

BIOPROSPECCIÓN DE MICROORGANISMOS ANTÁRTICOS PRODUCTORES DE LIPASAS Y ESTERASAS ACTIVAS A BAJAS TEMPERATURAS.

Magela Teliz Gonzalez

Tutora Msc. María Laura Camesasca
Co-Tutora Dr. María Eugenia Vila

*Departamento de Bioingeniería, Instituto de
Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, UdelaR*

Agradecimientos

A todas las instituciones que hicieron posible el desarrollo de mi carrera: Universidad de la República, Facultad de Ciencias, Facultad de Ingeniería

A quienes integran el departamento de Bioingeniería, por hacerme parte de él y por todo su apoyo

A mis tutoras: Laura Camesasca y Ma. Eugenia Vila. Por todo el aprendizaje, las oportunidades, el espacio para crecer y las cosas dulces de la tarde.

A mis padres, mi abuela, mi hermana, mis sobrinxs y mi tía. Que de formas muy variadas, amplias y gigantes me ha dado todas las maneras de contención y amor que existen. Con mención especial a mi hermana por ser ayuda y referente como buena hermana mayor, y a mi abuela por las velas prendidas antes de cada examen.

A mis amigxs, mis amores. Que me acompañan, siempre dan para adelante y hacen que sea posible que siga en todo lo que haga. Sí soy es por ustedes.

A mi novia por todo lo lindo que es estar juntas, por todo el amor que armamos y compartimos. Otra mención muy especial por todas las ayudas en el proceso de este trabajo.

Al aquelarre antártico que hicimos en la base que me abraza muchísimo.

Y a todas las personas que comparten conocimientos de forma libre sin importar a quien, respondiendo preguntas desde todas las plataformas, colectivizando saberes y recursos. Generando comunidad desde lo que creo yo es el fundamento más básico e importante en ciencia y desarrollo.

Tabla de contenidos

Agradecimientos	2
Tabla de contenidos	3
Índice de figuras	5
Índice de tablas	6
1 INTRODUCCIÓN	7
1.1 Enzimas industriales	7
1.2 Nomenclatura de las enzimas	8
1.3 Lipasas y esterasas	9
1.3.1 Lipasas	9
1.3.2 Esterasas	10
1.3.3 Estructura de las lipasas y esterasas	10
1.3.4 Relevancia Biotecnológica de lipasas y esterasas bacterianas	11
1.4 Bioprospección de enzimas bacterianas	12
1.5 Psicrófilos y Psicrotolerantes como fuentes de productos biotecnológicos	13
1.6 Enzimas adaptadas al frío	14
1.6.1 Mecanismos adaptativos	15
Modificaciones estructurales	15
Efectos de las variaciones estructurales en la catálisis	17
1.7 Continente antártico como fuente de lipasas/esterasas activas en frío	19
2. OBJETIVOS	21
2.1 General	21
2.2 Específicos	21
3. MATERIALES Y MÉTODOS	21
3.1 Origen de las muestras	21
3.2 Aislamiento y Clasificación	21
3.3 Extracción ADN	22
3.4 Fingerprinting mediante TP RAPD PCR	22
3.5 Selección preliminar de cepas con actividad lipolítica o esterasa	22

3.6 Identificación a nivel de género de las cepas	23
3.7 Ensayos de actividad enzimática	24
3.7.1 Producción de enzimas en medio líquido	24
3.7.2 Determinación de actividad lipolítica	25
3.7.3 Determinación de actividad esterasa	25
3.7.4 Cuantificación proteica	26
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
4.1 Clasificación y caracterización morfológica	28
4.2 Bioprospección de bacterias con actividad lipolítica o esterasa	30
4.3 Evaluación del potencial biotecnológico de las enzimas de estudio en términos de estabilidad frente a cambios de pH y temperatura	34
4.4 Identificación a nivel de género y revisión de literatura	40
5. CONCLUSIÓN	46
6. BIBLIOGRAFÍA	49
7. ANEXO	58
7.1 Clasificación y caracterización morfológica	58
7.2 Pre selección de cepas finales de trabajo.	59
7.3 Secuenciación	60
7.4 Ensayos de actividad enzimática	60

Índice de figuras

<i>Figura 1.1.</i> Principales reacciones catalizadas por lipasas.	10
<i>Figura 1.2</i> Plegamiento α/β hidrolasa	11
<i>Figura 1.3.</i> Esquema de modificaciones típicas de enzimas adaptadas al frío.	17
<i>Figura 1.4.</i> Cambios en la energía libre entre enzimas provenientes de microorganismos psicrófilos y mesófilos	18
<i>Figura. 4.1</i> Morfología celular de algunas cepas de trabajo.	28
<i>Figura 4.2</i> Perfiles de bandas de TP RAPD PCR en geles de agarosa 2%	30
<i>Figura. 4.3.</i> Distribución de cepas según el factor D_T/D_c	32
<i>Figura 4.4.</i> Fotografías de cepas en medio TBA y Mest	33
<i>Figura. 4.5</i> Gráficos de superficie de respuesta para enzimas con actividad lipolítica	36
<i>Figura. 4.6</i> Gráfico de actividad lipolítica en U/mL para las enzimas extracelulares provenientes de las cepas 19C(2), 51a, 103e y 20B, .	37
<i>Figura. 4.7</i> Gráficos de superficie de respuesta para enzimas esterasas	38
<i>Figura. 4.8</i> Medidas de actividad enzimática en U/ml para enzimas esterasas extracelulares	39
<i>Figura 4.9 .</i> Concentraciones proteicas luego de 24 horas de incubación en medio de cultivo TSB a 20°C.	39

Índice de tablas

<i>Tabla 3.1.</i> Condiciones de trabajo para los ensayos de actividad lipasa y esterasa.	26
<i>Tabla 4.1</i> Cepas seleccionadas y sus medidas Dt/Dcel	33
<i>Tabla 4.3</i> Resultados del alineamiento de secuencias.	40
<i>Tabla 7.1.</i> Grupos morfológicos de cepas de trabajo.	58
<i>Tabla 7.2</i> Medidas de diámetro total sobre diámetro de la colonia (DT/Dcol)	59
<i>Tabla 7.3</i> Programa de PCR utilizado para la amplificación de fragmentos correspondientes al gen ribosomal 16S	60
<i>Tabla 7.4.</i> Diseño experimental para determinar pH y temperatura óptimos de cada enzima.	60
<i>Tabla 7.5</i> Resultados análisis de regresión de los datos obtenidos a partir de diseño compuesto central.	61

1 INTRODUCCIÓN

En los últimos años la producción a nivel industrial de diversos productos de alto valor agregado tiende al desarrollo de procesos biotecnológicos, utilizando células vivas o moléculas derivadas de estas, por ejemplo enzimas, como recursos para su producción. Los microorganismos conocidos como psicrófilos o psicrotolerantes, son potenciales fuentes de enzimas que llevan a cabo procesos catalíticos en condiciones de baja energía cinética. Las lipasas (E.C. 3.1.1.3) y esterases (E.C 3.1.1.1) son enzimas ampliamente usadas en la industria debido a que, dada su promiscuidad catalítica tienen una gran diversidad de potenciales usos. Aquellas enzimas adaptadas a bajas temperaturas con alta especificidad, suponen una herramienta biotecnológica con una demanda creciente. En este contexto, el ecosistema microbiano antártico es una fuente ideal de estas enzimas como recursos biotecnológicos enfocados al uso en condiciones de bajas temperaturas.

