutaciones W310M (P6C3, Act 142 %), W310F (P6C5, Act 137 %) y W310Q (P5B11, Act 133%). Como en el caso anterior, se realizó el modelado de la estructura de los tres mutantes tomando como molde tanto la estructura cerrada de PML como la abierta. En la figura 60 se muestran los resultados para la conformación abierta, siendo similares los resultados obtenidos para la conformación cerrada. Al igual que para los mutantes en la posición Y29, en los tres mutantes en posición W310 también se produce el cambio de un aminoácido voluminoso por aminoácidos más pequeños. Como se puede observar en la figura 60a, el triptófano se proyecta mucho más hacia el túnel de entrada del sustrato que los aminoácidos metionina, fenilalanina o glutamina por los que resulta sustituido. Los cambios observados, al igual que en el caso de Y29C e Y29T, producen un aumento del espacio disponible (figura 60b-e) y por lo tanto el MUF oleato puede ingresar más fácilmente al sitio activo.

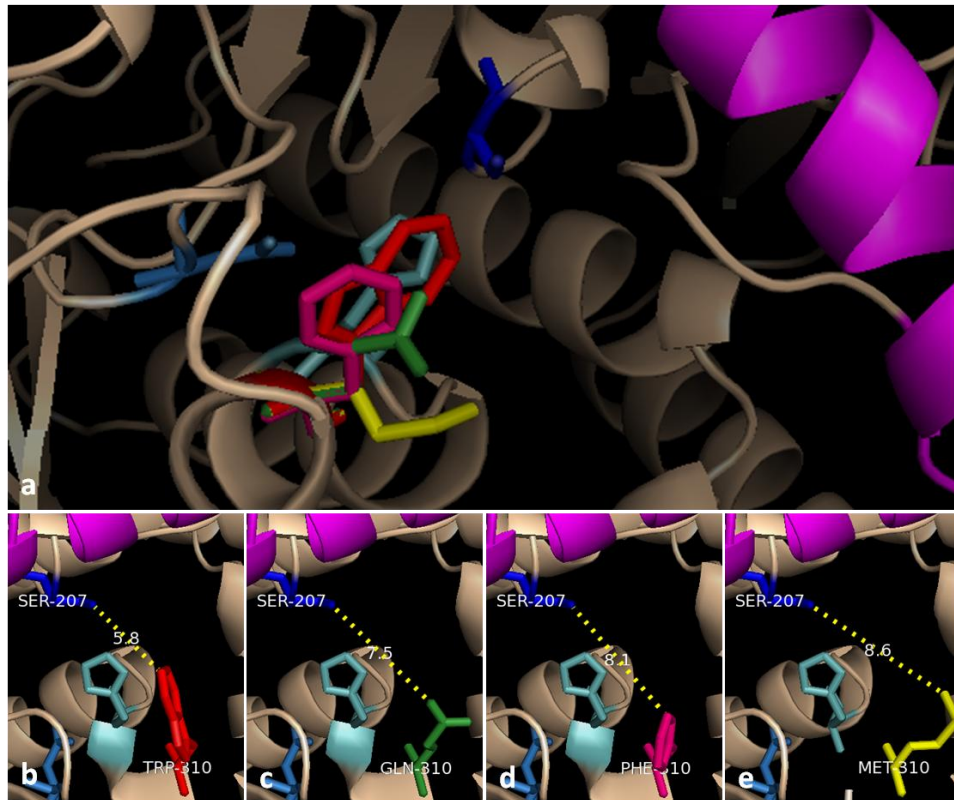


Figura 60: a) Superposición de las estructuras de Lip I.3 wt con las mutantes W310 M, W310F y W310 Q. Abajo: Detalle de las distancias en Å entre el oxígeno de la serina catalítica y el átomo más cercano del aminoácido en la posición 310 para b) Lip I.3 wt, c) Lip I.3 W310 Q, d) Lip I.3 W310F y e) Lip I.3 W310M. Se muestran tonos de azul los aminoácidos de la tríada catalítica. En rojo se indica el aminoácido W310 mientras que los cambios efectuados se pueden ver en verde (Q310), en rosado (F310) y en amarillo (M310).

Variantes N344X

El único mutante en la posición 344 capaz de provocar un incremento significativo en la actividad sobre MUF oleato fue la variante N344R (P2F10, Act 124 %). En este caso el incremento de actividad no fue tan importante como para los mutantes en las posiciones Y29 y W310, probablemente por hallarse más alejado del sitio activo. Al igual que para las mutantes en las posiciones 29 y 310, se construyeron dos modelos de la estructura tridimensional de la mutante N344R, uno basado en la conformación cerrada de PML y otro basado en la conformación abierta. Si bien no se pudo observar en los modelos ningún cambio importante en cuanto a la conformación que pudiera explicar el aumento en la actividad, se observa que mientras que en la conformación abierta N344 y R344 se superponen, en la conformación cerrada la cadena lateral de R344 ocupa un lugar distinto al que ocupa N344 (Figura 61). Esto indica que la cadena lateral se acomoda de manera distinta en la conformación abierta y cerrada de la enzima, por lo que la sustitución producida podría tener influencia en la apertura del Lid1 y el Lid 2. Si bien no se ha encontrado que Lip I.3 tenga activación interfacial, podría producirse un efecto favorable por una mayor apertura de una o las dos tapas. A pesar de un exhaustivo estudio realizado sobre PML,¹³⁸ todavía quedan muchos interrogantes sobre los mecanismos por los cuales el Lid se abre y se fija por medio de la coordinación de algunos de sus aminoácidos con el ión Ca1. En cualquier caso se deberá investigar más a fondo los mecanismos de activación interfacial de las lipasas de esta subfamilia para así poder determinar con certeza la influencia de estas mutaciones.

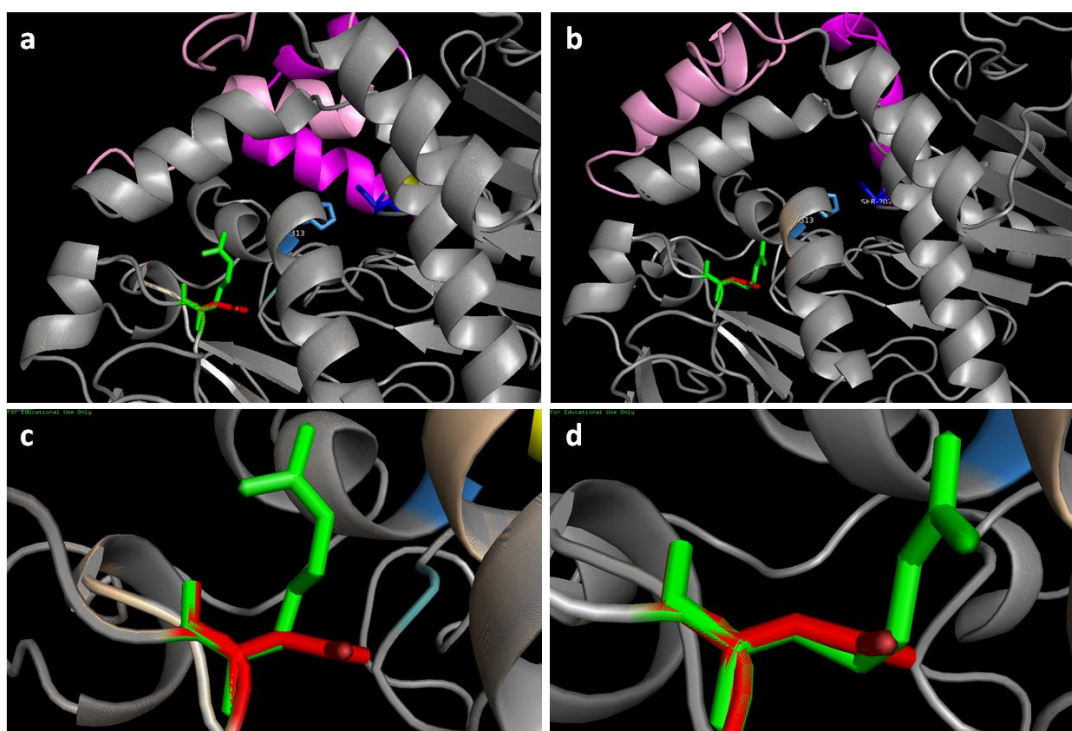


Figura 61: Superposición de las estructuras de Lip I.3 wt con la mutante N344R. **a)** Estructura cerrada **b)** Estructura abierta, **c y d)** Detalle de las estructuras mostradas en **a y b**. Tonos de azul: aminoácidos de la tríada catalítica, rojo: N344, verde: R344, violeta: Lid1, rosado: Lid 2.

Mutagénesis de Lip I.3: conclusiones y trabajo a futuro

Mediante mutagenesis sitio dirigida y mutagenesis por saturación fue posible desarrollar variantes mejoradas de Lip I.3. Se logró aumentar la actividad hidrolítica de esta enzima tanto frente a su sustrato óptimo, el MUF heptanoato, como hacia el MUF oleato, un sustrato de cadena larga sobre el cual Lip I.3 wt prácticamente no tiene actividad. En el *Capítulo 4* se comprobó que Lip I.3 no es capaz de hidrolizar triglicéridos con ácidos grasos de cadena larga. Es probable que las variantes de Lip I.3 que presentaron actividad aumentada sobre MUF oleato también presenten mayor actividad sobre trioleína y otros triglicéridos con ácidos grasos de cadena larga, aunque esto no ha sido demostrado. En particular, se pudo observar que la mutante G152L de Lip I.3 presenta mayor actividad hidrolítica frente a MUF oleato que la Lip I.3 nativa. En esta mutante se sustituye en la posición 152 el aminoácido glicina, presente en la Lip I.3 nativa, por el aminoácido leucina, el cual se encuentra en PML. Por lo tanto este cambio podría ser una de las causas estructurales de la diferencia de actividad sobre los sustratos de cadena larga entre Lip I.3 y PML. La lipasa de *S. marcescens* Sr41 8000 también presenta el aminoácido glicina en la posición 152,¹²⁴ lo que apoya esta hipótesis.

En el estudio de los mutantes por saturación se utilizó un método de cribado rápido, el cual permite analizar numerosos clones simultáneamente. Este ensayo es muy útil para la detección de los mejores mutantes; sin embargo, para confirmar los resultados obtenidos, se deberán realizar ensayos más controlados. Se realizará la purificación de las enzimas mutantes para el estudio más profundo de sus propiedades catalíticas.

Por otro lado, los resultados obtenidos abren el camino para nuevas modificaciones. Se ha construido ya el doble mutante Lip I.3 G152L/S154T, cuya actividad será analizada en breve. Como se mencionó anteriormente, la construcción del mutante S118T podría aportar más información sobre la incorporación de Ca₁, por lo que resulta interesante el estudio de sus propiedades. Además, se podrán combinar otras mutaciones para mejorar aún más las propiedades de esta enzima y profundizar en el conocimiento de la relación estructura-actividad dentro de la subfamilia I.3. Por último se analizará la utilidad biocatalítica de todas las variantes generadas en diversas aplicaciones sintéticas y en la industria del biodiesel

Conclusiones y perspectivas

Conclusiones y perspectivas

Este trabajo de tesis se centró en el estudio y modificación de las propiedades biocatalíticas de la lipasa Lip I.3, proveniente la bacteria *Pseudomonas* sp. CR-611, aislada de un suelo subtropical de Puerto Iguazú, Argentina. Esta lipasa pertenece a la subfamilia I.3 de las lipasas, la cual ha sido mucho menos estudiada que las subfamilias I.2 y I.3, donde se agrupan otras lipasas provenientes del género *Pseudomonas*. Los resultados obtenidos en el transcurso de este trabajo han aportado significativamente al conocimiento sobre uno de los integrantes de la subfamilia I.3, ampliando los horizontes del conocimiento en esta área.

Como primer objetivo, se desarrollaron métodos de producción y purificación para la lipasa Lip I.3 de *Pseudomonas* sp. CR-611. Inicialmente se purificó la enzima a partir de la cepa *E. coli* (pGEMT Lip I.3), que la produce en forma de cuerpos de inclusión. Por ello fue necesario utilizar un método que permitiera recuperar la enzima a partir de éstos. En base a los resultados obtenidos por Kojima y colaboradores,¹⁴³ se desarrolló un método adecuado, que permitió recuperar la enzima en forma activa y con muy pocas proteínas contaminantes. Posteriormente se logró un mayor grado de pureza utilizando tanto cromatografía de intercambio iónico como la purificación por afinidad. A pesar de que deben realizarse ajustes para mejorar los rendimientos obtenidos, el método de purificación por afinidad permite obtener la enzima con un elevado nivel de pureza de manera sencilla y directa, por lo que podría resultar un método muy conveniente para esta purificación.

Si bien la purificación a partir de los cuerpos de inclusión permitió obtener preparados de Lip I.3 adecuados para su estudio, el método resultaba tedioso y consumía grandes volúmenes de soluciones acuosas. Por este motivo, se desarrollaron nuevos sistemas de expresión para Lip I.3, con el objetivo de producirla en forma soluble. Se llevó a cabo el desarrollo de un sistema de expresión en *Pichia pastoris*, pero no fue posible detectar producción de la lipasa Lip I.3 en los sobrenadantes. A pesar de los numerosos ensayos realizados no se logró determinar las causas de este fallo. Sin embargo, se logró con éxito la expresión de Lip I.3 utilizando como huésped la cepa *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 $\Delta lipH$. La presencia de un sistema de secreción del tipo I en esta cepa permite el reconocimiento de Lip I.3 para su exportación al sobrenadante del medio de cultivo, lo que facilita enormemente su purificación posterior. Este desarrollo fue clave para permitir la aplicación de métodos cribado de alto rendimiento, necesarios para analizar las numerosas variantes producidas mediante mutagenesis por saturación.

Una vez obtenida la lipasa Lip I.3 en forma pura, fue posible realizar su caracterización. Se determinó que se trata de una lipasa acidófila, con un pH óptimo de 5,5, siendo la primera lipasa acidófila perteneciente a la subfamilia I.3 que ha sido reportada.¹⁸ La temperatura óptima es de 30 °C, manteniendo buena actividad entre 20 y 40 °C. A 30 °C, la enzima mantiene un 60 % de su actividad tras una hora de incubación. La presencia de calcio es necesaria para su actividad, alcanzándose la máxima actividad a concentraciones de este ion de 20 mM. Los sustratos sobre los que presenta mayor actividad son los derivados de *p*NP y MUF de cadena media, en particular el *p*NP-caproato y MUF-heptanoato. Pese a que el modelado de la estructura tridimensional de Lip I.3 reveló la presencia de 2 lids, similares a las

encontradas en la estructura de PML, en la hidrólisis de MUF heptanoato Lip I.3 presentó una cinética tipo Michaelis-Menten, sin la activación interfacial típica de muchas lipasas. Para esta reacción, en las condiciones óptimas de ensayo, se obtuvo una V_{\max} aparente de $2,48 \pm 0,75 \times 10^3 \text{ U mg}^{-1}$ y una K_m aparente de $382 \pm 47 \mu\text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, y un valor de K_{cat} de $8,0 \pm 2,4 \text{ min}^{-1}$, constantes cinéticas cercanas a las descritas para otras lipasas con actividad sobre sustratos de similares características.¹⁹¹⁻¹⁹²

Se estudiaron diversos compuestos que podrían afectar la actividad de la enzima Lip I.3. Se determinó que la presencia de Tritón X-100®, a concentraciones de hasta casi 1 %, activa a la enzima, probablemente debido a que evita la formación de agregados. El Tritón X-100® presenta también un efecto positivo en el almacenamiento a largo plazo a 4 y -20 °C, permitiendo que se mantenga la actividad cerca del 100 % incluso después de 22 días de almacenamiento. Tanto la urea como el SDS influyen negativamente en la actividad de la enzima. En cambio el PMSF, inhibidor específico de Serina-hidrolasas, no afecta su actividad. Esto puede deberse a factores estructurales, que no permiten que el PMSF ingrese al sitio activo,^{117,198,200} que son probablemente la causa de su preferencia por sustratos de tamaño medio y su baja actividad sobre sustratos más voluminosos. Lip I.3 tampoco se ve afectada por la mayoría de los iones metálicos ensayados, siendo la excepción los iones hierro, cobre, zinc, mercurio y cadmio, que inhiben fuertemente su actividad. Níquel, manganeso y cobalto producen tan sólo una inhibición moderada de la lipasa Lip I.3.