1.1 Enzimas industriales

Las enzimas son moléculas de naturaleza proteica (con excepción de las moléculas de ARN catalítico llamadas ribozimas). Éstas son las encargadas de catalizar la mayor parte de las reacciones químicas necesarias para mantener la vida, siendo altamente específicas. Su mecanismo de acción consiste en reducir la energía de activación de la reacción, acelerando la velocidad de las mismas, sin sufrir cambios permanentes en su estructura (Tattersall, *et al.*, 2012).

Desde las civilizaciones antiguas, procesos enzimáticos llevados a cabo por microorganismos como *Saccharomyces cerevisiae* o lactobacilos han sido utilizados en el procesamiento de comidas y bebidas a través de diversos procesos de fermentación. En los mismos, se utilizaban como estrategias la incorporación del microorganismo con la maquinaria enzimática necesaria o el uso de sus enzimas aisladas (Cowan & Tombs, 2020).

En las últimas décadas, se ha logrado una serie de avances científicos en el desarrollo de métodos de separación enzimática, lo que ha llevado a una mejora notable de la eficiencia de los procesos catalíticos, aumentando su uso a nivel industrial. A esto, se le suma el reciente avance en los métodos de caracterización y modificación molecular. Las enzimas de uso industrial son consideradas biocatalizadores de gran importancia debido a sus características fisicoquímicas, tales como: catálisis de un amplio espectro de sustratos, capacidad de llevar a cabo una serie de transformaciones moleculares como hidrólisis, transferencias de grupos funcionales entre otros,

así como su regioselectividad y/o enantioselectividad. Por estas razones existe una demanda creciente en el mercado mundial de enzimas, que se estima debería de alcanzar los US \$7 mil millones para 2023 con una tasa de crecimiento anual del 4.9% para el período 2018-2023 (Business Communication Company Research, 2018).

Existen amplias ventajas en el uso de enzimas para la síntesis de una amplia variedad de productos, en comparación a métodos químicos tradicionales. Por ejemplo su especificidad de acción, que permite obtener isómeros deseados eliminando el proceso de resolución de mezclas racémicas. Esto resulta de gran utilidad ya que en la industria farmacéutica y alimentaria la quiralidad del producto define su efecto, sabor o aroma. Así mismo, la utilización de biocatalizadores permite generalmente trabajar en condiciones suaves de reacción (pH y temperatura principalmente) en comparación a los necesarios para llevar a cabo síntesis químicas tradicionales, disminuyendo la generación de subproductos (Sethi & Shukla, 2017). Por último, en lo que refiere a la rentabilidad económica, resulta muy competitiva si se tiene en cuenta el menor costo energético (por sus condiciones suaves de reacción) y la posibilidad de generar productos de mayor valor agregado por su especificidad y calidad (Cowan & Tombs, 2020). Además del beneficio económico, cabe destacar la ventaja ambiental que conlleva la utilización de enzimas en la industria debido al menor consumo energético y a la disminución del uso de solventes orgánicos o metales tóxicos en el proceso. A su vez, en la producción de estos biocatalizadores se pueden utilizar desechos de otras industrias u otras fuentes renovables como sustrato para la fermentación y producción, permitiendo la revalorización de otros productos (Lima-Ramos, *et al.*, 2014). Ejemplos actuales de su uso en la industria varían desde farmacéutica a la industria papelera, alimenticia, detergente, textil y biocombustibles entre otros (Chapman, *et al.*, 2018).

1.2 Nomenclatura de las enzimas

La Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB por sus siglas en inglés) en consulta con la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) estableció una denominación y clasificación sistemática de las enzimas según la reacción que catalizan. Esta nomenclatura se basa en un tipo de clasificación numérica que se denomina números EC (del inglés *Enzyme Commission numbers*). Este sistema se compone de una serie de cuatro números que en conjunto representan la reacción específica catalizada, así como el sustrato específico de

la enzima. Los números representan: la clase, sub clase, sub-subclase, y el último el número de serie propio de cada enzima dentro de su sub-subclase (McDonald & Tipton, 2021).

Existen siete clases generales de enzimas: oxidoreductasas (EC 1, reacciones redox), transferasas (EC 2, transferencia de grupos funcionales), hidrolasas (EC 3, catálisis de ruptura de enlaces con agua como nucleófilo), liasas (EC 4, ruptura de enlaces no hidrolítica), isomerasas (EC 5, catálisis de isomerización de una molécula), ligasas (E6, unión de dos moléculas mediante enlaces covalentes) y translocasas (catalizan la translocación de iones o moléculas a través de las membranas o su distribución dentro de las membranas (McDonald & Tipton, 2021).

Aproximadamente el 80% del uso de enzimas industriales consiste en hidrolasas, que degradan polímeros naturales de alto peso molecular como proteínas y polisacáridos (Cowan & Tombs, 2020). Dentro de las hidrolasas de uso industrial, las lipasas (E.C. 3.1.1.3) y esterasas (E.C. 3.1.1.1), son hidrolasas de ésteres carboxílicos utilizadas actualmente en diversas áreas por su amplia versatilidad así como para potenciales nuevos usos de interés biotecnológico (Casas-Godoy, *et al.*, 2018; Chandra, *et al.*, 2020; Patel, *et al.*, 2019).

1.3 Lipasas y esterasas

1.3.1 Lipasas

Las lipasas son serina-hidrolasas definidas como triacilglicerol hidrolasas (EC 3.1.1.3). Como su nombre indica, forman parte de la clase de hidrolasas que contienen el aminoácido serina (Ser) en su sitio catalítico. Estas enzimas hidrolizan glicéridos de cadena larga en ácidos grasos en la interfase del sistema bifásico resultante entre el sustrato hidrofóbico y el medio acuoso que lo contiene.

Las lipasas tienen la característica de catálisis selectiva debido a que pueden llevar a cabo catálisis regioselectiva (ataque de lipasas hacia un enlace éster definido), enantioselectiva (preferencia por un tipo particular de enantiómero) y presentar preferencia a un tipo de sustrato (tri-, di- o monoglicérido) (Casas-Godoy, *et al.*, 2012).

En condiciones termodinámicas favorables -como baja actividad de agua-, las lipasas, presentan gran promiscuidad catalítica, pudiendo llevar a cabo otros procesos catalíticos (**Figura 1.1**) como esterificaciones (producción de éster a partir de la unión covalente entre un alcohol y un ácido graso, liberando una molécula de agua), transesterificaciones, entre otros (Casas-Godoy, *et al.*, 2012; Chandra, *et al.*, 2020).

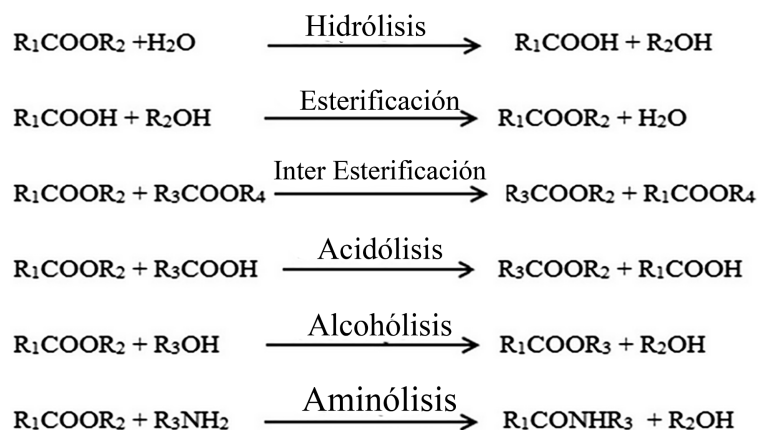


Figura 1.1. Principales reacciones catalizadas por lipasas. Adaptado de Chandra et al., 2020.

1.3.2 Esterasas

Las esterases (EC 3.1.1.1) son serina-hidrolasas, diferenciadas de las lipasas por la naturaleza de su sustrato. Se definen como carboxilesterasas que hidrolizan ésteres carboxílicos de acilglicerol de cadena corta (<10 átomos de carbono) a diferencia de las lipasas capaces de hidrolizar ésteres carboxílicos de acilglicerol de cadena larga (>10 átomos de carbono) (Casas-Godoy, *et al.*, 2012).

Las esterases forman parte de la súper familia de proteínas α/β hidrolasas, por lo que comparten la estructura secundaria de las lipasas, así como la tríada catalítica compuesta por serina, aspartato o glutamato e histidina (Armendáriz-Ruiz, *et al.*, 2018). Por esta razón, muchos trabajos no realizan distinción entre estas enzimas (Ali, *et al.*, 2012), sus diferencias aún se encuentran en discusión siendo este motivo de investigaciones actuales (Bracco *et al.*, 2020). En este trabajo se diferencian en base al sustrato hidrolizado.

1.3.3 Estructura de las lipasas y esterases

Las lipasas y esterases, tal como se mencionó anteriormente, son parte de la superfamilia de enzimas llamadas α/β hidrolasas, compuesta por varios tipos de enzimas con diferentes funciones y orígenes pero el mismo plegamiento proteico. Las mismas, comparten el mismo tipo de configuración proteica compuesta por ocho hojas β (todas con disposición paralela a excepción de una $-\beta_2-$ que es antiparalela), conectadas por 6 hélices α (en hojas β_3 a β_8) (**Figura 1.2**). Otra estructura en común entre las α/β hidrolasas es la tríada catalítica, que consiste en un nucleótido, un aminoácido con residuo ácido y una histidina. En el caso de esterases y lipasas, la tríada catalítica se encuentra generalmente conformada por serina (Ser) como nucleófilo, aspartato

(Asp) o glutamato (Glu) como residuo ácido e histidina (His) como residuo básico (Armendáriz-R, *et al.*, 2018; Casas-Godoy, *et al.*, 2012).

Existen diferentes modificaciones evolutivas tales como cambios en el número de hojas β , inserciones y cambios en el dominio de unión al sustrato o variaciones en la ubicación de los aminoácidos de la tríada que llevan a la característica de poder hidrolizar diferentes tipos de sustratos (Agobo *et al.*, 2017; Casas-Godoy, *et al.*, 2012).

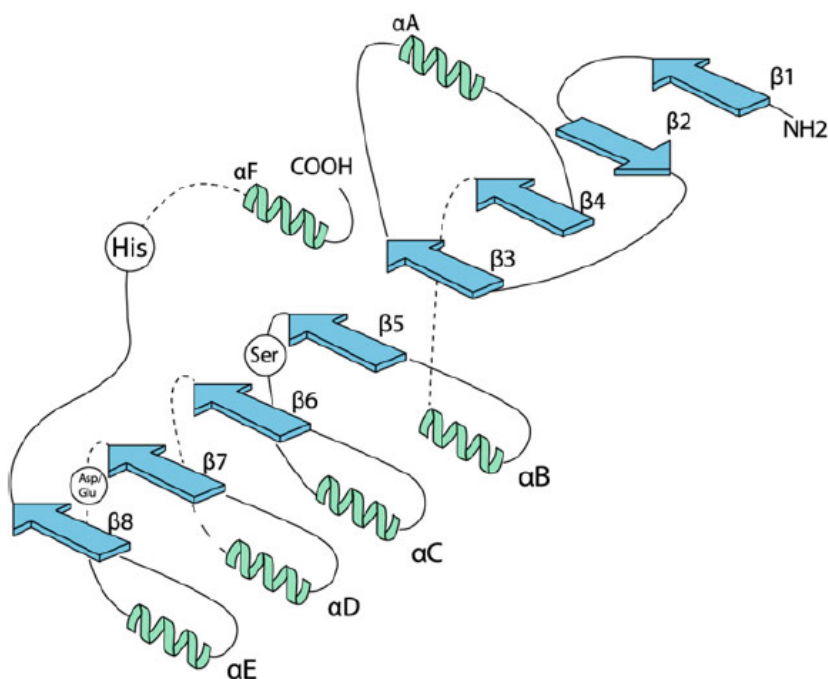


Figura 1.2. Plegamiento α/β hidrolasa. Alfa hélices representadas como espirales, y hojas Beta como flechas. Residuos catalíticos señalados en círculos. Extraído de Casas-Godoy, *et al.*, 2019.

1.3.4 Relevancia Biotecnológica de lipasas y esterases bacterianas

Estas enzimas ubicuas –presentes en animales, plantas y microorganismos- son mayoritariamente producidas para fines biotecnológicos a partir de fuentes microbianas debido a su rápido crecimiento en un medio económico, a la rápida producción de enzimas, la sustentabilidad del proceso, facilidad de manejar en comparación con células animales o vegetales, requerimiento de menor espacio para la producción y a la baja dificultad para llevar a cabo su manipulación genética (Agobo, *et al.*, 2017). Si bien estas fuentes pueden ser tanto fúngicas como bacterianas, las enzimas obtenidas a partir de estas últimas son las que presentan la posibilidad de mantener su actividad en una amplia variabilidad de condiciones para resistir el entorno fisicoquímico de uso industrial (Chandra, *et al.*, 2020; Javed *et al.*, 2018). Esto último, en conjunto con su

selectividad catalítica, son características por las cuales las esterasas y lipasas bacterianas son de los catalizadores más buscados para llevar a cabo procesos biotecnológicos de lípidos (Melani, *et al.*, 2020).