Con el objetivo de ampliar el repertorio de biocatalizadores con actividad lipolítica disponible, se realizó en este trabajo la búsqueda de nuevas enzimas lipolíticas en muestras metagenomas de ambiente. Se utilizaron métodos de cribado en base a la actividad, dado que presentan el potencial de permitir la detección de biocatalizadores novedosos, radicalmente distintos a los descritos previamente. Se realizó la extracción y purificación del ADN de dos ambientes, uno contaminado y otro libre de contaminación. Si bien para el ambiente no contaminado se logró desarrollar un método de purificación de ADN adaptado a sus características, no fue posible obtener la cantidad suficiente de ADN para construir genotecas. A partir de las genotecas de ADN metagenómico proveniente del ambiente contaminado se recuperaron numerosos clones positivos, entre los que se identificaron una carboxipeptidasa, y una transpeptidasa, las cuales podrían llegar a ser responsables de la actividad lipolítica observada. Se realizará en el futuro el clonado de estos genes para comprobar esta hipótesis y evaluar su posible aplicación como biocatalizadores.

Aunque se detectaron genes de dos enzimas con posibilidad de mostrar actividad lipolítica, el análisis funcional de la genoteca construida no permitió detectar ninguna enzima que tuviera relación con enzimas lipolíticas reportadas. Por otro lado, la construcción de genotecas a partir de metagenomas requirió de un considerable esfuerzo para la optimización de las condiciones de extracción y purificación del ADN. A pesar de tratarse de dos muestras muy similares, el método desarrollado para la purificación de ADN a partir de una de ellas no tuvo éxito con la otra, por lo que fue necesario un nuevo desarrollo. Esto es común en la obtención de metagenomas, y ha sido señalado que los métodos disponibles para la extracción de ADN requieren ser optimizados en cada caso,²¹⁴ con resultados inciertos. A pesar de lo atrayente que resulta la exploración de la amplia diversidad existente en los suelos y en los sedimentos de cursos de agua, requiere un gran esfuerzo la recuperación de biocatalizadores a partir de los mismos. Algunos ambientes, por ejemplo los ambientes acuáticos, permiten la recuperación más sencilla del ADN, aunque la diversidad es menor que en los suelos y sedimentos.²¹⁵ Se requiere aún mayor investigación en los métodos de aislamiento y purificación de ADN metagenómico a partir de suelos y sedimentos para superar los retos que éstos presentan. El reciente avance en el secuenciado de genomas completos de microorganismos^{198,216-217} y de metagenomas^{93-94,216} provee un gran caudal de información que podría ser aprovechada más fácilmente para la búsqueda de nuevos biocatalizadores, si bien sólo permiten detectar enzimas relacionadas con las ya conocidas. A pesar de los grandes avances realizados, el descubrimiento de nuevos biocatalizadores aún presenta numerosos desafíos, los cuales deberán ser superados para poder acceder a todas las posibilidades que nos ofrece la naturaleza.

A pesar de los problemas enfrentados en el descubrimiento de nuevos biocatalizadores a partir de metagenomas, paralelamente al desarrollo de este trabajo nuestro grupo identificó nuevas lipasas en microorganismos aislados de distintas fuentes. En el estudio de los endofíticos de la especie *Fortunella margarita* (quinoto o kumquat), se encontró una cepa de *Aureobasidium pullulans* con alta actividad lipolítica. Esta cepa produce una lipasa extracelular, que presenta un interesante potencial como biocatalizador. A partir de una muestra de suelo proveniente de la Antártida, se aisló la cepa R06, relacionada al género *Janibacter*, la cual también produce una lipasa extracelular. Estas dos lipasas, junto con Lip I.3, fueron estudiadas en su aplicación a la síntesis de biodiesel y la derivatización del glicerol. CQA y R06 presentaron una interesante selectividad hacia la monoacilación en la esterificación de 1,3-propanodiol, a diferencia de las enzimas comerciales utilizadas como control, CAL-A y PSL, que dieron mayoritariamente el producto diacilado. Esta selectividad podría tener aplicación en procesos sintéticos. Lip I.3 no presentó buenos resultados en las reacciones analizadas.

Además, se analizó la actividad de Lip I.3 frente a cuatro sustratos descritos por Naik y colaboradores,²⁰⁷ que permiten comparar la conformación del sitio activo con lipasas comerciales. El sustrato frente al cual Lip I.3 presentó mejor actividad fue el α -metilbencil butirato, que al igual que los derivados de MUF y pNP, es un éster de un alcohol aromático, lo cual puede ser interesante desde el punto de vista biocatalítico. Se deberán realizar ensayos con más sustratos para establecer las preferencias y las posibles aplicaciones biocatalíticas de Lip I.3. Esto se verá facilitado por el desarrollo del sistema de expresión de Lip I.3 en *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 $\Delta lipH$, que permitirá obtener las cantidades de enzima necesarias de forma mucho más simple que el sistema basado en *E. coli*.

Durante los ensayos de aplicaciones biocatalíticas se observó que Lip I.3 no es capaz de transesterificar ni hidrolizar triglicéridos conteniendo ácidos grasos de cadena larga, lo cual está de acuerdo con su preferencia de sustrato. Dado que esta característica no es adecuada para determinadas aplicaciones biocatalíticas, como por ejemplo la síntesis de biodiesel, nos planteamos la utilización de métodos de ingeniería genética para extender el rango de sustratos aceptados por Lip I.3 hacia sustratos con largos de cadena mayores. En base al modelo tridimensional de Lip I.3 se seleccionaron 3 aminoácidos voluminosos que podían estar bloqueando el túnel de entrada al sitio activo: Y29, F166 y W310. Por otro lado, de acuerdo a trabajos anteriores,¹¹⁰ se seleccionó también el aminoácido N344. Se realizó mutagenesis por saturación en los cuatro aminoácidos seleccionados. Para todos ellos fue posible obtener variantes con actividad aumentada sobre sustratos de cadena larga, aunque las posiciones 29 y 310 presentaron mayor influencia en la actividad que las posiciones 166 y 344. Los mutantes Y29C, Y29T, W310M, W310F y W310Q, presentaron actividades sobre MUF oleato entre 133% y 142 % de la actividad de Lip I.3 wt. Mediante el modelado de la estructura tridimensional de los mutantes se comprobó que las mutaciones incorporadas aumentan el espacio disponible para el sustrato en al ingresar al sitio activo, lo que explica claramente el aumento de actividad.

En este trabajo de tesis fue posible comprobar en distintas oportunidades que la similitud de secuencia entre Lip I.3 y otras lipasas de la subfamilia I.3 no siempre se refleja en las propiedades biocatalíticas. Se realizaron ensayos de mutagenesis sitiodirigida para establecer la influencia de estas pequeñas diferencias en la actividad. En particular, dado que una de las diferencias observadas entre PML, SML y Lip I.3 es la presencia o ausencia de activación interfacial, se restringieron las mutaciones a la zona del Lid 1, descrito como funcional en PML.¹³¹ Se encontró que las mutaciones G152L y S154TG producen un aumento de actividad con respecto a la Lip I.3 wt, tanto en la hidrólisis de MUF heptanoato, sus sustrato óptimo, como en la hidrólisis de MUF oleato. G152L presenta más del doble de actividad sobre MUF heptanoato que Lip I.3 wt, mientras que sobre MUF oleato el aumento es de más de 5 veces. En el caso de S154T los resultados son aún superiores, observándose un aumento mayor a 5 veces para el MUF heptanoato y de casi 11 veces para el MUF oleato. Si bien para estos mutantes no fue posible establecer con certeza relación entre la mutación introducida y el aumento de actividad, en el caso de S154T podría deberse a que esta mutación restablezca el sitio de unión del Ca¹, el cual funciona como punto de anclaje del Lid1. Los resultados comprueban que aún un pequeño cambio por aminoácidos muy similares, como son serina y treonina, puede producir una gran diferencia en la actividad de estas lipasas. No fue posible en estos ensayos encontrar dentro de las mutaciones realizadas ninguna que explicara la diferencia en activación interfacial entre Lip I.3 y PML; sin embargo, se comprobó que las posiciones 152 y 154 presentan gran influencia en la actividad y en la especificidad de sustrato. Estos resultados sugieren que el Lid1 puede ser un sitio diana interesante para futuras modificaciones.

Los resultados obtenidos permitieron profundizar más en el conocimiento de la relación estructura actividad dentro de la subfamilia I.3 de las lipasas, aportando una base de conocimiento para el futuro desarrollo del área. En conjunto, las observaciones documentadas en esta tesis contribuyen a aumentar el conocimiento sobre las características de las lipasas pertenecientes a la subfamilia I.3, un terreno que había sido poco explorado previamente.

Metodología

Metodología

Métodos microbiológicos

La triptona para la preparación de medios de cultivo fue comprada de FisherBiotech o de Amresco. El agar, el extracto de levadura y la base nitrogenada de levadura fueron adquiridos de Difco y los casaminoácidos de Becton Dickinson. El trioctanoilglicerol, la ampicilina, el cloranfenicol y el medio Agar tributirina se obtuvieron de Sigma-Aldrich. Las sales para los medios de cultivo se adquirieron de Fluka, Sigma-Aldrich y Droguería Industrial. El aceite de oliva proviene de Cousa.

Cepas utilizadas

Tabla 12: Cepas utilizadas

Cepa	Genotipo o características	Referencias y proveedor
<i>E. coli</i> 5K	F ⁻ r _k ⁻ m _k ⁻ rpsL thr thi leu lacZ	218
<i>E. coli</i> TOP 10 (Invitrogen)	F ⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str ^R) endA1 λ ⁻	219, Invitrogen
<i>PichiaPink</i> TM cepa 1	ade2	175, Invitrogen
<i>PichiaPink</i> TM cepa 2	ade2, pep4	175, Invitrogen
<i>PichiaPink</i> TM cepa 3	ade2, prb1	175, Invitrogen
<i>PichiaPink</i> TM cepa 4	ade2, prb1, pep4	175, Invitrogen
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 ΔlipH PW5805	lipH(PA2863)-C01::ISphoA/hah	177,210,220
<i>Pseudomonas</i> sp. CR-611	Cepa con alta actividad lipolítica aislada de suelo de bosque subtropical de Puerto Iguazú, Argentina	82
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	rmo ⁻ mod ⁺	221-223

Mantenimiento de las cepas

Se utilizaron técnicas estándar de microbiología para el manejo de todas las cepas. Para el cultivo de las cepas de *E. coli* y de *Pseudomonas* se utilizó el medio Luria Bertani (LB)²²⁴ en forma líquida o en placa (en presencia de agar bacteriológico al 1,5 %). Para las cepas conteniendo plásmidos con resistencia a antibióticos se añadió también ampicilina en una concentración de 50 µg/mL o cloranfenicol en concentraciones de 100 µg/mL o 400 µg/mL. Los cultivos de *E. coli* fueron incubados a 37 °C, los de *Pseudomonas* a 37 o 30 °C. El mantenimiento a corto plazo de las cepas se realizó mediante cultivos en placa, las cuales fueron selladas con Parafilm® y almacenadas a 4° C. El mantenimiento a largo plazo se realizó almacenándolas a -80 °C en caldo LB con glicerol al 15 %. Para las cepas de *PichiaPink*TM se utilizaron las condiciones recomendadas en el manual publicado por el proveedor.¹⁷⁵

Medios de cultivo

ADM

Sorbitol	182 g
Agar bacteriológico	15 g
H ₂ O destilada	csp. 800 mL
Se autoclava y se agrega	
Dextrosa 20 % estéril	100 mL
Base nitrogenada de levadura 10× estéril	100 mL
Se reparte en placas de petri estériles.	

MLip - amp (modificación del medio descrito por Kouker y colaboradores)²²⁵

Triptona	5 g
Extracto de carne	3 g
NaCl	4 g
H ₂ O destilada	csp 1000 mL
Se ajusta a pH 7 y se agrega:	
Aceite de oliva	10 g
Lecitina de soja	1 g
Agar bacteriológico.....	15 g
Se autoclava, se termostatiza a 60 °C y se agrega:	
Rodamina al 0,1% estéril.....	5 mL
Se agita enérgicamente, y se deja enfriar agitando periódicamente.	
Una vez que alcanza 45 - 50 °C si es necesario se agrega:	
Ampicilina (50 mg/mL) estéril	4 mL
Se agita enérgicamente y se reparte en placas de petri estériles.	

Agar tributirina conteniendo trioctanoilglicerol(TC8)

Agar tributirina	20 g
Goma arábica	1,5 g
Trioctanoilglicerol	10 g
H ₂ O destilada	csp 1000 mL
Se autoclava, se termostatiza a 60 °C y se agrega:	
Rodamina al 0,1% estéril	5 mL
Se agita enérgicamente, y se deja enfriar agitando periódicamente.	
Una vez que alcanza 45 - 50 °C si es necesario se agrega:	
Cloranfenicol (100 mg/mL)	4 ml
Se agita enérgicamente y se reparte en placas de petri estériles.	

Agar tributirina conteniendo aceite de oliva (AO)

Agar tributirina	20 g
Goma arábica	1,5 g
Aceite de oliva	10 g
H ₂ O destilada	csp 1000 mL

Se autoclava, se termostatiza a 60 °C y se agrega:

Rodamina al 0,1% estéril

5 mL

Se agita enérgicamente, y se deja enfriar agitando periódicamente.

Una vez que alcanza 45 - 50 °C si es necesario se agrega:

Cloranfenicol (100 mg/mL)

4 ml

Se agita enérgicamente y se reparte en placas de petri estériles.

Agar M9-GC

NaHPO ₄ anh	5,58 g
KH ₂ PO ₄	3 g
NH ₄ Cl	1 g
NaCl	0,5 g
Casaminoácidos	2,5 g
H ₂ O destilada	csp 980 mL

Se autoclava, se termostatiza a 50 °C y se agrega:

Glucosa 20 % estéril

20 mL

MgSO₄ 1M estéril

200 µL

CaCl₂ 1M estéril

27,2 µL

Se reparte en placas de petri estériles.

Sistema de expresión *PichiaPink*TM

Para la expresión de proteínas en *Pichia pastoris* se utilizó el sistema de expresión *PichiaPink*TM (Invitrogen). Se siguieron los procedimientos indicados por el fabricante en el manual correspondiente¹⁷⁵ para el mantenimiento de las cepas, la transformación de *P. pastoris* y la expresión de proteínas, con algunas modificaciones.