Las áreas de aplicación de lipasas y esterasas varían desde las más tradicionales -como la industria cosmética, textil, alimentaria, etc.-, hasta campos en desarrollo. Dentro de estos últimos se encuentran la síntesis orgánica catalizada por enzimas, o campos de desarrollo emergentes como la producción de biodiesel y la síntesis de biomateriales (Bukhari, *et al.*, 2017; Guajardo & de María, 2018; Melani, *et al.*, 2020). En adición a esto, las esterasas y lipasas activas al frío presentan características intrínsecas prometedoras para usos industriales y biotecnológicos. Algunas de las aplicaciones directas de estas enzimas activas a bajas temperaturas implican su uso como aditivo en detergentes (permiten el proceso de lavado en condiciones de baja temperatura, lo que disminuye la utilización de energía y el desgaste de materiales a la vez que reduce el uso de químicos en los detergentes siendo biodegradables). También la síntesis de intermediarios quirales y productos químicos finos y termosensibles demandados en la industria farmacéutica como agroquímica. En la industria alimentaria se utilizan para la síntesis de compuestos aromáticos (reacciones que ocurren a bajas temperaturas preservan los micro y macronutrientes sensibles al calor presentes en los ingredientes alimentarios), así como también en el procesamiento de cueros en la industria textil (para eliminar la grasa natural presente en la piel de los animales, disminuyendo el impacto ambiental que implican tratamientos químicos agresivos) y para la síntesis de biopolímeros. Por último, son aplicables en procesos de biorremediación y bioaumentación para tratamiento de contaminaciones oleicas en ambientes fríos (Bukhari,*et al.*, 2017; Joseph, 2013; Kavitha, 2016; Mhetras, *et al.*, 2021; Suzuki *et al.*, 2001; Tan, *et al.*, 1996).

1.4 Bioprospección de enzimas bacterianas

La búsqueda de fuentes de compuestos bioquímicos potencialmente útiles a nivel industrial a partir de muestreo de material biológico y su posterior estudio es conocida como *Bioprospección* (Scott, 2001). El ejemplo más conocido de resultados exitosos en bioprospección es el descubrimiento y posterior aislamiento de la enzima *Taq polimerasa*, como resultado de la investigación a partir de un aislamiento de *Thermus aquaticus*, recolectado por primera vez de una fuente termal en el Parque Nacional Yellowstone (Brock, 1969). En la actualidad, esta enzima que cataliza la formación y reparación de ADN y ARN a partir de una hebra existente

(que sirve como hebra molde), es parte fundamental en la reacción en cadena de la polimerasa conocida como PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Esta técnica ha sido fundamental en el avance en investigación y desarrollo de los últimos años.

Las enzimas microbianas pueden utilizarse en diversas condiciones fisicoquímicas, tantas como el proceso industrial lo requiera. La capacidad característica de los microorganismos de adaptar su maquinaria celular para mantener altas actividades metabólicas en diferentes condiciones fisicoquímicas, es uno de los principales beneficios del uso de sus enzimas frente a otras fuentes (Berlemont & Gerday, 2011). Dentro de las condiciones de trabajo en las cuales las enzimas deben de mantener su rendimiento en el ámbito industrial se destacan: susceptibilidad a variaciones en pH, temperatura, presión, solubilidad del sustrato y/o productos, alta volatilidad del solvente, alta viscosidad, o porque la transformación requiere condiciones especiales como condiciones de baja actividad de agua necesarias para procesos tales como hidrólisis inversa (Berlemont & Gerday, 2011).

Los microorganismos desarrollan adaptaciones moleculares frente a las presiones selectivas que presentan diversos ambientes. Estas variaciones a nivel molecular pueden ser utilizadas como potenciales fuentes de productos biotecnológicos industriales. La amplia diversidad microbiana establecida en respuesta a la heterogeneidad de recursos y presiones selectivas de nuestro planeta, es una fuente provechosa de recursos biotecnológicos.

1.5 Psicrófilos y Psicrotolerantes como fuentes de productos biotecnológicos

Los extremófilos son organismos que tienen la capacidad de crecer en condiciones tales como: temperaturas extremadamente altas o bajas, pH extremadamente ácido o básico, alta exposición a radiaciones, alta salinidad, entre otros.

En relación a la temperatura de supervivencia, los microorganismos se definen en base a sus temperaturas cardinales de crecimiento: mínimas, máximas y óptimas en función de la velocidad de crecimiento del mismo. En ambientes a temperaturas bajas constantes se encuentran los microorganismos psicrófilos y psicrotolerantes. Los psicrófilos son aquellos microorganismos con temperaturas óptimas próximas a los 15 °C, máximas de 20 °C, y mínimas cercanas a los 0 °C. Por otra parte, los microorganismos psicrotolerantes son aquellos que pueden sobrevivir a temperaturas menores a 0°C, pero su temperatura óptima se encuentra entre los 20 y 25 °C (Morita, 1975).

Las bacterias psicrófilas y psicrotolerantes dependen de estrategias de adaptación bioquímica que les permitan crecer y reproducirse en las condiciones limitantes ejercidas por las bajas temperaturas. Estas estrategias, consisten en cambios moleculares y fisiológicos para poder afrontar tales condiciones y evitar el estrés celular.

En los últimos años, se ha desarrollado la búsqueda de enzimas que cuenten con adaptaciones moleculares que les permita mantener altas actividades catalíticas a bajas temperaturas y que permitan su uso en la industria. Al 2016 el 80% de las enzimas adaptadas al frío reportadas son hidrolasas, de las cuales las lipasas y esterases son las más estudiadas (18 y 20% respectivamente) (Santiago *et al.*, 2016). Hasta enero de 2019, en la literatura se han reportado alrededor de 850 artículos sobre esterases / lipasas extremófilas. El primer artículo fue publicado en 1966 y el 70% del total restante han sido publicados en los últimos 20 años, dentro de los cuales los psicrófilos representan un (8%) de la literatura disponible (De Luca & Mandrich, 2020).

1.6 Enzimas adaptadas al frío

Los microorganismos psicrófilos y psicrotolerantes adaptan sus procesos celulares a las condiciones de baja energía de ambientes fríos. A nivel bioquímico, deben de poder mantener sus tasas metabólicas y de crecimiento en puntos cercanos a la temperatura de congelación del agua. En este contexto, sus enzimas deben ajustarse para: catalizar la reacción a baja temperatura, modificar su estructura para mantener su estabilidad térmica y variar la dinámica de su estructura tridimensional para compensar los efectos de congelación, evitando al mismo tiempo, el efecto de desnaturalización proteica inducida por el frío que impide su correcto funcionamiento (De Maayer, *et al.*, 2014).

A pesar de las condiciones adversas propias de las bajas temperaturas, las enzimas adaptadas al frío (Cold Active Enzymes en inglés) presentan temperaturas óptimas de reacción entre 4°C y 20°C y, aunque presentan menor termo-estabilidad, resisten a la desnaturalización causada por bajas temperaturas. Existen casos puntuales de enzimas que pueden llevar a cabo reacciones con altas actividades (en comparación a ortólogos mesófilos y termófilos) en un rango más amplio de temperaturas entre 0°C y 90°C (Santiago, *et al.*, 2016).

1.6.1 Mecanismos adaptativos

Para que una reacción enzimática tenga lugar, una enzima debe de poder unirse al sustrato y llevar a cabo los cambios conformacionales requeridos para llevar adelante la catálisis. También debe poder generar un complejo lo suficientemente estable con el sustrato, sin perder la flexibilidad necesaria para realizar la modificación en el mismo. Ambas acciones (complejo enzima-sustrato y cambios conformacionales) se ven afectadas por variaciones en la temperatura expresados mediante la constante de Michaelis-Menten, K_m (medida de la afinidad de la enzima por su sustrato) y en el número de recambio o constante catalítica de la enzima, K_{cat} (definido como el número de moles de sustrato transformados por mol de enzima por segundo) (Santiago, *et al.*, 2016; Tattersall, G *et al.*, 2012).

La actividad de las enzimas adaptadas al frío depende de las variaciones a nivel estructural, que tienen implicancias en el proceso catalítico. Los mecanismos por los cuales esto sucede se deben a un aumento en K_{cat} , disminución en K_m o variación en conjunto de ambos parámetros. Se define como rango de eficiencia catalítica al cociente K_{cat}/K_m . Es característico para estas enzimas que éste se mantenga alto a bajas temperaturas (Santiago, *et al.*, 2016; Singh, *et al.*, 2016; Tattersall, G *et al.*, 2012). Al comparar ortólogos mesófilos, termófilos y psicrófilos, los K_m y K_{cat} de cada uno son comparables en magnitud dentro del rango de su temperatura fisiológica (rango de temperatura al que el organismo está adaptado). Estos datos reflejan la importancia de las adaptaciones a nivel molecular, que definen la afinidad enzima-sustrato y en la flexibilidad para el re-arreglo conformacional necesario para que la reacción química ocurra. De lo contrario, las fluctuaciones térmicas reducidas (en el caso de bajas temperaturas) disminuirían la movilidad conformacional, evitando el correcto enlace con el sustrato y, en consecuencia, comprometiendo la eficiencia catalítica (Arnold, *et al.*, 2001; Tattersall, *et al.*, 2012).

Modificaciones estructurales

La adaptación al cambio de temperatura y compensación térmica de enzimas activas en frío es consecuencia de variaciones en los aminoácidos que componen su cadena peptídica enzimática. Estas modificaciones, alteran el número de interacciones estabilizadoras dentro de la

proteína y modifican la estructura terciaria proteica -cambiando la naturaleza de las interacciones entre los aminoácidos y el medio circundante- (De Maayer, *et al.*, 2014).

Las enzimas adaptadas al frío comparten varias modificaciones características en sus secuencias aminoacídicas, identificadas mediante análisis comparativo entre estructuras homólogas de termófilos y mesófilos. De manera global, estos mecanismos llevan a aumento en flexibilidad, disminución en termoestabilidad y aumento de actividad en condiciones de baja energía. El aumento en la flexibilidad y movilidad proteica reduce la energía de activación necesaria para llevar a cabo la catálisis y puede ser alcanzado mediante varios de los mecanismos resumidos en la **Figura 1.4** donde se comparan enzimas mesófilas (rojo) y termófilas (azul). Algunos de estos implican: inserciones de bucles que contribuyen a mayor accesibilidad al sitio activo, aumento del contenido de asparagina, metionina y glicina en el sitio catalítico -lo que permite aumentar la movilidad local necesaria para transformaciones conformacionales-, aumento en la relación de contenido lisina-arginina, disminución en la formación de enlaces de hidrógeno y puentes salinos, y reemplazo de residuos como arginina o glutamato por lisina o alanina respectivamente en sitios expuestos de estructuras en hélices. Ésto último tiene consecuencias en el efecto hidrofóbico, por el cual las enzimas presentan disminución de entropía dada por el reordenamiento de las moléculas de agua, que es más débil a bajas temperaturas. En esta condición, las moléculas de agua tienen menor energía rotacional y colisional, por lo que la exposición de aminoácidos no polares no afecta en gran medida la entropía global. De tener mayor número de aminoácidos polares, su estructura a bajas temperaturas sería mucho más rígida) (De Maayer *et al.*, 2014; Santiago *et al.*, 2016).

Es importante destacar que existen múltiples tipos de alternativas evolutivas para mantener flexibilidad y funcionalidad en ambientes fríos. Las aquí mencionadas deben de ser consideradas como mecanismos generales que varían según la enzima, su función y entorno a la que está expuesta.

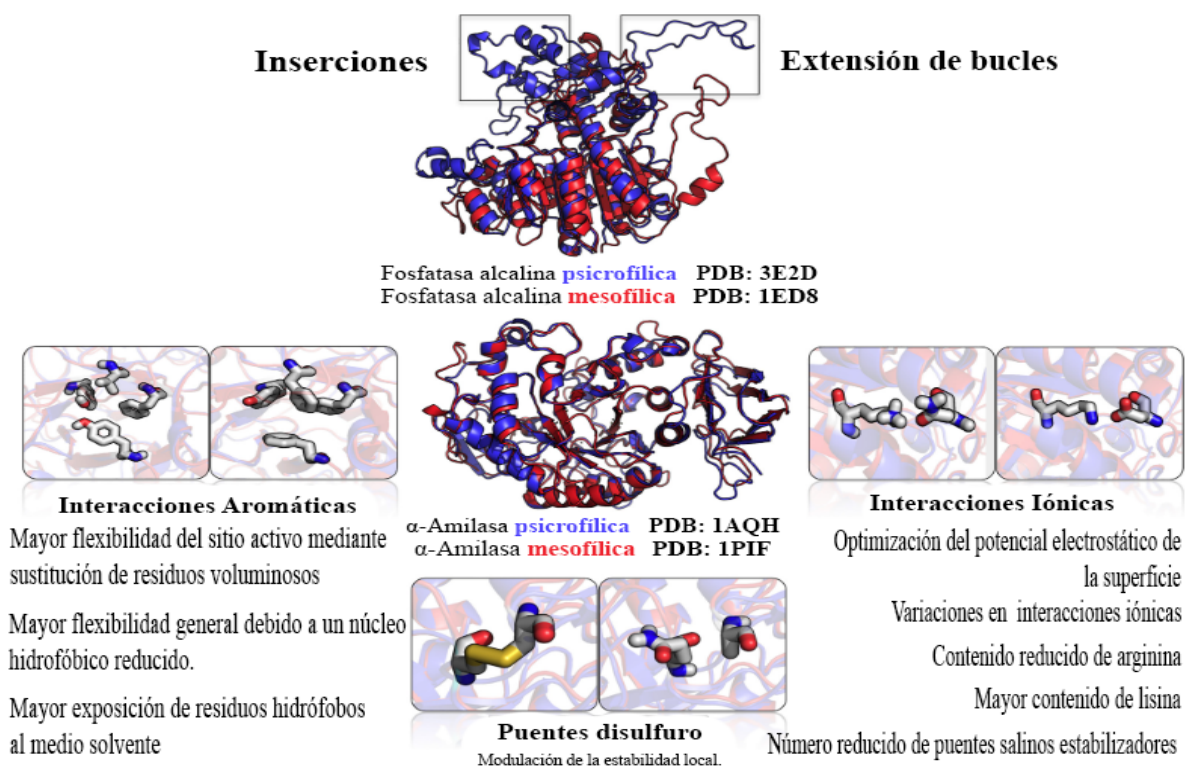


Figura 1.3. Esquema de modificaciones típicas de enzimas adaptadas al frío. Comparación entre mesófilas (rojo) y Psicrófilas (azul). Adaptado de Santiago, et al., 2016.