Transformación de *P. pastoris* y selección de clones positivos

La transformación se realiza utilizando un electroporador MicroPulser (BIORAD). La preparación de células competentes se realizó según el protocolo sugerido por el fabricante del equipo.²²⁶

Preparación de células competentes de *P. pastoris*

A partir de las cepas *PichiaPink*TM 1, 2, 3 y 4 conservadas a -80 °C se inocularon placas de YPD agar²²⁴ y se incubaron a 28 °C por 72 hrs. A partir de colonias aisladas se inocularon 10 mL de YPD, incubándose a 28 °C y 200 rpm por 48 hrs. Se inocularon 100 mL de YPD con el precultivo. Se utilizaron 0,5 mL de precultivo para las cepas 1, 2 y 3, y 1 mL de precultivo para la cepa 4, dado que ésta presenta un crecimiento más lento. Se incubaron las cepas hasta un OD₆₀₀ de 1,3 – 1,5. Se centrifugaron los cultivos a 1500 ×g a 4 °C por 5 min. Luego se lavaron las células 2 veces con 125 mL de agua destilada estéril fría y se centrifugaron nuevamente en las mismas condiciones. Se lavaron una vez más las células con 50 mL de agua destilada estéril fría y se centrifugaron nuevamente a 1500 ×g a 4 °C por 5 min. Se resuspendieron las células en 10 mL de sorbitol 1M frío y se centrifugaron nuevamente. Por último se resuspendieron en 300 µL de sorbitol 1M frío y se repartieron alícuotas de 80 µL en tubos eppendorf estériles, que fueron mantenidas en hielo hasta el momento de ser usadas.

Transformación de *P. pastoris*

Las células competentes deben ser transformadas el mismo día en que se preparan. A la alícuota de 80 µL conteniendo las células se le agregaron 5 – 10 µg de ADN y se incubó en hielo por 5 min. Para cada cepa se realizó además un control negativo, utilizando agua en lugar de ADN y un control positivo, utilizando el plásmido pPINKαHC linearizado con *Spe* I. La mezcla de células y ADN fue transferida a una cubeta de electroporación de 2 mm previamente enfriada en hielo. Se llevó a cabo la electroporación aplicando un pulso de 2 kV después del cual se agregó 1 mL de caldo YPD con sorbitol 1M y se mezcló por inversión. Las células electroporadas fueron incubadas a 28 °C por 2 hrs y luego se realizó la selección de las transformantes en medio ADM, incubándolas a 28 °C por 48 - 96 hrs. Una parte de las colonias blancas fue transferida a nuevas placas de ADM para su propagación y conservación.

Análisis de las transformantes de *P. pastoris* mediante PCR

Se extrajo el ADN de los clones recombinantes utilizando el método indicado por el proveedor (Genomic DNA isolation from PichiaPink for PCR analysis¹⁷⁵). Para la extracción se utilizaron bolitas de vidrio de 0,5 mm (Biospec). Una vez obtenido el ADN, se analizaron las condiciones de PCR mostradas en la Tabla 13, sugeridas en el manual del kit¹⁷⁵ utilizando un volumen total de 25 µL en lugar de 50 µL, para amplificar el gen de Lip I.3 a partir del ADN genómico de los clones. Se utilizó como control positivo el plásmido pPINKαHC-Lip I.3 y como control negativo una cepa de *P. pastoris* transformada con el plásmido pPINKαHC sin inserto.

Tabla 13: Condiciones de PCR analizadas para la amplificación del gen *Lip I.3* a partir de muestras de ADN provenientes de los clones de *P. pastoris*. Se muestran también los controles positivos utilizados.

Nº	Muestras	Primers	Enzima
1	ADN genómico clones <i>P. pastoris</i> Control positivo: pPINKαHC-Lip I.3	5' AOX1 (Macrogen, 500 ng/µL) 3' CYC1 (Macrogen, 500 ng/µL)	Taq polimerasa 1 (Invitrogen)
2	ADN genómico clones <i>P. pastoris</i> Control positivo: pPINKαHC-Lip I.3	5' AOX1 (Macrogen, 500 ng/µL) 3' CYC1 (Macrogen, 500 ng/µL)	Taq polimerasa 2 (Invitrogen), se usa un lote distinto al método 1
3	ADN genómico clones <i>P. pastoris</i> Control positivo: pPINKαHC-Lip I.3	α-factor (Macrogen, 500 ng/µL) 3' CYC1 (Macrogen, 500 ng/µL)	Taq polimerasa 2 (Invitrogen)
4	Control positivo: pPINKαHC-Lip I.3	α-factor (Invitrogen, 500 ng/µL) 3' CYC1 (Invitrogen, 500 ng/µL)	Taq polimerasa 2 (Invitrogen)
5	Control positivo: pPINKαHC-Lip I.3	5' AOX1 (Macrogen, 500 ng/µL) 3' CYC1 (Macrogen, 500 ng/µL)	Taq polimerasa 3 (Invitrogen), se usa un lote distinto a los métodos 1 a 4
6	Control positivo: pPINKαHC-Lip I.3	LipI.3 PP2 Fwd (Macrogen, 500 ng/µL) LipI.3 PP2 Rev (Macrogen, 500 ng/µL)	Taq polimerasa 2 y 3 (Invitrogen)
7	pPINK-CP	CP1 Fwd (Macrogen, 500 ng/µL) CP1 Rev (Macrogen, 500 ng/µL)	Taq polimerasa 2 y 3 (Invitrogen)

Se utilizó en todos los casos el ciclo de PCR que se muestra en la figura 62. Este ciclo de PCR se había utilizado con éxito en la amplificación del gen Lip I.3 a partir de pPINKαHC-Lip I.3. Se realizaron en cada caso los correspondientes controles negativos. No fue posible obtener amplificación ni para las muestras ni para los controles positivos con ninguno de los métodos descritos.



Figura 62: Ciclo de PCR utilizado para amplificar las muestras de ADN genómico provenientes de los clones de *Pichia pastoris*

Ensayos de expresión de las transformantes de P. pastoris

Se siguió el procedimiento descrito por el proveedor¹⁷⁵ con modificaciones. En frascos Erlenmeyer de 125 mL conteniendo 10 mL de medio BMGY¹⁷⁵, se inocularon los clones transformantes de *P. pastoris*. Se utilizó como control negativo un clon transformado con el plásmido pPINK α HC linearizado. Los cultivos se incubaron a 28 °C y 170 rpm por 24 hrs. Los cultivos fueron transferidos a tubos Falcon de 50 mL y centrifugados por 5 min a 1500 \times g y T ambiente. El medio fue decantado y se agregó 1 mL de BMMY.¹⁷⁵ Las tapas de los tubos Falcon fueron sustituidas por 4 – 6 capas de gasa estéril y se incubaron nuevamente a 28 °C y 170 rpm. A las 24 hrs se tomó una muestra de 100 μ L de cada tubo. Estas muestras fueron centrifugadas, separándose por un lado las células y por otra el sobrenadante. Se agregaron a los cultivos 100 μ L de metanol 40 % y se volvieron a incubar a 28 °C y 170 rpm. A las 24 hrs se centrifugaron los cultivos por 10 min a 1500 \times g y T ambiente. Los sobrenadantes fueron transferidos a tubos eppendorf. Se guardaron todas las muestras a -20 °C hasta su análisis por SDS-PAGE y zimograma.

Métodos moleculares

Salvo en los casos que se indica, se utilizaron técnicas estándar de biología molecular²²⁴ para la manipulación de ADN y de proteínas. Se utilizó agarosa (Sigma-Aldrich) para las corridas electroforéticas y se empleó buffer Tris-Borato-EDTA (TBE) 0.5X. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (Sigma-Aldrich). Se utilizó Gene Ruler 1Kb DNA LADDER (Fermentas) como marcador de peso molecular y como estándar en la cuantificación de ADN. Los oligonucleótidos empleados para la amplificación de las secuencias genómicas y su secuenciación fueron obtenidos de Macrogen, de Sigma o en los casos señalados de Invitrogen. Para las reacciones de PCR se emplearon como polimerasas Taq (Invitrogen), Kappa2G Robust (KappaBiosystems) y Phusion High Fidelity DNA polymerase (New England Biolabs). En cada caso se usaron los reactivos suministrados por el proveedor y los dNTPs de New England Biolabs. Las enzimas de restricción fueron adquiridas de New England Biolabs o de Fermentas, utilizándose los buffers suministrados por el proveedor. Otras enzimas empleadas fueron RNasa A (Amresco), Lisozima (Sigma-Aldrich) y proteinasa K (New England Biolabs).

Extracción de Lip I.3 y preparación del extracto crudo

Método 1

Se realizó un cultivo de toda la noche (ON) de *E. coli* 5K (pGEMTLipI.3) y se centrifugó a 8000 rpm y 4 °C por 15 min. Las células fueron resuspendidas en 5 mL de buffer Tris-HCl (pH 7) 50 mM y lisadas utilizando ultrasonido a 50 W y 0,9 s (2 veces, 2 min cada vez). Los lisados celulares fueron centrifugados a 8000 rpm y 4 °C por 15 min. Se recuperaron tanto los extractos celulares (sobrenadante) como los restos celulares particulados que fueron resuspendidos en buffer Tris-HCl 50 mM, pH 7.

Método 2

Se realizó un cultivo de toda la noche (ON) de *E. coli* 5K (pGEMTLipI.3) y se centrifugó a 8000 rpm y 4 °C por 15 min. Las células fueron lavadas con 5 mL de buffer Tris·HCl (pH 7) 50 mM y centrifugadas nuevamente a 8000 rpm y 4 °C por 15 min, para luego ser resuspendidas en buffer Tris·HCl (pH 7) 50 mM, conteniendo cantidades variables de urea entre 1 y 8M. Las suspensiones fueron lisadas utilizando ultrasonido a 50 W y 0,9 s (2 veces, 2 min cada vez). Los lisados celulares fueron centrifugados a 8000 rpm y 4 °C por 15 min. Se recuperaron tanto los extractos celulares (sobrenadante) como los restos celulares particulados que fueron resuspendidos en buffer Tris·HCl (pH 7) 50 mM. Se analizaron las muestras por hidrólisis de MUF butirato en papel de filtro, utilizando como control negativo la extracción de la cepa *E. coli* 5K y como control positivo la extracción de la cepa *E. coli* 5K (pGEMTLipI.3), ambas realizadas por el *Método 1*.

Método 3

Se utilizó el método descrito por Kojima y colaboradores¹⁴³ con las modificaciones que se indican a continuación. Se utiliza la cepa *E. coli* 5K (pGEMT LipI.3) para la producción de la enzima. Tras recuperar las células por medio de centrifugado se utilizó una prensa de French para romper las células, aplicando 1000 psi de presión por 1 min dos veces a cada muestra. Alternativamente se utilizó ultrasonido (5 pulsos de 30 seg. con intervalos de 30 seg., ciclos de 2,5 seg./1 seg. a 20 % de amplitud). Los pasos de diálisis se realizaron cambiando el buffer de diálisis 3 veces, y permitiendo el intercambio de solutos por al menos 3 hrs. cada vez. Luego de dializar las muestras éstas fueron concentradas utilizando filtros Amicon 15 Ultracel 3K. La suspensión obtenida al final de este procedimiento se denomina *extracto crudo*.

Método 4

Se utilizaron las cepas *Ps. aeruginosa* PAO1 (pBBR1MCS Lip I.3) y *Ps. aeruginosa* PAO1 (pBBR1MCS Lip I.3_{mut}) para producir la enzima nativa y las mutantes respectivamente. Se realizaron cultivos de las distintas cepas en LB conteniendo 400 µg/mL de cloranfenicol, los que fueron incubados a 30 °C y 180 rpm por 48 hrs. Se centrifugaron a 8000 rpm y 4 °C por 15 min, descartando el pellet. Para los análisis de cribado de alto rendimiento se realizaron precultivos en placas *deep well* de 2 mL conteniendo 1 mL de LB cloranfenicol (400 µg/mL), los cuales fueron incubados a 30 °C y 180 rpm por 48 hrs. A las 24 hrs se tomaron 100 µL de cada precultivo y se inocularon 900 µL de LB con cloranfenicol 400 µg/mL, también en placas *deep well*. Los cultivos fueron incubados por 48 hrs a 30 °C y 180 rpm. Se centrifugaron las placas a 4000 rpm por 30 min a 4 °C y se tomaron dos alícuotas de 250 µL del sobrenadante, las cuales fueron almacenadas a 4 °C para su posterior análisis.

Purificación de Lip I.3 a partir del extracto crudo

Método 1: Cromatografía de intercambio iónico

Se utilizó un purificador de proteínas ÄKTA (Amersham Biosciences) controlado mediante el software UNICORN v. 4.12 con detector UV, equipado con una columna de intercambio aniónico Tricorn MonoQ 5/50. El programa utilizado y las variables que lo definen se indican en la tabla 14. Para la cromatografía se utilizan los tampones indicados en la tabla 15.

Tabla 14: Programa IEX PP para intercambio iónico y las variables que lo definen

Método: IEX PP		
Variables:		
• Column MonoQ_5/50_GL	• Wash_InletA Off	• Wash_InletB Off
• Flow_Rate 1.00 (ml/min)	• Column_PressureLimit 4.000 (MPa)	• Averaging_Time_UV 1.30
• Start_ConcB 0 (%B)	• Equilibrate_with 5 (CV)	• System_Pump Normal
• System_PressLevel 0 (MPa)	• System_MinFlow 0 (ml/min)	• Flowthrough_FracSize 2 (ml)
• Empty_loop_with 5 (ml)	• Wash_column_with 2 (CV)	• UV_Mode Slope
• MinPeakWidth 0.100 (min)	• Level 0 (mAU)	• Peak_Start_Slope600.000 (mAU/min)
• Eluate_Frac_Size 0.4 (ml)	• Peak_Frac_Size 0.3 (ml)	• Peak_End_Slope 575.000(mAU/min)
• Length_of_Gradient 20.00 (base)	• Gradient_Delay 5.00 (ml)	
• Reequilibrate_with 5.00 (CV)	• Clean_with 5 (CV)	• Target_ConcB 100 (%B)

Tabla 15: Tampones utilizados para la cromatografía de intercambio iónico

Nº	Buffer de comienzo (A)	Buffer de elución (B)	pH	Concentración de Tritón X-100® (%)
1	Tris·HCl 20 mM	Tris·HCl 20 mM + NaCl 1 M	6	0
2			7	0
3			7	0,2
4			7	0,5

Método 2: Purificación por afinidad

La inmovilización de la enzima en el soporte hidrofóbico EP100 (soporte microporoso de polipropileno, AKZO Novel, Holanda) se realizó a pequeña escala, según protocolo descrito por Alarcón¹⁷⁴ con ligeras modificaciones. Se tomó una muestra de 1100 µL del extracto crudo obtenido por el Método 1 (ver Extracción de Lip I.3 y preparación del extracto crudo) y se centrifugó a 12000 rpm por 20 min a 4 °C. 1 mL del sobrenadante se agregó a 10 mg de EP100 humedecido previamente con 30 µL de EtOH absoluto. Se agitó por inversión a temperatura ambiente y extrayendo periódicamente muestras de 20 µL que se guardaron a 4 °C. Una vez transcurridas 24 hrs se analizó la actividad de las muestras. Para la recuperación del soporte se realizó orificio en el fondo del tubo Eppendorf, se colocó éste dentro de otro tubo similar y se centrifugó a baja velocidad por 10 segundos. El soporte recuperado fue secado al vacío.

La elución de la enzima se logró utilizando 200 µL de agua con Tritón X-100® al 0,5 % o buffer acetato 50 mM pH 5,5 con 10 mM CaCl₂ y Tritón X-100® al 0,5 % y agitando por inversión a 4 °C.

Extracción y liofilización de otras lipasas utilizadas

CQA

Se inoculan 2 tubos con 6 mL de medio M9-GC cada uno con una colonia de la cepa *Aureobasidium pullulans* CQA y se incuban a 30 °C y 200 rpm de un día para el otro (ON). Al otro día se inoculan 200 mL de M9-GC con 10 mL del precultivo y se incuban el cultivo a 30 °C y 200 rpm de un día para el otro (ON). Se centrifugan el cultivo a 5000 rpm y 4 °C por 20 min. El sobrenadante se transfiere a un balón de 1000 mL y se congela en baño de EtOH, en rotación para aumentar la superficie. Se almacena a -20 °C por 72 hrs y luego se liofiliza.

R06

Se inoculan 2 tubos con 6 mL de medio M9-GC cada uno con una colonia de la cepa *Staphylococcus hominis* R06 y se incuban a 30 °C y 200 rpm de un día para el otro (ON). Al otro día se inoculan 200 mL de M9-GC con 10 mL del precultivo y se incuban el cultivo a 30 °C y 200 rpm de un día para el otro (ON). Se centrifugan el cultivo a 5000 rpm y 4 °C por 20 min. El sobrenadante se transfiere a un balón de 1000 mL y se congela en baño de EtOH, en rotación para aumentar la superficie, y luego se liofiliza.

Primers

Tabla 16: Lista de primers utilizados

Nombre del primer	Secuencia
Lipl.3 PP2 Fwd	ATG GGT GTG TAT GAC TAC AAG AAT TTC G
Lipl.3 PP2 Rev	CTT GGT ACC TGA TCA CGT ATC CCG TC
Lipl.3 PP1 Fwd	AGA GGC AAC AGC AAT GGG TGT GTA TGA C
CP1 Fwd	CAT GAG TCC AGG CAT GAA AAC AGC
CP1 Rev	TCT GGT ACC TAT AGA TTA TAA ATC TCG CCG TAT T
5' AOX1	GAC TGG TTC CAA TTG ACA AGC
3' CYC1	GCG TGA ATG TAA GCG TGA C
α -factor	TAC TAT TGC CAG CAT TGC TGC

Amplificación del gen de Lip I.3 para su clonado en *Pichia pastoris*

Se amplificó el gen de Lip I.3 a partir de pGEMT-Lip I.3, utilizando los primers Pr LipI.3 PP2 Fwd y Pr LipI.3 PP2 Rev y la polimerasa Phusion High-Fidelity (Finnzymes, New England Biolabs). El ciclo utilizado se muestra en la figura 63.



Figura 63: Ciclo de PCR utilizado para amplificar el gen de Lip I.3

Construcción de genotecas de metagenomas

Extracción de ADN metagenómico

Se sigue procedimiento descrito previamente²⁰¹, cambiando la extracción con fenol por una extracción con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), y realizando la segunda extracción con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Una vez obtenido el extracto, se realizó un segundo paso de purificación para eliminar sustancias que inhiben la digestión con enzimas de restricción. Este paso de purificación fue diferente dependiendo del origen de la muestra. Para las muestras provenientes de L1, se realizaron lavados con buffer TE utilizando concentradores Millipore UFC4LGC25 (10000 NMWL) mediante centrifugado a baja velocidad. Las muestras provenientes de L2 fueron dializadas contra buffer TE (pH 8.0) y posteriormente purificadas utilizando columnas de Sepharosa S-200.

Digestión de ADN metagenómico

Fue necesario optimizar las condiciones para la digestión del ADN metagenómico con la enzima *BfuC I* de manera de obtener fragmentos con un peso molecular promedio de 4000 pb aproximadamente. Para ello se realizó la digestión del ADN metagenómico por 1 hr. a 37 °C, en presencia de cantidades variables de la enzima *BfuC I*. Para la muestra L1 se determinó que una concentración de enzima de 80 mU/μL en un tiempo de incubación a 37 °C de 1 hr. Sin embargo, al aplicar este método a mayor escala se observó un grado de digestión menor a lo esperado, por lo que se agregaron 40 mU/μL de *BfuC I* y se incubó nuevamente a 37 °C por 1 hr. El ADN digerido fue sometido a electroforesis en gel de agarosa 0,8 %, recuperándose los fragmentos entre 2500 y 6000 pb. El ADN fue purificado a partir del gel utilizando el sistema S.N.A.P.™ Gel Purification Kit (Invitrogen). Para la muestra L2 no se realizó este análisis porque no fue posible obtener cantidades suficientes de ADN metagenómico.

Construcción y análisis de la genoteca

Los fragmentos de ADN purificados fueron clonados en el vector pUC19. La genoteca construida se utilizó para transformar la cepa *E. coli* TOP10 mediante electroporación utilizando un electroporador MicroPulser (BIORAD).²²⁶ Las transformantes obtenidas fueron analizadas mediante siembra en agar nutriente conteniendo aceite de oliva y rodamina, conteniendo ampicilina (MLip-amp), en el cual los clones con actividad lipolítica pueden distinguirse por su coloración rosada. Se encontraron 19 clones con coloración rosada fuerte, y numerosos clones con coloración rosada más suaves. Los clones positivos se conservan en reservas congeladas a -70 °C para su análisis posterior. Los plásmidos presentes en los clones positivos fueron analizados mediante restricción y secuenciado.

Mutagénesis por Quikchange

Se introdujeron mutaciones en el plásmido pBBR1MCS-Lip I.3 mediante un método basado en Quikchange^{®209} (Agilent Technologies) Los primers utilizados se indican en la tabla 17. Las secuencias de los primers forward y las mutaciones buscadas se muestran en la Tabla 1. Las secuencias de los primers reverse son complementarias a las de los primers forward. Las mutaciones Y29X, W310X, N344X, F166X corresponden a mutantes por saturación.

Tabla 17: Primers utilizados para la introducción de mutaciones por Quickchange.

Mutación	Secuencia primer Fwd	Secuencia primer Rev
I149N	CCAGCGGCCACGGGAAAACCTGATTGG	CCAATCAGGTTTTCCCGTGGGCCGTGG
I449S	CGCCAATCAGGCTTTCCCGTGGGCCGC	GCGGCCACGGGAAAGCCTGATTGGCG
G152L	CCCACGGGAAATCCTGATTCTAGACTCCATCGGTGACGTG	CACGTCACCGATGGAGTCTAGAATCAGGATTTCCCGTGGG
I149N/G152L	GCGGCCACGGGAAAACCTGATTCTAGACTCCATCGGTGAC	GTCACCGATGGAGTCTAGAATCAGGTTTTCCCGTGGGCCGC
S154T	CCTGATTGGCGACACCATCGGTGACGTG	CACGTCACCGATGGTGTGCCAATCAGG
A165G	GACTTGCTCGCCGGATTCCGGCCCAAG	CTTGGGCCCGAATCCGGCGAGCAAGTC
Y29X	GCCATTACGCTGTATTCCNNKCAACCTCGATAACGGC	GCCGTTATCGAGGTTGTGMNNGGAATACAGCGTAATGGC
W310X	CGTCAACATTCGACCNNKATCTCGCATCTGCCGACC	GGTCGGCAGATGCGAGATMNNNGTCGGAAATGTTGACG
N344X	CGATCATCGTCGCCNNKCTGTCCGATCCGGC	GCCGGATCCGACAGMNNNGCGAGATGATCG
F166X	CAACGACTTGCTCGCCGCANNKGGGCCAAGGAT	ATCCTTGGGCCMNTGCGCGAGCAAGTCGTTG

Utilizando como molde el plásmido pBBR1MCS-Lip I.3, se realizó la amplificación por PCR con la enzima Phusion High Fidelity DNA polymerase (New England Biolabs), utilizando los primers mostrados en la tabla 17. Las condiciones de amplificación se muestran en la figura 64.

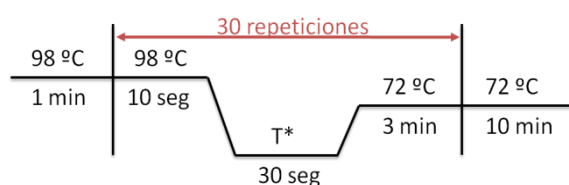


Figura 64: Ciclo de PCR utilizado para introducir mutaciones por Quikchange®

Luego de la amplificación el producto de PCR fue sometido a digestión con la enzima *DpnI* para eliminar el plásmido parental. A 88 μ L de la mezcla de PCR se le agregaron 10 μ L de Buffer 4 (New England Biolabs) y 4 U de la enzima *DpnI* (New England Biolabs). La reacción fue incubada a 37 $^{\circ}$ C por 3 hrs y luego se precipitó el ADN agregando 250 μ L de etanol absoluto y 2,5 μ L de NaCl 4 M. Se guardó en freezer a -20 $^{\circ}$ C por al menos 1 hr. El ADN se fue recuperado en 10 μ L de agua o buffer TE.²²⁴ Los plásmidos generados fueron utilizados para transformar distintas cepas de *E. coli* o *Pseudomonas*, de acuerdo al objetivo buscado. La introducción de mutaciones fue corroborada mediante secuenciado en la empresa Macrogen (Corea) o en los Servicios Científico-técnicos de la Universidad de Barcelona (España).

Ensayos de actividad

El aceite de oliva y el aceite altooleico provienen de Cousa. Los sustratos etil-2-metil butirato, etil benzoato, α -metilbencil butirato y ciclohexil acetato provienen de SAFC. Se utilizó glicerol anhidro AR ACS marca Baker. Los disolventes empleados fueron: hexano, metanol, etanol y diclorometano calidad PPA o HPLC. El hexano saturado en agua se prepara agregando agua en exceso, agitando durante 30 min y luego decantando el agua excedente. La enzima CAL-B (Novozyme 435; Novozyme) fue amablemente cedida por el Dr. Iván Jachmanián, así como el estándar de metilésteres nº 1891 (Sigma). La enzima CAL-A fue adquirida de Fluka y la enzima PSL de Sigma. El Na_2SO_4 se obtuvo de Sigma.

Procedimiento general

Se realizó la determinación rápida de la actividad lipolítica utilizando sustratos modelo derivados de *p*-nitrofenol (*p*NP) y 4-metil umbeliferona (MUF) (figura 65). Todos los ensayos se realizaron en placas de microtitulación. Se realizaron 3 repeticiones por réplica, y al menos dos réplicas de cada ensayo salvo que se indique lo contrario. Se analizaron también tres blancos para cada conjunto de condiciones utilizadas (blanco sin enzima, blanco sin sustrato y blanco sin enzima ni sustrato).

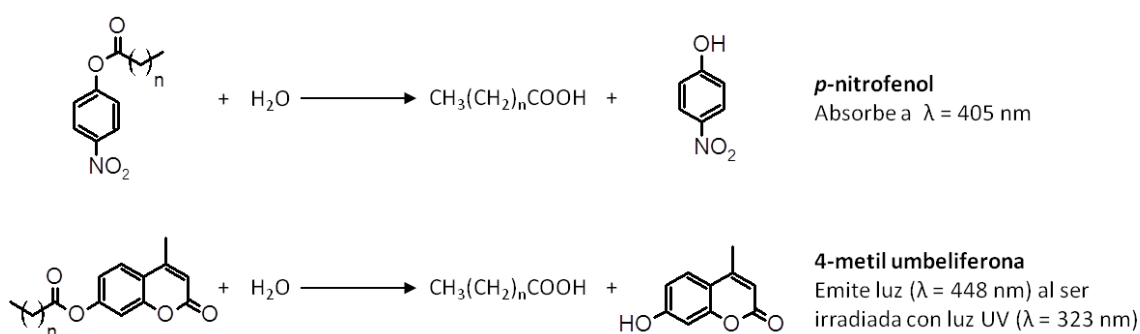


Figura 65: Reacciones de hidrólisis de los sustratos modelo. Para los derivados de *p*NP $n = 2$ (butirato), 3 (valerato), 6 (caprilato), 8 (caprato), 10 (laurato), 14 (palmitato) o 16 (estearato). Para los derivados de MUF $n = 2$ (butirato), 5 (heptanoato) o 16 (estearato). También se utilizó MUF oleato (no incluido en la figura).

Ensayos de actividad utilizando derivados de pNP

Se utiliza la reacción que se muestra en la figura 66. Se prepararon en cada caso las siguientes soluciones:

Mix de enzima

Buffer Tris-HCl (pH 7) 20 mM o buffer acetato (pH 5,5) 50 mM
CaCl₂ 20 mM
Lip I.3 entre 11 y 18 U^a

^aU = cantidad de enzima que libera 1 μmol de pNP en 1 minuto

Mix de sustrato

Buffer Tris-HCl (pH 7) 20 mM o buffer acetato (pH 5,5) 50 mM
Tritón X- 100® 1,2 %
Derivado de pNP 2 mM

Tras pre-incubar las soluciones 15 min a 30 °C se mezclaron 50 μL de Mix de enzima con 50 μL de Mix de sustrato, se incubaron a la temperatura adecuada por 15 minutos y se midió la absorbancia a 405 nm. Para calcular la actividad se utilizó una curva de calibración realizada con p-nitrofenol.

Ensayos de actividad utilizando derivados de MUF

Se prepararon en cada caso las siguientes soluciones:

Mix de enzima

Buffer acetato (pH 5,5) 50 mM
CaCl₂ 20 mM
Lip I.3 entre 0,10 y 0,25 U/mL^b

^bU = cantidad de enzima que libera 1 μmol de MUF en 1 minuto

Mix de sustrato

Buffer acetato (pH 5,5) 50 mM
Tritón X- 100® 0,8 %
Derivado de MUF 0,8 mM

Después de pre-incubar las soluciones 15 min a 30 °C se mezclaron 50 μL de Mix de enzima con 50 μL de Mix de sustrato, y se incubaron a 30 °C o a temperatura ambiente (25 °C) durante el tiempo del ensayo, generalmente de 1 hr. Se midió la fluorescencia en la muestra en las condiciones que se indican en la tabla 18.

Tabla 18: Condiciones utilizadas para la medida de fluorescencia

Parámetro	Valor
Longitud de onda de excitación	323 nm
Longitud de onda de emisión	448 nm
Slit de excitación	20 nm
Slit de emisión	10 nm
Voltaje del PMT	600 y 500 V

Para calcular la actividad se utilizó una curva de calibración realizada con 4-metil umbeliferona (MUF)

Ensayos de caracterización

El protocolo descrito bajo *Procedimiento general* fue modificado para la ejecución de los ensayos de caracterización. En la tabla 19 se describen las modificaciones realizadas.

Tabla 19: Ajustes realizados para los ensayos de caracterización

Ensayo	Cambios realizados
pH óptimo	Se sustituyó el buffer Tris o Acetato por buffer ATB ^c 50 mM, ajustado a cada pH
Temperatura óptima	Se realizaron los ensayos a distintas temperaturas
Concentración de Calcio	Se utilizaron concentraciones variables de calcio
Parámetros cinéticos	Se utilizaron concentraciones variables de sustrato y se midió fluorescencia en función del tiempo
Estudio de inhibidores y activadores	Se incluyó en el Mix de enzima el compuesto a analizar en cada caso a la concentración correspondiente y se utilizaron 0,5 U/mL de enzima.
Resistencia a la temperatura	Se pre-incuba el Mix de enzima a cada una de las temperaturas ensayadas
Resistencia al pH	Se pre-incuba la enzima 1 hr. a T ambiente en buffer ATB ^c ajustado a cada pH

^c Buffer ATB 50 mM: Ac. acético 50mM, Tris-HCl 50 mM, Ác. bórico 50 mM

Ensayo de hidrólisis de derivados de MUF en papel de filtro

Se utilizó el método descrito por Diaz y colaboradores.¹⁹⁰ En un papel de filtro se colocaron 5 µL de solución 25 mM del derivado de MUF. Sobre la solución de MUF se agregaron 5 µL de la muestra a ensayar. Las reacciones fueron incubadas a temperatura ambiente por 1 a 10 min y observadas al UV. Se ensayaron también en cada caso los controles negativos y positivos correspondientes.