Efectos de las variaciones estructurales en la catálisis

La dependencia entre la temperatura y la eficiencia catalítica puede ser conceptualizada a partir de la teoría del estado de transición, donde se asume el equilibrio entre el estado basal del complejo enzima-sustrato y su forma activada (a la que debe llegar para que ocurra la reacción enzimática). Para que la reacción tenga lugar, se debe superar la energía libre de activación, $\Delta G^\ddagger$, magnitud dependiente de la temperatura.

La ecuación de Eyring (Ec. 1.1) vincula la temperatura con $\Delta G^\ddagger$ de activación:

$$k_{cat} = \frac{k_B T}{h} e^{\frac{-\Delta G^\ddagger}{RT}} = \frac{k_B T}{h} e^{\left(\frac{\Delta S^\ddagger}{R} - \frac{\Delta H^\ddagger}{RT}\right)}$$

Ecuación 1: ecuación de Eyring. k_B es la constante de Boltzman, h cte. De Planck y $\Delta H^\ddagger$ y $\Delta S^\ddagger$ las contribuciones entálpicas y entrópicas a la energía libre de activación respectivamente.

Donde k_B es la constante de Boltzman, h cte. de Planck, $\Delta H^\ddagger$ la variación en entalpía (diferencia de energía térmica entre el estado basal del complejo enzima-sustrato y su forma activada) y $\Delta S^\ddagger$ la variación en entropía (diferencia entre el grado de orden entre estado basal del complejo

enzima-sustrato y su forma activada) contribuyentes a la energía libre de activación. El efecto de estas variaciones puede verse en la **Figura 1.4**, donde se observa la diferencia entre la energía libre entre enzimas provenientes de microorganismos psicrófilos (E_P en azul) y mesófilos (E_M en rojo). En este contexto, para aumentar K_{cat} a bajas temperaturas y poder llevar a cabo la reacción, la enzima debe adaptarse para disminuir su entalpía, disminuyendo su energía de activación, y compensando esta disminución en un aumento de entropía.

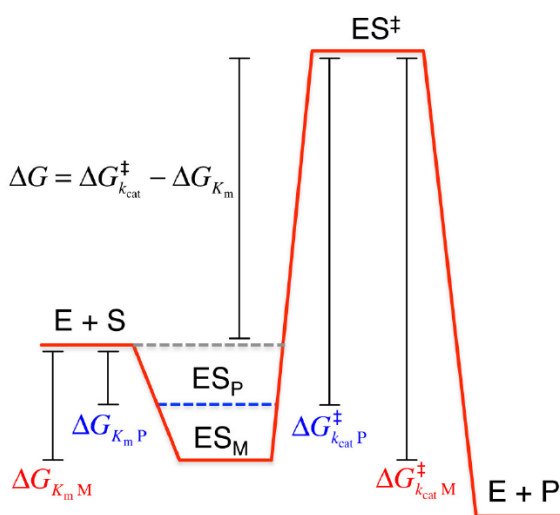


Figura 1.4. Cambios en la energía libre entre enzimas provenientes de microorganismos psicrófilos (azul) y mesófilos (rojo). La diferencia entre las energías libres de reacción entre estas enzimas se debe a la disminución de entalpía del complejo enzima psicrófila-sustrato (ES_P) en comparación a la enzima mesófila (ES_M) y aumento de entropía. (Extraído de Santiago, et al., 2016).

La entalpía disminuye disminuyendo las interacciones proteína-sustrato que deben romperse para llegar al estado de transición (disminuyendo la energía de activación, reflejado en la diferencia entre las energías de E_M y E_P) y la entropía compensa esta variación a partir del aumento en la flexibilidad en regiones de la proteína que cubren el sitio activo, u otras variaciones relativas a la flexibilidad proteica. Estos dos efectos se logran como consecuencia de los cambios antes mencionados en la secuencia aminoacídica responsable de interacciones que deben romperse y reordenar en el proceso (Gerday, 2013). A expensas de esta disminución en entalpía las enzimas activas en frío aumentan su K_{cat} . A su vez, estos cambios causan menor afinidad de unión al sustrato que, como se menciona anteriormente, afecta la K_m enzimática (Santiago, et al., 2016).

En conclusión, la base de la eficiencia enzimática que estas enzimas exhiben es a causa de sus adaptaciones en su estructura primaria, secundaria y terciaria. Estas, conllevan a una disminución en entalpía debido a la reducción de interacciones proteína-sustrato, y aumento de la entropía

debido a variaciones en su estabilidad y flexibilidad global. En conjunto, estas compensaciones varían la energía libre del proceso que conduce a mayor K_{cat} y menor K_m , es decir mayor eficiencia catalítica.

Las lipasas y esterasas activas en frío presentan las adaptaciones típicas de enzimas con las mismas características mencionadas anteriormente: menor contenido de arginina en comparación a lisina, menor contenido de prolina y de residuos aromáticos, mayor contenido de glicina, centro hidrofóbico débil y menores interacciones de tipo puentes salinos. En conjunto, estas características permiten mantener su flexibilidad y baja energía de activación lo que permite su uso como herramientas industriales y biotecnológicas.

1.7 Continente antártico como fuente de lipasas/esterasas activas en frío

La gran mayoría de la superficie y atmósfera terrestre (85%) se encuentra en condiciones permanentes de frío ($< 5^{\circ}\text{C}$), siendo entornos que albergan microorganismos psicrófilos (Mhetras, *et al.*, 2021).

El continente antártico presenta las condiciones climáticas para dar lugar a la diversidad y la capacidad metabólica de las comunidades microbianas marinas y continentales psicrófilas. Se han detectado allí microorganismos en todos los hábitats incluyendo lagos, ríos, rocas y sedimentos, siendo parte importante de muchos ecosistemas y jugando un papel importante en las cadenas alimentarias, los ciclos biogeoquímicos y la mineralización de contaminantes (Lamilla *et al.*, 2017).

A pesar del difícil acceso a este ambiente extremo, el número de publicaciones sobre estudio de biodiversidad o bioprospección de microorganismos habitantes de este nicho ha aumentado significativamente en la última década (Correa & Abreu, 2020).

Los ecosistemas antárticos son una gran fuente para aislamientos de microorganismos psicrófilos, siendo de gran valor como reserva científica y repositorio de potenciales productos biotecnológicos.

Este trabajo planteó desarrollar la búsqueda y selección de microorganismos productores de lipasas y esterasas adaptadas a bajas temperaturas a partir de aislamientos bacterianos obtenidos de muestras de suelo provenientes de la Isla Rey Jorge. Posteriormente se llevó a cabo un relevamiento de la actividad enzimática a diferentes condiciones de pH y temperatura para las

muestras con mayor potencial con el objetivo de evaluar su termoestabilidad y sensibilidad a los cambios de pH.

2. OBJETIVOS

2.1 General

El objetivo de este trabajo fue la búsqueda, aislamiento e identificación de microorganismos con actividad lipolítica y esterasa que resulten prometedoras para su uso biotecnológico, a partir de muestras de suelo provenientes de la Isla Rey Jorge, Antártida.