Zimograma

Este sistema se utilizó para detectar la actividad lipasa en geles de SDS-PAGE.¹⁹⁰ Tras la electroforesis se coloca el gel en Tritón X-100® al 2,5 % y se incuba con agitación por 30 min a T ambiente. Luego se cambia la solución por buffer acetato (pH 5,5) 50 mM con CaCl₂ 10 mM y se incuba a T ambiente con agitación. Luego de 15 min se renueva el buffer y se continúa lavando durante 15 min más. Se cubre el gel con una solución de MUF-Butirato 100 µM (40 µL de stock de MUF-Butirato 25 mM en EGME, diluidos en buffer acetato (pH 5,5) 50 mM con CaCl₂ 10 mM) y se deja reaccionar 5 min a T ambiente para observar la fluorescencia iluminando con luz UV.

Aplicaciones sintéticas

Síntesis de biodiesel

Las condiciones utilizadas en la síntesis de biodiesel se detallan en la tabla 20. Se preparó una mezcla conteniendo 200ml de hexano saturado en agua, 5g del aceite correspondiente y 1,08 g de metanol o 1.56 g de etanol, la cual se conservó a 4 °C y se utilizó para los ensayos. En cada caso se pesó la cantidad de enzima adecuada y se agregaron 2 mL de la mezcla. Las reacciones se incubaron a 30 °C con agitación, tomando muestras periódicamente para su análisis.

Tabla 20: Condiciones para los ensayos de síntesis de biodiesel

Función	Reactivo	Cantidad
Triglicérido	Aceite altooleico COUSA	50 mg
	Aceite de girasol	50 mg
Alcohol	Metanol	11 mg
	Etanol	16 mg
Enzima	CAL-B (Novozyme 435)	5 mg
	Lip I.3 liofilizada	70 mg
	CQA	500 mg
	R02	500 mg
Solvente	Hexano saturado en agua	2 mL

El análisis de las reacciones se realizó por GC en una columna Carbowax 20 (MEGA Carbowax), utilizando un equipo de cromatografía gaseosa Shimadzu GC 2014, con detector de FID. Carrier: hidrógeno, temperatura del inyector: 230 °C, temperatura del detector: 250 °C. Presión 39 kPa, flujo total 27,3 mL/min, flujo en la columna 0,48 mL/min. Inyección split, relación de split 50, flujo de la purga 3 mL/min. El programa de temperatura se muestra en la tabla 21.

Tabla 21: Programas de temperatura para GC utilizados en el análisis de las reacciones de síntesis de biodiesel y esterificación de glicerol y 1,3-propanodiol

Reacción	Programa de temperatura
Síntesis de biodiesel	190°C 1,25 °C/min 215 °C 25 °C/min 230 °C (15 min)
Esterificación de glicerol y 1,3-propanodiol con acetato de vinilo (Análisis por GC)	40 °C(7 min) 8 °C/min 140 °C 25 °C/min 250 °C (5 min)
Esterificación de glicerol y 1,3-propanodiol con propionato y butirato de vinilo (Análisis por GC)	40 °C(8 min) 25 °C/min 140 °C 5 °C/min 220 °C 25 °C/min 250 °C (5 min)
Esterificación de glicerol y 1,3-propanodiol con acetato y propionato de vinilo (Análisis por GC-MS)	40 °C(8 min) 10 °C/min 160 °C 40 °C/min 300 °C (5 min)
Esterificación de glicerol y 1,3-propanodiol con butirato de vinilo (Análisis por GC-MS)	50 °C(8 min) 10 °C/min 180 °C 40 °C/min 300 °C (5 min)

Esterificación del glicerol y el propanodiol

Las condiciones utilizadas en la esterificación del glicerol y el propanodiol se detallan en la tabla 22. Se preparó una mezcla conteniendo 200ml de hexano saturado en agua, 5g del aceite correspondiente y 1,08 g de metanol o 1.56 g de etanol, la cual se conservó a 4 °C y se utilizó para los ensayos. En cada caso se pesó la cantidad de enzima adecuada y se agregaron 2 mL de la mezcla. Las reacciones se incubaron a 30 °C con agitación, tomando muestras periódicamente para su análisis

Tabla 22: Condiciones para los ensayos de esterificación

Función	Reactivo	Cantidad
Alcohol	Glicerol	100 mg
	1,3-propanodiol	122 mg
Dador de acilo	Acetato de vinilo	451 µL
	Propionato de vinilo	531 µL
	Butirato de vinilo	619 µL
Enzima	CAL-A (Fluka)	30 mg
	PSL (Sigma)	10 mg
	Lip 1.3 liofilizada	74 mg
	CQA	500 mg
	R06	500 mg
Solvente	Hexano saturado en agua	2 mL

El análisis de las reacciones se realizó por GC en una columna Carbowax 20 (0.25 mm × 30 m × 0.25 µm, MEGA), utilizando un equipo de cromatografía gaseosa Shimadzu GC 2014, con detector de FID. Carrier: hidrógeno. Temperatura del inyector: 220 °C, temperatura del detector: 250 °C. Presión 39 kPa, flujo total 49,9 mL/min, flujo en la columna 0,92 mL/min. Inyección split, relación de split 50, flujo de la purga 3 mL/min. El programa de temperatura se muestra en la tabla 21.

Para la esterificación de 1,3-propanodiol con acetato de vinilo se utilizó el programa de temperatura que se detalla en la tabla 21. Los demás parámetros son iguales a los utilizados para las otras muestras.

La identificación de los picos se realizó por GC Masa HP5890 II (Hewlett-Packard) con detector de masa HP5971 (Hewlett-Packard), con una columna Elite 5 (PerkinElmer) utilizando los programas de temperatura que se indican en la tabla 21.

Reacciones de hidrólisis

Hidrólisis de ésteres

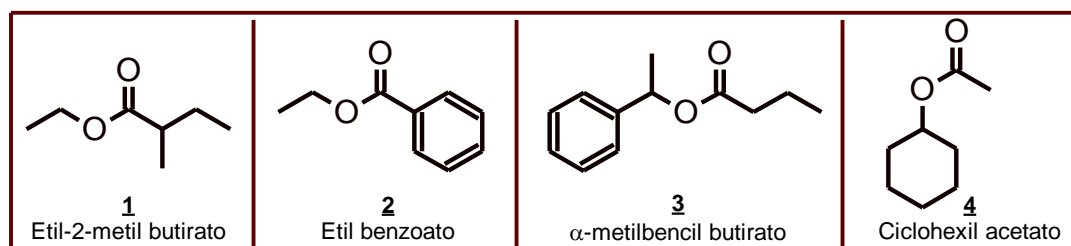


Figura 66: Sustratos utilizados para analizar la actividad de Lip I.3

Se evaluó la actividad de Lip I.3 sobre los sustratos 1 a 4 (figura 67) en base a un método reportado previamente.²⁰⁷ El medio de reacción contenía Tris (pH 7) 50 mM, CaCl₂ 5 mM, Tritón X-100[®] 0,4% y cada sustrato en una concentración de 40 mM, en un volumen total de 5 mL. Se usaron 6 μ L de crudo conteniendo Lip I.3 para los ensayos, y como control 3 mg de CAL-B (Novozyme 435; Novozyme) o 3 mg de CAL-A (Fluka). Se realizaron controles en ausencia de enzima. Las reacciones se incubaron por 48 hrs. a 30 °C con agitación. Posteriormente se extrajo el medio de reacción con 5 mL de diclorometano. La fase orgánica se secó con Na₂SO₄, y se analizó por cromatografía gaseosa en un equipo Shimadzu GC 2014, con detector de FID, utilizando las condiciones descritas en la tabla 23.

Tabla 23: Condiciones de GC para el análisis de las reacciones de hidrólisis

Sust.	Columna	Programa de temperatura
<u>1</u>	Carbowax 20 (0.25 mm \times 30 m \times 0.25 μ m)	60 °C 40 °C/min 110 °C (5 min) 3 °C/min 160 °C 25 °C/min 240 °C (5 min)
	Megadex_DET_TBS_Beta (0.25 mm \times 25 m \times 0.25 μ m)	60 °C 40 °C/min 100 °C 1 °C/min 125 °C 45 °C/min 200 °C (5 min)
<u>2</u>	Carbowax 20 (0.25 mm \times 30 m \times 0.25 μ m)	60 °C 25 °C/min 130 °C 7 °C/min 240 °C (5 min)
<u>3</u>	Carbowax 20 (0.25 mm \times 30 m \times 0.25 μ m)	60 °C 40 °C/min 130 °C (5 min) 3 °C/min 180 °C 25 °C/min 240 °C (5 min)
	Megadex_DET_TBS_Beta (0.25 mm \times 25 m \times 0.25 μ m)	60 °C 40 °C/min 100 °C 1.5 °C/min 140 °C 45 °C/min 200 °C (5 min)
<u>4</u>	Carbowax 20 (0.25 mm \times 30 m \times 0.25 μ m)	60 °C 40 °C/min 80 °C (5 min) 3 °C/min 120 °C 25 °C/min 240 °C (5 min)

Hidrólisis de triglicéridos

Las reacciones de hidrólisis de triglicéridos se realizaron en buffer Tris·HCl (pH7) 50 mM con CaCl₂ 10 mM y 0,4 % de Tritón X-100®, en un volumen total de 5 mL. Se usaron 20 µL de crudo conteniendo Lip I.3 y 50 µL de sustrato (aceite de oliva y aceite altooleico). El análisis se realizó por cromatografía en capa delgada utilizando sílica gel. El desarrollo de la placa se llevó a cabo usando la mezcla de solventes hexano/éter dietílico/ácido acético (70:30:1 v/v), revelando mediante vapores de yodo. Como control se realizó la misma reacción utilizando la enzima CAL-B.

Bioinformática

El estudio de las secuencias, análisis de restricción, identificación de marcos abiertos de lectura y construcción de secuencias de ADN se realizaron utilizando el programa Vector Nti (Vector NTI version 10.3.0; Invitrogen, Carlsbad, CA). Las secuencias fueron analizadas contra bases de datos utilizando el programa Blast.¹⁷⁸ Los modelos estructurales en 3D fueron generados por homología con las estructuras 2z8x y 2zvd de la lipasa de *Pseudomonas* sp. MIS38 y la estructura 2qub de la lipasa de *Serratia marcescens* SM6, utilizando Swiss-Model.¹⁸¹⁻
¹⁸⁴ Para visualizar y estudiar las estructuras tridimensionales se utilizó el programa Pymol (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3, Schrödinger, LLC). El análisis de la unión de calcio se realizó utilizando el programa Ligand Explorer versión 4.1.0²²⁷ (RCSB PDB, www.pdb.org).

Bibliografía

Bibliografía

1. Wohlgemuth, R. "Biocatalysis-key to sustainable industrial chemistry" *Curr. Opin. Biotech.*, **2010**, 21 (6), p. 713-724.
2. Wenda, S.; Illner, S.; Mell, A., *et al.* "Industrial biotechnology - The future of green chemistry?" *Green Chem.*, **2011**, 13 (11), p. 3007-3047.
3. Faber, K. "Biotransformations in Organic Chemistry". 6ta ed. **2004**, Berlin: Springer-Verlag.
4. García-Urdiales, E.; Alfonso, I.; Gotor, V. "Enantioselective enzymatic desymmetrizations in organic synthesis" *Chem. Rev.*, **2005**, 105, p. 313 - 354.
5. Gervais, T.R.; Carta, G.; Gainer, J.L. "Asymmetric synthesis with immobilized yeast in organic solvents: Equilibrium conversion and effect of reactant partitioning on whole cell biocatalysis" *Biotechnol. Progr.*, **2003**, 19, p. 389 - 395.
6. Anastas, P.T.; Warner, J.C. "Green chemistry - Theory and practice". **1998**, New York: Oxford University Press.
7. De Camp, W.H. "Chiral drugs: The FDA perspective on manufacturing and control" *J.Pharmaceut. Biomed.*, **1993**, 11 (11-12), p. 1167-1172.
8. Sahajwalla, C. "Regulatory considerations in drug development of stereoisomers" *Chirality in drug design and development*, **2004**, p. 419-432.
9. Food and Drug Administration "Development of new stereoisomeric drugs" **1992**, EE.UU., <http://www.fda.gov/drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm122883.htm>.
10. Zaks, A.; Klibanov, A.M. "Enzyme-catalyzed processes in organic solvents" *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **1985**, 82 (10), p. 3192-3196.
11. Griffin, D.R.; Gainer, J.L.; Carta, G. "Asymmetric ketone reduction with immobilized yeast in hexane: Biocatalyst deactivation and regeneration" *Biotechnol. Progr.*, **2001**, 17 (2), p. 304-310.
12. Domínguez de María, P.; Maugeri, Z. "Ionic liquids in biotransformations: From proof-of-concept to emerging deep-eutectic-solvents" *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2011**, 15 (2), p. 220-225.
13. Durand, E.; Lecomte, J.; Villeneuve, P. "Deep eutectic solvents: Synthesis, application, and focus on lipase-catalyzed reactions" *Eur. J. Lipid Sci. Tech.*, **2013**, 115 (4), p. 379-385.
14. Fan, Y.; Qian, J. "Lipase catalysis in ionic liquids/supercritical carbon dioxide and its applications" *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2010**, 66 (1-2), p. 1-7.
15. Straathof, A.J.J.; Panke, S.; Schmid, A. "The production of fine chemicals by biotransformations" *Curr. Opin. Biotech.*, **2002**, 13 (6), p. 548-556.
16. Jaeger, K.-E.; Reetz, M.T. "Microbial lipases form versatile tools for biotechnology" *Trends Biotechnol.*, **1998**, 16 (9), p. 396-403.
17. Casas-Godoy, L.; Duquesne, S.; Bordes, F., *et al.* "Lipases: An overview", en *Lipases and phospholipases, methods and protocols*, G. Sandoval, Editor. **2012**, Humana Press. p. 3-30.
18. Gupta, R.; Gupta, N.; Rathi, P. "Bacterial lipases: An overview of production, purification and biochemical properties" *Appl. Microbiol. Biot.*, **2004**, 64 (6), p. 763-781.