2.2 Específicos

- Clasificación de cepas en grupos según caracterización morfológica y perfiles obtenidos por medio de TP RAPD PCR.
- Cribado preliminar de cepas con mayor actividad enzimática.
- Evaluación de la estabilidad de las enzimas frente a la variación de pH y temperatura, mediante el uso de herramientas estadísticas.
- Identificación a nivel de género de cepas seleccionadas mediante secuenciación de subunidad ribosomal 16S

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Origen de las muestras

Las muestras de trabajo, se trataron de cultivos mixtos, provenientes del cepario del Departamento de Bioingeniería, Instituto de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, UdelAR. El mismo cuenta con numerosas cepas antárticas catalogadas como productoras de lipasas, provenientes de campañas realizadas a la Isla Rey Jorge, Antártida, con el apoyo del Instituto Antártico Uruguayo.

3.2 Aislamiento y Clasificación

La reconstitución de las cepas de cultivos mixtos, guardadas en glicerol a -80°C, se realizó en TSA (*Tryptone Soya Agar* por sus siglas en inglés) y en R2A, realizando el aislamiento bacteriano mediante el uso de técnica de estriado.

Luego de aisladas, las cepas fueron clasificadas en grupos de acuerdo a la morfología de su colonia, observando en lupa, siguiendo las recomendaciones para la descripción morfológica de colonias de la American Society for Microbiology (Breakwell, D., 2007). También se observaron las características morfológicas celulares mediante observación al microscopio. Para ello se realizó tinción de Gram, siendo clasificadas en función de sus características de pared y forma.

3.3 Extracción ADN

Para continuar con el cribado a nivel molecular de las cepas de trabajo se extrajo el ADN de las mismas mediante DNA miniprep kit (ZYMO research), siguiendo el protocolo del fabricante.

3.4 Fingerprinting mediante TP RAPD PCR

De manera de descartar cepas repetidas y disminuir el número de cepas de trabajo, se llevó adelante la técnica de fingerprinting TP RAPD PCR (*two primers random amplified polymorphic DNA PCR*). Mediante la cual cada cepa presenta un patrón de bandas de amplicones característico que permite diferenciar microorganismos a nivel de cepa (Rivas, *et al.*, 2001).

Para la amplificación se utilizó un mix compuesto de: 2U Mango Taq Polimerasa, 5µl de solución buffer, MgCl₂ (2,5 mM), dNTPS (0.2mM), cebadores (3 µM) 879F (5'-GCCTGGGGAGTACGGCCGCA-3') y 1522R (5'-AAGGAGGTGATCCANCCRCA-3'), 4 µl de solución 1/50 de ADN genómico y agua para llevar a volumen final de 25 µl.

Se utilizó el siguiente programa de PCR (Adaptación de Rivas, *et al.*, 2001)

Programa amplificación TP RAPD PCR		
Temperatura	Tiempo	Ciclos
95°C	3 min	1
94°C	45 seg	35
50°C	45 seg	
70°C	90 seg	
72°C	7 min	1

Se observaron los patrones de bandas mediante corridas electroforéticas en geles de agarosa (2%) a con el agregado de 3 µl del agente intercalante Good View®.

3.5 Selección preliminar de cepas con actividad lipolítica o esterasa

Con el objetivo de pre-seleccionar aquellas cepas de trabajo con mayor actividad lipolítica y/o esterasa, se hace un primer cribado de las diferentes cepas. Éstas son inoculadas en medios sólidos con tween 80 o tributirina como fuentes de carbono, a modo de detectar actividad esterasa o lipolítica respectivamente. La detección de actividad enzimática extracelular se basa en la formación de halo o precipitado alrededor de las colonias a causa de la difusión de proteínas que hidrolizan el sustrato.

Para esto, se utilizaron los siguientes medios de cultivo:

- Para determinar actividad lipolítica se utilizó un medio con la siguiente composición: Tributirina 10 g/L; extracto de levadura 3 g/L; peptona 5 g/L; agar 20 g/L. La formación de un halo claro alrededor de las colonias, indica la ruptura de la emulsión revelando actividad lipolítica (Ronald, *et al.*, 2000).

Para determinar la actividad esterasa se utilizaron dos medios diferentes con la siguiente composición:

1. Medio para actividad esterasa (Mest, Tween Esterase Test Agar Base), con la siguiente composición: Tween 80 10 mL/L; peptona 10 g/L; NaCl 5 g/L; CaCl₂ anhidro 0.1 g/L; agar 15 g/L. La hidrólisis de Tween 80 lleva a la precipitación de la sal CaCl₂ lo que lleva a formación de un halo de precipitación (que varía en extensión de halo así como en el grado de precipitación) que evidencia la hidrólisis del sustrato.
2. MT80, de composición: peptona 10 g/L; NaCl 5 g/L; CaCl₂·2H₂O 0.1 g/L; púrpura de bromocresol 25 mg/L; agar 15 g/L. Este medio presenta el mismo principio que Mest, pero con la presencia del indicador púrpura de bromocresol que indica variación en pH.

Mediante medida periódica de los diámetros de los halos, se seleccionaron aquellas cepas que presentaron mayor relación entre el diámetro total de la colonia sobre diámetro del halo en cultivos en placa crecidos a 4 y 20 °C durante 14 días.

3.6 Identificación a nivel de género de las cepas

Se identificaron las cepas seleccionadas a nivel de género mediante secuenciación de la subunidad ribosomal 16S, utilizando el servicio de secuenciación de MACROGEN INK.

Para ello se amplificó el gen de interés utilizando el ADN extraído y purificado en pasos anteriores como molde. El mix de PCR consistió en: 5 µL de solución buffer, MgCl₂ (50 mM), dNTPS (2 mM), Primers universales (20 µM) 27F y 1492R, Mango Taq Polimerasa (5U/ µL), 8 µL de solución 1/50 de ADN y agua suficiente como para llegar a un volumen final de 25 µL.

Luego se prosigue con la reacción de PCR (Programa en [Anexo 7.3](#)) y se confirma la amplificación mediante corrida electroforética en gel de agarosa al 1%.

Para el análisis bioinformático de las secuencias se utilizó el elemento CLUSTALW (Thompson *et al.*, 1994), del programa MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2016). Las secuencias ensambladas de ADN fueron posteriormente analizadas en BLASTn (Altschul *et al.*, 1990) y comparadas con las secuencias del gen 16S ARNr de la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

3.7 Ensayos de actividad enzimática

La cuantificación de la actividad enzimática se realizó a través de ensayos espectrofotométricos con p-nitrofenil palmitato (pNPP) y p-nitrofenil butirato (pNPB) como sustratos para actividad lipolítica y esterasa respectivamente. Se determina la actividad enzimática a partir del seguimiento de absorbancia del p-nitrofenol liberado medido a 410 nm. Una unidad enzimática (U) se define como cantidad de sustrato convertida en p-nitrofenol por minuto, bajo las condiciones de estudio.

El objetivo de este ensayo fue evaluar pH y temperatura óptimos para las enzimas seleccionadas. Para ello se trabajó con un diseño compuesto central ([Anexo 7.4](#)), una forma de diseño experimental donde se definen variables de entrada que afectan de alguna forma la respuesta final. En este caso las variables de entrada fueron temperatura y pH y las respuestas actividad enzimática como U/ml y concentración total de proteínas en mg/mL. El fin es obtener una superficie de respuesta y determinar la combinación óptima de variables que permitan la máxima actividad enzimática. Se generaron siete combinaciones de estas variables, detalladas en el Anexo 7.4.