19. Sangeetha, R.; Arulpandi, I.; Geetha, A. "Bacterial lipases as potential industrial biocatalysts: An overview" *Res. J. Microbiol.*, **2011**, 6 (1), p. 1-24.
20. Divakar, S.; Manohar, B. "Use of lipases in the industrial production of esters", en *Industrial Enzymes*, J. Polaina and A. MacCabe, Editors. **2007**, Springer Netherlands. p. 283-300.
21. Gotor-Fernandez, V.; Brieva, R.; Gotor, V. "Lipases: Useful biocatalysts for the preparation of pharmaceuticals" *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2006**, 40, p. 111 - 120.
22. Busto, E.; Gotor-Fernández, V.; Gotor, V. "Hydrolases: Catalytically promiscuous enzymes for non-conventional reactions in organic synthesis" *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, 39 (11), p. 4504-4523.
23. Grogan, G. "Biotransformations" *Annu. Rep. Prog. Chem. Sect. B*, **2012**, 108, p. 202-227.
24. Benjamin, S.; Pandey, A. "*Candida rugosa* lipases: Molecular biology and versatility in biotechnology" *Yeast*, **1998**, 14 (12), p. 1069-1087.
25. Dharmsthiti, S.; Kuhasuntisuk, B. "Lipase from *Pseudomonas aeruginosa* LP602: biochemical properties and application for wastewater treatment" *J. Ind. Microbiol. Biot.*, **1998**, 21 (1-2), p. 75-80.
26. Domínguez de María, P.; Sinisterra, J.V.; Tsai, S.-W., et al. "*Carica papaya* lipase (CPL): An emerging and versatile biocatalyst" *Biotechnology Adv.*, **2006**, 24 (5), p. 493-499.
27. Wu, X.Y.; Jääskeläinen, S.; Linko, Y.-Y. "An investigation of crude lipases for hydrolysis, esterification, and transesterification" *Enzyme Microb. Tech.*, **1996**, 19 (3), p. 226-231.
28. Andualema, B.; Gessesse, A. "Microbial lipases and their industrial applications: Review" *Biotechnology*, **2012**, 11 (3), p. 100-118.
29. Hasan, F.; Shah, A.A.; Hameed, A. "Industrial applications of microbial lipases" *Enzyme Microb. Tech.*, **2006**, 39 (2), p. 235-251.
30. Houde, A.; Kademi, A.; Leblanc, D. "Lipases and their industrial applications" *Appl. Biochem. Biotech.*, **2004**, 118 (1-3), p. 155-170.
31. Cesarini, S.; Diaz, P.; Nielsen, P.M. "Exploring a new, soluble lipase for FAMES production in water-containing systems using crude soybean oil as a feedstock" *Process Biochem.*, **2013**, 48 (3), p. 484-487.
32. Jaeger, K.E.; Eggert, T. "Lipases for biotechnology" *Curr. Opin. Biotech.*, **2002**, 13 (4), p. 390-397.
33. Bornscheuer, U.T.; Bessler, C.; Srinivas, R., et al. "Optimizing lipases and related enzymes for efficient application" *Trends Biotechnol.*, **2002**, 20 (10), p. 433-437.
34. Simon, R.C.; Mutti, F.G.; Kroutil, W. "Biocatalytic synthesis of enantiopure building blocks for pharmaceuticals" *Drug Discov. Today: Technologies*, **2013**, 10 (1), p. e37-e44.
35. Turner, N.J. "Deracemisation methods" *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2010**, 14 (2), p. 115-121.
36. Kourist, R.; Bornscheuer, U.T. "Biocatalytic synthesis of optically active tertiary alcohols" *Appl. Microbiol. Biot.*, **2011**, 91 (3), p. 505-517.
37. Kourist, R.; Domínguez de María, P.; Bornscheuer, U.T. "Enzymatic synthesis of optically active tertiary alcohols: Expanding the biocatalysis toolbox" *ChemBioChem*, **2008**, 9 (4), p. 491-498.

38. Bassegoda, A.; Nguyen, G.S.; Schmidt, M., *et al.* "Rational protein design of *Paenibacillus barcinonensis* esterase EstA for kinetic resolution of tertiary alcohols" *ChemCatChem*, **2010**, 2 (8), p. 962-967.
39. Sharma, R.; Chisti, Y.; Banerjee, U.C. "Production, purification, characterization, and applications of lipases" *Biotechnology Adv.*, **2001**, 19 (8), p. 627-662.
40. Kanerva, L.T.; Sundholm, O. "Lipase catalysis in the resolution of racemic intermediates of diltiazem synthesis in organic solvents" *J. Chem. Soc. Perkin Trans*, **1993**, 1, p. 1385-1389.
41. Patel, R.N. "Biocatalytic synthesis of intermediates for the synthesis of chiral drug substances" *Curr. Opin. Biotechnol.*, **2001**, 12, p. 587-604.
42. Ghaly, A.E.; Dave, D.; Brooks, M.S., *et al.* "Production of biodiesel by enzymatic transesterification: Review" *Am. J. Biochem. Biotechnol.*, **2010**, 6 (2), p. 54-76.
43. Souto, G. "Biodiesel: evaluación de su producción y consumo en Uruguay" *OPYPA (MGAP) - Anuario*, **2001**, Políticas Sectoriales (1-4), p. 21.
44. Martino, D. "Biodiesel: breve análisis de su factibilidad en Uruguay ", GRAS, INIA **2003** Montevideo. p. 1-5.
45. "Ley 18.195 - Agrocombustibles", **2007**.
46. Parawira, W. "Biotechnological production of biodiesel fuel using biocatalysed transesterification: A review" *Crit. Rev. Biotechnol.*, **2009**, 29 (2), p. 82-93.
47. Janaun, J.; Ellis, N. "Perspectives on biodiesel as a sustainable fuel" *Renew. Sust. Energ. Rev.*, **2010**, 14 (4), p. 1312-1320.
48. Helwani, Z.; Othman, M.R.; Aziz, N., *et al.* "Technologies for production of biodiesel focusing on green catalytic techniques: A review" *Fuel Process. Technol.*, **2009**, 90 (12), p. 1502-1514.
49. Thompson, J.; He, B. "Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstocks" *Appl. Eng. Agric.*, **2006**, 22 (2), p. 261.
50. Dasari, M.A.; Kiatsimkul, P.-P.; Sutterlin, W.R., *et al.* "Low-pressure hydrogenolysis of glycerol to propylene glycol" *Appl. Catal. A: Gen.*, **2005**, 281 (1-2), p. 225-231.
51. Yazdani, S.S.; Gonzalez, R. "Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry" *Curr. Opin. Biotech.*, **2007**, 18 (3), p. 213-219.
52. O'Driscoll, C. "Seeking a new role for glycerol" *Biofuel. Bioprod. Bior.*, **2007**, 1 (1), p. 7.
53. Kotrba, R. "The Glycerin Spread" *Biodiesel Magazine*, **2007** (September 2007).
54. Leung, D.Y.C.; Wu, X.; Leung, M.K.H. "A review on biodiesel production using catalyzed transesterification" *Appl. Energ.*, **2010**, 87 (4), p. 1083-1095.
55. Marchetti, M.; Miguela, V.U.; Errazu, A.F. "Possible methods for biodiesel production" *Renew. Sust. Energ. Rev.*, **2007**, 11 (6), p. 1300-1311.
56. Ranganathan, S.V.; Narasimhana, S.L.; Muthukumar, K. "An overview of enzymatic production of biodiesel" *Bioresource Technol.*, **2008**, 99 (10), p. 3975-3981.
57. Bajaj, A.; Lohan, P.; Jha, P.N., *et al.* "Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: An overview" *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2010**, 62 (1), p. 9-14.

58. Adamczak, M.; Bornscheuer, U.T.; Bednarski, W. "The application of biotechnological methods for the synthesis of biodiesel" *Eur. J. Lipid Sci. Tech.*, **2009**, 111 (8), p. 800-813.
59. Costa Rodrigues, R.; Volpato, G.; Wada, K., *et al.* "Enzymatic Synthesis of Biodiesel from Transesterification Reactions of Vegetable Oils and Short Chain Alcohols" *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **2008**, 85 (10), p. 925-930.
60. Shah, S.; Sharma, S.; Gupta, M.N. "Biodiesel preparation by lipase-catalyzed transesterification of *Jatropha* Oil" *Energ. Fuel.*, **2004**, 18 (1), p. 154-159.
61. Nielsen, P.M.; Brask, J.; Fjerbaek, L. "Enzymatic biodiesel production: Technical and economical considerations" *Eur. J. Lipid Sci. Tech.*, **2008**, 110 (8), p. 692-700.
62. Fjerbaek, L.; Christensen, K.V.; Norddahl, B. "A review of the current state of biodiesel production using enzymatic transesterification" *Biotechnol. Bioeng.*, **2009**, 102 (5), p. 1298-1315.
63. Du, W.; Li, W.; Sun, T., *et al.* "Perspectives for biotechnological production of biodiesel and impacts" *Appl. Microbiol. Biot.*, **2008**, 79 (3), p. 331-337.
64. Pagliaro, M.; Ciriminna, R.; Kimura, H., *et al.* "From glycerol to value-added products" *Angew. Chem. Int. Edit.*, **2007**, 46 (24), p. 4434-4440.
65. Pessoa, M.N.; Danielle, C.D.S.C.; Jose, B.D. "Process to transform glicerol and/or biomass into products of greater aggregate value", WO2009073938 A1, NumberSENTEX IND LTDA, **2009**, Brasil.
66. Redlingshofer, H.; Weckbecker, C.; Huthmacher, K., *et al.* "Production of 3-(alkylthio) propanal", DE 102005003990 (A1), NumberEvonik Degussa GmbH (Essen, DE) **2006**, Alemania.
67. Corma, A.; Iborra, S.; Velty, A. "Chemical Routes for the Transformation of Biomass into Chemicals" *ChemInform*, **2007**, 38 (36).
68. Behr, A.; Eilting, J.; Irawadi, K., *et al.* "Improved utilisation of renewable resources: New important derivatives of glycerol" *Green Chem.*, **2008**, 10 (1), p. 13-30.
69. Plasman, V.; Caulier, T.; Boulos, N. "Polyglycerol esters demonstrate superior antifogging properties for films" *Plastics, Additives and Compounding*, **2005**, 7 (2), p. 30-33.
70. Jung, H.; Lee, Y.; Kim, D., *et al.* "Enzymatic production of glycerol carbonate from by-product after biodiesel manufacturing process" *Enzyme Microb. Tech.*, **2012**, 51 (3), p. 143-147.
71. Junior, I.I.; Flores, M.C.; Sutili, F.K., *et al.* "Lipase-catalyzed monostearin synthesis under continuous flow conditions" *Org. Process Res. Dev.*, **2012**, 16 (5), p. 1098-1101.
72. Sotenko, M.V.; Rebroš, M.; Sans, V.S., *et al.* "Tandem transformation of glycerol to esters" *J. Biotechnol.*, **2012**, 162 (4), p. 390-397.
73. Duan, Z.-Q.; Du, W.; Liu, D.-H. "Rational synthesis of 1,3-diolein by enzymatic esterification" *J. Biotechnol.*, **2012**, 159 (1-2), p. 44-49.
74. Kapoor, M.; Gupta, M.N. "Obtaining monoglycerides by esterification of glycerol with palmitic acid using some high activity preparations of *Candida antarctica* lipase B" *Process Biochem.*, **2012**, 47 (3), p. 503-508.

75. Ou, G.; He, B.; Yuan, Y. "Design of biosolvents through hydroxyl functionalization of compounds with high dielectric constant" *Appl. Biochem. Biotech.*, **2012**, 166 (6), p. 1472-1479.
76. Tamayo, J.J.; Ladero, M.; Santos, V.E., *et al.* "Esterification of benzoic acid and glycerol to α -monobenzoate glycerol in solventless media using an industrial free *Candida antarctica* lipase B" *Process Biochem.*, **2012**, 47 (2), p. 243-250.
77. Patil, D.; Dev, B.; Nag, A. "Lipase-catalyzed synthesis of 4-methoxy cinnamoyl glycerol" *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2011**, 73 (1-4), p. 5-8.
78. Amann, R.I.; Ludwig, W.; Schleifer, K.H. "Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation" *Microbiol. Rev.*, **1995**, 59 (1), p. 143-169.
79. Fernández-Arrojo, L.; Guazzaroni, M.E.; López-Cortés, N., *et al.* "Metagenomic era for biocatalyst identification" *Curr. Opin. Biotech.*, **2010**, 21 (6), p. 725-733.
80. Marrs, B.; Delagrave, S.; Murphy, D. "Novel approaches for discovering industrial enzymes" *Curr. Opin. Microbiol.*, **1999**, 2 (3), p. 241-245.
81. Lorenz, P.; Eck, J. "Screening for novel industrial biocatalysts" *Eng. Life Sci.*, **2004**, 4 (6), p. 501-504.
82. Ruiz, C.; Pastor, F.I.J.; Díaz, P. "Isolation of lipid- and polysaccharide-degrading microorganisms from subtropical forest soil, and analysis of lipolytic strain *Bacillus* sp. CR-179" *Letts. Appl. Microbiol.*, **2005**, 40, p. 218-227.
83. Bassegoda, A.; Pastor, F.I.J.; Diaz, P. "*Rhodococcus* sp. strain CR-53 lipR, the first member of a new bacterial lipase family (Family X) displaying an unusual Y-type oxyanion hole, similar to the *Candida antarctica* lipase clan" *Appl. Environ. Microb.*, **2012**, 78 (6), p. 1724-1732.
84. Valero, F. "Heterologous expression systems for lipases: A review" *Method. Mol. Biol.*, **2012**, 861, p. 161-178.
85. Panizza, P.; Onetto, S.; Rodríguez, S. "A recombinant *Escherichia coli* expressing an α -alkyl- β -ketoester reductase with unusual stereoselectivity" *Biocatal. Biotransfor.*, **2007**, 25 (5), p. 414-417.
86. Bassegoda, A.; Fillat, A.; Pastor, F.I.J., *et al.* "Special *Rhodococcus* sp. CR-53 esterase Est4 contains a GGG(A)X-oxyanion hole conferring activity for the kinetic resolution of tertiary alcohols" *Appl. Microbiol. Biot.*, **2013**, p. 1-10.
87. Kaul, P.; Asano, Y. "Strategies for discovery and improvement of enzyme function: state of the art and opportunities" *Microb. Biotechnology*, **2012**, 5 (1), p. 18-33.
88. Yoo, H.Y.; Simkhada, J.R.; Cho, S.S., *et al.* "A novel alkaline lipase from *Ralstonia* with potential application in biodiesel production" *Bioresource Technol.*, **2011**, 102 (10), p. 6104-6111.
89. Hasan-Beikdashti, M.; Forootanfar, H.; Safiarian, M.S., *et al.* "Optimization of culture conditions for production of lipase by a newly isolated bacterium *Stenotrophomonas maltophilia*" *J. Taiwan Inst. Chem. E.*, **2012**, 43 (5), p. 670-677.
90. Ratnaningsih, E.; Handayani, D.; Khairunnisa, F., *et al.* "Screening, gene sequencing and characterising of lipase for methanolysis of crude palm oil" *Appl. Biochem. Biotech.*, **2013**, 170 (1), p. 32-43.

91. Delmont, T.O.; Robe, P.; Cecillon, S., *et al.* "Accessing the soil metagenome for studies of microbial diversity" *Appl. Environ. Microbiol.*, **2011**, 77 (4), p. 1315-1324.
92. Steele, H.L.; Jaeger, K.E.; Daniel, R., *et al.* "Advances in recovery of novel biocatalysts from metagenomes" *J. Mol. Microb. Biotech.*, **2009**, 16 (1-2), p. 25-37.
93. Simon, C.; Daniel, R. "Metagenomic analyses: Past and future trends" *Appl. Environ. Microb.*, **2011**, 77 (4), p. 1153-1161.
94. Leis, B.; Angelov, A.; Liebl, W. "Screening and expression of genes from metagenomes" *Adv. Appl. Microbiol.*, **2013**, 83 (1), p. 1-68.
95. Kourist, R.; Brundiek, H.; Bornscheuer, U.T. "Protein engineering and discovery of lipases" *Eur. J. Lipid Sci. Tech.*, **2010**, 112 (1), p. 64-74.
96. Cieśliński, H.; Białkowska, A.; Tkaczuk, K., *et al.* "Identification and molecular modeling of a novel lipase from an antarctic soil metagenomic library" *Pol. J. Microbiol.*, **2009**, 58 (3), p. 199-204.
97. Jiang, Z.; Wang, H.; Ma, Y., *et al.* "Characterization of two novel lipase genes isolated directly from environmental sample" *Appl. Microbiol. Biot.*, **2006**, 70 (3), p. 327-332.
98. Elend, C.; Schmeisser, C.; Hoebenreich, H., *et al.* "Isolation and characterization of a metagenome-derived and cold-active lipase with high stereospecificity for (R)-ibuprofen esters" *J. Biotechnol.*, **2007**, 130 (4), p. 370-377.
99. Khan, M.; Jithesh, K.; Mookambikay, R. "Cloning and characterization of two functionally diverse lipases from soil metagenome" *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **2013**, 59 (1), p. 21-31.
100. Nacke, H.; Will, C.; Herzog, S., *et al.* "Identification of novel lipolytic genes and gene families by screening of metagenomic libraries derived from soil samples of the German Biodiversity Exploratories" *FEMS Microbiol. Ecol.*, **2011**, 78 (1), p. 188-201.
101. Bassegoda, A.; Cesarini, S.; Diaz, P. "Lipase Improvement: Goals and Strategies. Minireview" *Computational and Structural Biotechnology Journal*, **2012**, 2 (3), p. 1-8.
102. Hidalgo, A.; Schließmann, A.; Molina, R., *et al.* "A one-pot, simple methodology for cassette randomisation and recombination for focused directed evolution" *Protein Eng. Des. Sel.*, **2008**, 21 (9), p. 567-576.
103. Reetz, M.T.; Bocola, M.; Carballeira, J.D., *et al.* "Expanding the range of substrate acceptance of enzymes: Combinatorial active-site saturation test" *Angew. Chem. Int. Edit.*, **2005**, 44 (27), p. 4192-4196.
104. Reetz, M.T.; Carballeira, J.D.; Peyralans, J., *et al.* "Expanding the substrate scope of enzymes: Combining mutations obtained by CASTing" *Chemistry - A European Journal*, **2006**, 12 (23), p. 6031-6038.
105. Morley, K.L.; Kazlauskas, R.J. "Improving enzyme properties: When are closer mutations better?" *Trends Biotechnol.*, **2005**, 23 (5), p. 231-237.
106. Reetz, M.T. "Evolution in the test tube as a means to create enantioselective enzymes for use in organic synthesis" *Sci. Progr.*, **2000**, 83, p. Pt 2/.
107. Liebeton, K.; Zonta, A.; Schimossek, K., *et al.* "Directed evolution of an enantioselective lipase" *Chem. Biol.*, **2000**, 7 (9), p. 709-718.

108. Shiraga, S.; Ishiguro, M.; Fukami, H., *et al.* "Creation of *Rhizopus oryzae* lipase having a unique oxyanion hole by combinatorial mutagenesis in the lid domain" *Appl. Microbiol. Biot.*, **2005**, 68 (6), p. 779-785.
109. Schmitt, J.; Brocca, S.; Schmid, R.D., *et al.* "Blocking the tunnel: Engineering of *Candida rugosa* lipase mutants with short chain length specificity" *Protein Eng.*, **2002**, 15 (7), p. 595-601.
110. Lee, L.C.; Chen, Y.T.; Yen, C.C., *et al.* "Altering the substrate specificity of *Candida rugosa* LIP4 by engineering the substrate-binding sites" *J Agric Food Chem*, **2007**, 55 (13), p. 5103-8.
111. Reyes-Duarte, D.; Polaina, J.; López-Cortés, N., *et al.* "Conversion of a carboxylesterase into a triacylglycerol lipase by a random mutation" *Angew. Chem. Int. Edit.*, **2005**, 44 (46), p. 7553-7557.
112. Nagarajan, S. "New tools for exploring old friends-microbial lipases" *Appl. Biochem. Biotech.*, **2012**, 168 (5), p. 1163-1196.
113. Arpigny, J.L.; Jaeger, K.-E. "Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties" *Biochemistry J.*, **1999**, 343, p. 177-183.
114. Lenfant, N.; Hotelier, T.; Velluet, E., *et al.* "ESTHER, the database of the α/β -hydrolase fold superfamily of proteins: tools to explore diversity of functions" *Nucleic Acids Res.*, **2013**, 41 (D1), p. D423-D429.
115. Rosenau, F.; Jaeger, K.E. "Bacterial lipases from *Pseudomonas*: Regulation of gene expression and mechanisms of secretion" *Biochimie*, **2000**, 82 (11), p. 1023-1032.
116. Zhang, Y.H.; Xu, L. "lipase [*Acinetobacter* sp. MBDD-4] (Accession number ABI48028)" *National Center for Biotechnology Information, EE. UU.* Último acceso: 11/08/2013. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/ABI48028>.
117. Lee, Y.P.; Chung, G.H.; Rhee, J.S. "Purification and characterization of *Pseudomonas fluorescens* SIK W1 lipase expressed in *Escherichia coli*" *BBA - Lipid Lipid Met.*, **1993**, 1169 (2), p. 156-164.
118. Beven, C.A.; Dieckelmann, M.; Beacham, I.R. "A strain of *Pseudomonas fluorescens* with two lipase-encoding genes, one of which possibly encodes cytoplasmic lipolytic activity" *J. Appl. Microbiol.*, **2001**, 90 (6), p. 979-987.
119. Kumura, H.; Hirose, S.; Sakurai, H., *et al.* "Molecular cloning and analysis of a lipase gene from *Pseudomonas fluorescens* n^o 33" *Biosci. Biotech. Bioch.*, **1998**, 62 (11), p. 2233-2235.
120. Tan, Y.; Miller, K.J. "Cloning, expression, and nucleotide sequence of a lipase gene from *Pseudomonas fluorescens* B52" *Appl. Environ. Microb.*, **1992**, 58 (4), p. 1402-1407.
121. Jiang, Z.; Zheng, Y.; Luo, Y., *et al.* "Cloning and expression of a novel lipase gene from *Pseudomonas fluorescens* B52" *Mol. Biotechnol.*, **2005**, 31 (2), p. 95-101.
122. Akatsuka, H.; Kawai, E.; Omori, K., *et al.* "The lipA gene of *Serratia marcescens* which encodes an extracellular lipase having no N-terminal signal peptide" *J. Bacteriol.*, **1994**, 176 (7), p. 1949-1956.
123. Li, X.; Tetling, S.; Winkler, U.K., *et al.* "Gene cloning, sequence analysis, purification, and secretion by *Escherichia coli* of an extracellular lipase from *Serratia marcescens*" *Appl. Environ. Microb.*, **1995**, 61 (7), p. 2674-2680.

124. Matsumae, H.; Shibatani, T. "Purification and characterization of the lipase from *Serratia marcescens* Sr41 8000 responsible for asymmetric hydrolysis of 3-phenylglycidic acid esters" *J. Ferment. Bioeng.*, **1994**, 77 (2), p. 152-158.
125. Meier, R.; Drepper, T.; Svensson, V., *et al.* "A calcium-gated lid and a large β -roll sandwich are revealed by the crystal structure of extracellular lipase from *Serratia marcescens*" *J. Biol. Chem.*, **2007**, 282 (43), p. 31477-31483.
126. Zhao, L.-L.; Xu, J.-H.; Zhao, J., *et al.* "Biochemical properties and potential applications of an organic solvent-tolerant lipase isolated from *Serratia marcescens* ECU1010" *Process Biochem.*, **2008**, 43 (6), p. 626-633.
127. Wang, Y.; Zhao, J.; Xu, J.H., *et al.* "Significantly improved expression and biochemical properties of recombinant *Serratia marcescens* lipase as robust biocatalyst for kinetic resolution of chiral ester" *Appl. Biochem. Biotech.*, **2010**, 162 (8), p. 2387-2399.
128. Bae, H.-A.; Lee, K.-W.; Lee, Y.-H. "Enantioselective properties of extracellular lipase from *Serratia marcescens* ES-2 for kinetic resolution of (S)-flurbiprofen" *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2006**, 40, p. 24-29.
129. Rashid, N.; Shimada, Y.; Ezaki, S., *et al.* "Low-temperature lipase from psychrotrophic *Pseudomonas* sp. strain KB700A" *Appl. Environ. Microb.*, **2001**, 67 (9), p. 4064-4069.
130. Ali, M.S.M.; Ganasen, M.; Rahman, R.N.Z.R.A., *et al.* "Cold-Adapted RTX lipase from antarctic *Pseudomonas* sp. strain AMS8: Isolation, molecular modeling and heterologous expression" *Protein J.*, **2013**, p. 1-9.
131. Amada, K.; Haruki, M.; Imanaka, T., *et al.* "Overproduction in *Escherichia coli*, purification and characterization of a family I.3 lipase from *Pseudomonas* sp. MIS38" *BBA - Protein Struct. M.*, **2000**, 1478 (2), p. 201-210.
132. Amada, K.; Kwon, H.J.; Haruki, M., *et al.* "Ca²⁺-induced folding of a family I.3 lipase with repetitive Ca²⁺ binding motifs at the C-terminus" *FEBS Lett.*, **2001**, 509 (1), p. 17-21.
133. Angkawidjaja, C.; You, D.j.; Matsumura, H., *et al.* "Crystal structure of a family I.3 lipase from *Pseudomonas* sp. MIS38 in a closed conformation" *FEBS Lett.*, **2007**, 581 (26), p. 5060-5064.
134. Khan, M.; Jithesh, K. "Expression and purification of organic solvent stable lipase from soil metagenomic library" *World J. Microb. Biot.*, **2012**, 28 (6), p. 2417-2424.
135. Angkawidjaja, C.; Kanaya, S. "Family I.3 lipase: Bacterial lipases secreted by the type I secretion system" *Cell. Mol. Life Sci.*, **2006**, 63 (23), p. 2804-2817.
136. Brzozowski, A.M.; Derewenda, U.; Derewenda, Z.S., *et al.* "A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex" *Nature*, **1991**, 351 (6326), p. 491-494.
137. Cheng, M.; Angkawidjaja, C.; Koga, Y., *et al.* "Requirement of lid2 for interfacial activation of a family I.3 lipase with unique two lid structures" *FEBS J.*, **2012**, 279 (19), p. 3727-3737.
138. Angkawidjaja, C.; Matsumura, H.; Koga, Y., *et al.* "X-ray crystallographic and MD simulation studies on the mechanism of interfacial activation of a family I.3 lipase with two lids" *J. Mol. Biol.*, **2010**, 400 (1), p. 82-95.

139. Kuwahara, K.; Angkawidjaja, C.; Matsumura, H., *et al.* "Importance of the Ca²⁺-binding sites in the N-catalytic domain of a family I.3 lipase for activity and stability" *Protein Eng. Des. Sel.*, **2008**, 21 (12), p. 737-744.
140. Kwon, H.J.; Haruki, M.; Morikawa, M., *et al.* "Role of repetitive nine-residue sequence motifs in secretion, enzymatic activity, and protein conformation of a family I.3 lipase" *J. Biosci. Bioeng.*, **2002**, 93 (2), p. 157-164.
141. Kuwahara, K.; Angkawidjaja, C.; Koga, Y., *et al.* "Importance of an extreme C-terminal motif of a family I.3 lipase for stability" *Protein Eng. Des. Sel.*, **2011**, 24 (5), p. 411-418.
142. Lee, K.W.; Bae, H.A.; Lee, Y.H. "Molecular cloning and functional expression of *esf* gene encoding enantioselective lipase from *Serratia marcescens* ES-2 for kinetic resolution of optically active (S)-flurbiprofen" *J. Microbiol. Biotechnol.*, **2007**, 17 (1), p. 74-80.
143. Kojima, Y.; Kobayashi, M.; Shimizu, S. "A novel lipase from *Pseudomonas fluorescens* HU380: Gene cloning, overproduction, renaturation-activation, two-step purification, and characterization" *J. Biosci. Bioeng.*, **2003**, 96 (3), p. 242-249.
144. Duzhak, A.B.; Panfilova, Z.I.; Vasyunina, E.A. "Isolation and characterization of extracellular lipase preparations from wild-type (V-10) and mutant (M-1) *Serratia marcescens* strains" *Appl. Biochem. Microbiol.*, **2000**, 36 (4), p. 344-352.
145. Kojima, Y.; Shimizu, S. "Purification and Characterization of the Lipase from *Pseudomonas fluorescens* HU380" *J. Biosci. Bioeng.*, **2003**, 96 (3), p. 219-226.
146. Chung, G.H.; Lee, Y.P.; Yoo, O.J., *et al.* "Overexpression of a thermostable lipase gene from *Pseudomonas fluorescens* in *Escherichia coli*" *Appl. Microbiol. Biot.*, **1991**, 35 (2), p. 237-241.
147. Kim, K.R.; Kwon, D.Y.; Yoon, S.H., *et al.* "Purification, refolding, and characterization of recombinant *Pseudomonas fluorescens* lipase" *Protein Express. Purif.*, **2005**, 39 (1), p. 124-129.
148. Zhang, J.W.; Zeng, R.Y. "Molecular cloning and expression of a cold-adapted lipase gene from an antarctic deep sea psychrotrophic bacterium *Pseudomonas* sp. 7323" *Mar. Biotechnol.*, **2008**, 10 (5), p. 612-621.
149. Jiang, Z.; Gao, B.; Ren, R., *et al.* "Efficient display of active lipase LipB52 with a *Pichia pastoris* cell surface display system and comparison with the LipB52 displayed on *Saccharomyces cerevisiae* cell surface" *BMC Biotechnol.*, **2008**, 8.
150. Yang, J.; Zhang, B.; Yan, Y. "Cloning and expression of *Pseudomonas fluorescens* 26-2 lipase gene in *Pichia pastoris* and characterizing for transesterification" *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **2009**, 159 (2), p. 355-365.
151. Akatsuka, H.; Kawai, E.; Omori, K., *et al.* "Overproduction of the extracellular lipase is closely related to that of metalloprotease in *Serratia marcescens*" *J. Ferment. Bioeng.*, **1996**, 81 (2), p. 115-120.
152. Morikawa, M.; Daido, H.; Pongpobpibool, S., *et al.* "Construction of a new host-vector system in *Arthrobacter* sp. and cloning of the lipase gene" *Appl. Microbiol. Biot.*, **1994**, 42 (2-3), p. 300-303.
153. Akatsuka, H.; Kawai, E.; Omori, K., *et al.* "The three genes lipB, lipC, and lipD involved in the extracellular secretion of the *Serratia marcescens* lipase which lacks an N-terminal signal peptide" *J. Bacteriol.*, **1995**, 177 (22), p. 6381-6389.

154. Angkawidjaja, C.; You, D.J.; Matsumura, H., *et al.* "Extracellular overproduction and preliminary crystallographic analysis of a family I.3 lipase" *Acta Crystallogr. F*, **2007**, 63 (3), p. 187-189.
155. Linhartová, I.; Bumba, L.; Mašín, J., *et al.* "RTX proteins: A highly diverse family secreted by a common mechanism" *FEMS Microbiol. Rev.*, **2010**, 34 (6), p. 1076-1112.
156. Lee, J.H.; Velmurugan, N.; Jeong, K.J. "Novel strategy for production of aggregation-prone proteins and lytic enzymes in *Escherichia coli* based on an anchored periplasmic expression system" *J. Biosci. Bioeng.*, **2013**.
157. Ahn, J.H.; Pan, J.G.; Rhee, J.S. "Identification of the tliDEF ABC transporter specific for lipase in *Pseudomonas fluorescens* SIK W1" *J. Bacteriol.*, **1999**, 181 (6), p. 1847-1852.
158. Kawai, E.; Idei, A.; Kumura, H., *et al.* "The ABC-exporter genes involved in the lipase secretion are clustered with the genes for lipase, alkaline protease, and serine protease homologues in *Pseudomonas fluorescens* no. 33" *BBA - Gene Struct. Expr.*, **1999**, 1446 (3), p. 377-382.
159. Çelik, E.; Çalık, P. "Production of recombinant proteins by yeast cells" *Biotechnology Adv.*, **2012**, 30 (5), p. 1108-1118.
160. Wang, C.H.; Guo, R.F.; Yu, H.W., *et al.* "Cloning and sequence analysis of a novel cold-adapted lipase gene from strain lip35 (*Pseudomonas* sp.)" *Agr. Sci. China*, **2008**, 7 (10), p. 1216-1221.
161. Matsumae, H.; Furui, M.; Shibatani, T. "Lipase-catalyzed asymmetric hydrolysis of 3-phenylglycidic acid ester, the key intermediate in the synthesis of diltiazem hydrochloride" *J. Ferment. Bioeng.*, **1993**, 75 (2), p. 93-98.
162. Gao, L.; Xu, J.H.; Li, X.J., *et al.* "Optimization of *Serratia marcescens* lipase production for enantioselective hydrolysis of 3-phenylglycidic acid ester" *J. Ind. Microbiol. Biot.*, **2004**, 31 (11), p. 525-530.
163. Shibatani, T.; Nakamichi, K.; Matsumae, H. "Method for preparing optically active 3-phenylglycidic acid esters", en *Tetrahedron*, vol.41 N° 7, 1985, pages 1393-1399, Pergamon Press Lt., GB; P. Melloni *et al.*, EP0362556 (B1), **1990**, Europe.
164. Hulshof, L.A.; Roskam, J.H. "Phenylglycidate stereoisomers, conversion products thereof with e.g. 2-nitrothiophenol and preparation of diltiazem", EP0343714 (B1), **1989**, Comunidad Económica Europea.
165. Dodds, D.R.; Lopez, J.L. "Enzymatic hydrolysis of glycidate esters in the presence of bisulfite anion", US Patent 5274300, **1989**, Estados Unidos.
166. Pan, J.; Zhao, L.; Xu, J., *et al.* "Immobilized *Serratia* lipase, preparation method and application for catalyzing and splitting diltiazem chiral precursor", CN101532007 (A), **2009**, China.
167. Zhu, Y.; Lu, B.; Lu, Y., *et al.* "Device and method for preparing diltiazem chiral precursor by using immobilized lipase ", CN101580862 (A), **2009**, China.
168. Long, Z.D.; Xu, J.H.; Zhao, L.L., *et al.* "Overexpression of *Serratia marcescens* lipase in *Escherichia coli* for efficient bioresolution of racemic ketoprofen" *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2007**, 47 (3-4), p. 105-110.
169. Kojima, Y.; Sakuradani, E.; Shimizu, S. "Acidolysis and glyceride synthesis reactions using fatty acids with two *Pseudomonas* lipases having different substrate specificities" *J Biosci Bioeng*, **2006**, 102 (3), p. 179-83.

170. Prim, N.; Bofill, C.; Pastor, F.I.J., *et al.* "Esterase EstA6 from *Pseudomonas* sp.CR-611 is a novel member in the utmost conserved cluster of family VI bacterial lipolytic enzymes" *Biochimie*, **2006**, 88, p. 859-867.
171. Panizza, P.; Syfantou, N.; Pastor, F.I.J., *et al.* "Acidic lipase Lip I.3 from a *Pseudomonas fluorescens*-like strain displays unusual properties and shows activity on secondary alcohols" *J. Appl. Microbiol.*, **2013**, 114 (3), p. 722-732.
172. Syfantou, N. "Identificación, clonación y caracterización de una nueva lipasa de *Pseudomonas* sp. CR-611". Máster experimental, **2007**, *Departamento de Microbiología de la Facultad de Biología*, Universidad de Barcelona, Barcelona.
173. Bofill, C.; Prim, N.; Mormeneo, M., *et al.* "Differential behaviour of *Pseudomonas* sp. 42A2 LipC, a lipase showing greater versatility than its counterpart LipA" *Biochimie*, **2010**, 92 (3), p. 307-316.
174. Alarcón Vivero, M.R. "Producción de la lipasa LIP2 de *Candida rugosa* en el sistema *Pichia pastoris*: caracterización y aplicación en reacciones de síntesis". Doctorado, **2008**, *Departamento de Ingeniería Química de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería*, Universidad Autónoma de Barcelona, Bellaterra.
175. "*PichiaPink*[™] expression eystem for high-level and large-scale expression and secretion of bioactive recombinant proteins in *Pichia pastoris* - User manual", Invitrogen, **2010**.
176. Cesarini, S. *Comunicación personal*, **2012**.
177. Jacobs, M.A.; Alwood, A.; Thaipisuttikul, I., *et al.* "Comprehensive transposon mutant library of *Pseudomonas aeruginosa*" *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **2003**, 100 (SUPPL. 2), p. 14339-14344.
178. Altschul, S.F.; Madden, T.L.; Schäffer, A.A., *et al.* "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs". Último acceso: 01/08/2013. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.
179. Omori, K.; Idei, A. "Gram-negative bacterial ATP-binding cassette protein exporter family and diverse secretory proteins" *J. Biosci. Bioeng.*, **2003**, 95 (1), p. 1-12.
180. Silby, M.W.; Cerdano-Tarraga, A.M.; Vernikos, G.S., *et al.* "Genomic and genetic analyses of diversity and plant interactions of *Pseudomonas fluorescens*" *Genome Biol*, **2009**, 10 (5), p. R51.1-R51.16.
181. Arnold, K.; Bordoli, L.; Kopp, J., *et al.* "The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling" *Bioinformatics*, **2006**, 22 (2), p. 195-201.
182. Guex, N.; Peitsch, M.C. "SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling" *Electrophoresis*, **1997**, 18 (15), p. 2714-23.
183. Kopp, J.; Schwede, T. "The SWISS-MODEL Repository of annotated three-dimensional protein structure homology models " *Nucleic Acids Res.*, **2004**, 32, p. D230-D234.
184. Schwede, T.; Kopp, J.; Guex, N., *et al.* "SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server" *Nucleic Acids Res.*, **2003**, 31 (13), p. 3381-3385.
185. Brown, S.D.; Utturkar, S.M.; Klingeman, D.M., *et al.* "Twenty-one genome sequences from *Pseudomonas* species and 19 genome sequences from diverse bacteria isolated from the rhizosphere and endosphere of *Populus deltoides*" *J. Bacteriol.*, **2012**, 194 (21), p. 5991-3.

186. Lesuisse, E.; Schanck, K.; Colson, C. "Purification and preliminary characterization of the extracellular lipase of *Bacillus subtilis* 168, an extremely basic pH-tolerant enzyme" *FEBS J.*, **1993**, 216, p. 155-160.
187. Shirai, K.; Jackson, R.L. "Lipoprotein lipase-catalyzed hydrolysis of p-nitrophenyl butyrate" *J. Biol. Chem.*, **1982**, 257 (10), p. 1253-1258.
188. Prim, N.; Blanco, A.; Martínez, J., *et al.* "*estA*, a gene coding for a cell-bound esterase from *Paenibacillus* sp. BP-23, is a new member of the bacterial subclass of type B carboxylesterases." *Res. Microbiol.*, **2000**, 151, p. 303–312.
189. Prim, N.; Sánchez, M.; Ruiz, C., *et al.* "Use of methylumbelliferyl-derivative substrates for lipase activity characterization" *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2003**, 22, p. 339-346.
190. Diaz, P.; Prim, N.; Pastor, F.I.J. "Direct fluorescence-based lipase activity assay" *BioTechniques*, **1999**, 27 (4), p. 696-700.
191. Falcocchio, S.; Ruiz, C.; Pastor, F.I.J., *et al.* "*Propionibacterium acnes* GehA lipase, an enzyme involved in acne development, can be successfully inhibited by defined natural substances" *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2006**, 40 (3-4), p. 132-137.
192. Ruiz, C.; Blanco, A.; Pastor, F.I.J., *et al.* "Analysis of *Bacillus megaterium* lipolytic system and cloning of LipA, a novel subfamily I.4 bacterial lipase" *FEMS Microbiol. Lett.*, **2002**, 217 (2), p. 263-267.
193. Helistö, P.; Korpela, T. "Effects of detergents on activity of microbial lipases as measured by the nitrophenyl alkanoate esters method" *Enzyme Microb. Tech.*, **1998**, 23 (1-2), p. 113-117.
194. Fernandez-Lorente, G.; Palomo, J.M.; Cabrera, Z., *et al.* "Improved catalytic properties of immobilized lipases by the presence of very low concentrations of detergents in the reaction medium" *Biotechnol. Bioeng.*, **2007**, 97 (2), p. 242-250.
195. Mogensen, J.E.; Sehgal, P.; Otzen, D.E. "Activation, inhibition, and destabilization of *Thermomyces lanuginosus* lipase by detergents" *Biochemistry*, **2005**, 44 (5), p. 1719-1730.
196. Jaeger, K.E.; Dijkstra, B.W.; Reetz, M.T. "Bacterial biocatalysts: Molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases" *Annu. Rev. Microbiol.*, **1999**, 53, p. 315-351.
197. Dharmsthiti, S.; Pratuangdejkul, J.; Theeragool, G., *et al.* "Lipase activity and gene cloning of *Acinetobacter calcoaceticus* LP009" *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **1998**, 44, p. 139–145.
198. Côté, A.; Shareck, F. "Cloning, purification and characterization of two lipases from *Streptomyces coelicolor* A3(2)" *Enzyme Microb. Tech.*, **2008**, 42 (5), p. 381-388.
199. Bisogno, T.; Howell, F.; Williams, G., *et al.* "Cloning of the first sn1-DAG lipases points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signaling in the brain" *J. Cell Biol.*, **2003**, 163 (3), p. 463-468.
200. Das, A.K.; Bellizzi, J.J.; Tandel, S., *et al.* "Structural basis for the insensitivity of a serine enzyme (palmitoyl-protein thioesterase) to phenylmethylsulfonyl fluoride" *J. Biol. Chem.*, **2000**, 275 (31), p. 23847-23851.
201. Uchiyama, T.; Watanabe, K. "Substrate-induced gene expression (SIGEX) screening of metagenome libraries" *Nat. Protocols*, **2008**, 3 (7), p. 1202-1212.

202. Lee, S.H.; Taguchi, H.; Yoshimura, E., *et al.* "Carboxypeptidase Taq, a thermostable zinc enzyme, from *Thermus aquaticus* YT-1 : Molecular cloning, sequencing, and expression of the encoding gene in *Escherichia coli*" *Biosci. Biotech. Bioch.*, **1994**, 58 (8), p. 1490-1495.
203. Janda, K.D.; Benkovic, S.J.; Lerner, R.A. "Catalytic antibodies with lipase activity and *R* or *S* substrate selectivity" *Science* **1989**, 244 (4903), p. 437-440.
204. Olędzka, G.; Dąbrowski, S.; Kur, J. "High-level expression, secretion, and purification of the thermostable aqualysin I from *Thermus aquaticus* YT-1 in *Pichia pastoris*" *Protein Expres. Purif.*, **2003**, 29 (2), p. 223-229.
205. Gupta, M.N.; Roy, I. "Enzymes in organic media" *Eur. J. Biochem.*, **2004**, 271 (13), p. 2575-2583.
206. Hudson, E.P.; Eppler, R.K.; Clark, D.S. "Biocatalysis in semi-aqueous and nearly anhydrous conditions" *Curr. Opin. Biotech.*, **2005**, 16 (6), p. 637-643.
207. Naik, S.N.; Goud, V.V.; Rout, P.K., *et al.* "Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review" *Renew. Sust. Energ. Rev.*, **2010**, 14 (2), p. 578-597.
208. Angkawidjaja, C.; Paul, A.; Koga, Y., *et al.* "Importance of a repetitive nine-residue sequence motif for intracellular stability and functional structure of a family I.3 lipase" *FEBS Lett.*, **2005**, 579 (21), p. 4707-4712.
209. "QuikChange II XL site-directed mutagenesis kit instruction manual", Agilent Technologies, **2010**.
210. "Two-Allele Library - Genome Science" *University of Washington*. Último acceso: 25/07/2013. Disponible en: <http://www.gs.washington.edu/labs/manoil/libraryindex.htm>.
211. Carballeira, J.D.; Vogel, A.; Reetz, M.T. "Degenerate codon optimizer" Max-Planck-Institut für Kohlenforschung **2006**. Disponible en: <http://www.kofo.mpg.de/en/research/organic-synthesis>.
212. Nakamura, Y. "Codon usage database". Último acceso: 27/06/2013. Disponible en: <http://www.kazusa.or.jp/codon/>.
213. Grocock, R.J.; Sharp, P.M. "Synonymous codon usage in *Pseudomonas aeruginosa* PA01" *Gene*, **2002**, 289 (1-2), p. 131-9.
214. Rajendhran, J.; Gunasekaran, P. "Strategies for accessing soil metagenome for desired applications" *Biotechnol. Adv.*, **2008**, 26 (6), p. 576-590.
215. Rappé, M.S.; Giovannoni, S.J. "The uncultured microbial majority" *Annu. Rev. Microbiol.*, **2003**, 57 (1), p. 369-394.
216. Gong, J.S.; Lu, Z.M.; Li, H., *et al.* "Metagenomic technology and genome mining: Emerging areas for exploring novel nitrilases" *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2013**, 97 (15), p. 6603-6611.
217. Ni, Y.; Xu, J.-H. "Biocatalytic ketone reduction: A green and efficient access to enantiopure alcohols" *Biotechnol. Adv.*, **2012**, 30 (6), p. 1279-1288.
218. Godessart, N.; Muñoz, F.J.; Regué, M., *et al.* "Chromosomal mutations that increase the production of a plasmid encoded hemolysin in *Escherichia coli*" *J Gen Microbiol.*, **1988**, 134, p. 2779-2788.
219. "TOPO[®] TA cloning[®] kit user guide", Invitrogen by Life Technologies, **2012**.
220. Wohlfarth, S.; Hoesche, C.; Strunk, C., *et al.* "Molecular genetics of the extracellular lipase of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1" *J. Gen. Microbiol.*, **1992**, 138 (7), p. 1325-1335.

221. Regenhardt, D.; Heuer, H.; Heim, S., *et al.* "Pedigree and taxonomic credentials of *Pseudomonas putida* strain KT2440" *Environ. Microbiol.*, **2002**, 4 (12), p. 912-915.
222. Bagdasarian, M.; Lurz, R.; Ruckert, B., *et al.* "Specific-purpose plasmid cloning vectors. II. Broad host range, high copy number, RSF1010-derived vectors, and a host-vector system for gene cloning in *Pseudomonas*" *Gene*, **1981**, 16 (1-3), p. 237-47.
223. "*Pseudomonas putida* (Trevisan) Migula (ATCC[®] 47054™)" *ATCC (American Type Culture Collection)*. Último acceso: 11/08/2013. Disponible en: <http://www.atcc.org/products/all/47054.aspx#97A3B80C25094AB18C0467A587FD7091>.
224. Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. "Molecular cloning. A laboratory manual." **1989**, Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor.
225. Kouker, G.; Jaeger, K.-E. "Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases" *Appl. Environ. Microbiol.*, **1987**, 53 (1), p. 211-213.
226. "MicroPulser™ electroporation apparatus operating instructions and applications guide", Bio-Rad.
227. Moreland, J.L.; Gramada, A.; Buzko, O.V., *et al.* "The Molecular Biology Toolkit (MBT): A modular platform for developing molecular visualization applications" *BMC Bioinformatics*, **2005**, 6.