A partir de este diseño se obtuvieron las superficies de respuesta que explican los modelos.

3.7.1 Producción de enzimas en medio líquido

Desarrollo de inóculo: Para el desarrollo de inóculo se llevó a cabo la suspensión de una colonia de la cepa de trabajo en medio de cultivo TSB (Tryptic Soy Broth). Se utilizó un volumen de trabajo de 30 mL en matraces de 125 mL. Las condiciones del preinóculo fueron de agitación orbital de 200 rpm a 20°C, durante 24 horas.

Cultivo para producción de la enzima: Para la producción de las enzimas de estudio se utilizó como referencia el medio de cultivo utilizado por Babu, *et al.*, 2006 y Jadhav, *et al.*, 2013, el cual consiste en: peptona (30 g/L), extracto de levadura (5 g/L), NaCl (5 g/L), tributirina o tween 80

(10 g/L aprox. 10 mL/L) para lipasas o esterases respectivamente. El desarrollo del cultivo se llevó a cabo mediante el agregado de 5 mL del preinóculo en 100 mL de medio en matraces de 500 mL. Las condiciones de cultivo fueron de agitación orbital a 200 rpm, 20°C a pH 7 durante 7 días. Para los ensayos de actividad enzimática se utilizó el sobrenadante, a tiempo final, obtenido luego de centrifugar el cultivo a 6000 rpm durante 15 min a 4°C.

3.7.2 Determinación de actividad lipolítica

Para el ensayo se utilizó un mix compuesto de 1 mL de buffer correspondiente (citrate pH 5, Fosfato pH 7 y carbonato-bicarbonato pH 9), 0.9 mL de solución de sustrato pNPP (2 mg/mL) disuelto en 200 μ L Tritón-X/mL de isopropanol para prevenir los problemas de emulsificación del pNPP y 0.1 mL de la enzima correspondiente.

Para el control positivo se utilizó como enzima lipasa pancreática Sigma-Aldrich en concentración de 2 mg/mL (Control +). Se usaron también diferentes blancos para eliminar de la medida final las interferencias dadas por cada compuesto y así solo cuantificar la variación en la absorbancia provocada por la liberación de producto por la enzima de estudio:

- Blanco del sustrato (B_S): 1.1 mL de buffer y 0.9 mL de sustrato.
- Blanco del buffer (B_B): 2 mL de buffer.
- Blanco de la enzima (B_E): 1.9 mL de buffer y 0.1 mL de enzima.

Se incubó la enzima a caracterizar, así como los blancos y el control positivo por triplicado en cada condición de temperaturas y pH correspondientes (Tabla 3.2), durante 60 min y se detuvo la reacción mediante la desnaturalización de la enzima incubando a 100°C durante 5 min.

Se determina la actividad enzimática a partir del seguimiento de absorbancia del p-nitrofenol liberado medido a 410 nm.

3.7.3 Determinación de actividad esterasa

Para el ensayo se utiliza un mix compuesto de 860 μ L de buffer correspondiente (citrate pH 5, Fosfato pH 7 y carbonato-bicarbonato pH 9), 40 μ L de solución de sustrato p-NPB (25 mM) disuelto en isopropanol y 100 μ L de la enzima correspondiente.

Para el control positivo se utilizó como enzima lipasa pancreática Sigma-Aldrich en concentración de 2 mg/mL (Control +). Se usaron los mismos blancos que para el ensayo

anterior pero sustituyendo en el caso del blanco del sustrato por el volumen correspondiente de p-NPB.

Se incubó la enzima a caracterizar, así como los blancos y el control positivo por triplicado en cada condición de temperaturas y pH correspondientes (Tabla 3.2) durante 60 min y se detuvo la reacción mediante agregado de 100 μ L de NaOH 5M.

Se determina la actividad enzimática a partir del seguimiento de absorbancia del p-nitrofenol liberado, medido a 410 nm.

Tabla 3.1. Condiciones de trabajo para ensayo actividad lipasa y esterasa.

Tubo	Condiciones	Tubo	Condiciones
13	Blanco S ₁ (pH 5, 10 °C)	1	Cepa, pH 5, 40 °C
14	Blanco S ₂ (pH 9, 10 °C)	2	Cepa, pH 9, 40 °C
15	Blanco B ₁ (pH 5, 10 °C)	3	Blanco E ₁ (pH 5, 40 °C)
16	Blanco B ₂ (pH 9, 10 °C)	4	Blanco E ₂ (pH 9, 40 °C)
17	Cepa, pH 7, 25 °C (A)	5	Blanco S ₁ (pH 5, 40 °C)
18	Cepa, pH 7, 25 °C (B)	6	Blanco S ₂ (pH 9, 40 °C)
19	Cepa, pH 7, 25 °C (C)	7	Blanco B ₁ (pH 5, 40 °C)
20	Control + pH7, 25 °C	8	Blanco B ₂ (pH 9, 40 °C)
21	Blanco E (pH 7, 25 °C)	9	Cepa, pH 5, 10 °C
22	Blanco S (pH 7, 25 °C)	10	Cepa, pH 9, 10 °C
23	Blanco Buffer (pH 7, 25 °C)	11	Blanco E ₁ (pH 5, 10 °C)
		12	Blanco E ₂ (pH 9, 10 °C)

3.7.4 Cuantificación proteica

Para determinar la cantidad de proteína producida se utilizó la técnica de Bradford sobre el sobrenadante del cultivo.

Este ensayo colorimétrico se basa en el cambio diferencial en color del reactivo “Coomassie Brilliant Blue G-250” a pH ácido debido a la generación de un complejo de unión entre el colorante y los aminoácidos que componen proteínas. El máximo de absorbancia de este colorante varía de 465 a 595 nm de unirse a proteínas, y la absorbancia de este complejo varía en relación a la concentración proteica. De manera que este método permite de forma rápida y sencilla determinar concentración proteica (Bradford, 1976).

El coeficiente de extinción de una solución de complejo unión colorante-albúmina bovina es constante en un rango de concentración amplio. Por tanto, es posible cuantificar proteínas, a partir de normalizar medidas de absorbancia en relación a una curva de calibración de diferentes

concentraciones de albúmina bovina (BSA). Para ello se realizó una curva de calibración con las siguientes concentraciones de BSA: 1, 0.85, 0.7, 0.5, 0.35, 0.25, 0.15, 0.12, 0.1, 0.08, 0.05 mg/mL y diluciones de las muestras a medir (diferentes para cada caso por la amplia variación de concentraciones entre muestras). La medida se realizó agregando 100 μ L de cada punto de la curva de calibración y de las diluciones de las muestras con 1 mL de reactivo de Bradford, y midiendo su absorbancia a 595 nm.

La preparación del reactivo de Bradford (100 mL) consiste en: 10 mg de azul de Coomassie G-250, 10 mL de ácido fosfórico al 88% y 4.7 mL de etanol absoluto llevado hasta 100 mL en un matraz aforado con agua miliQ.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Clasificación y caracterización morfológica

A partir de los cultivos mixtos provenientes de muestras de suelo se obtuvieron 64 aislamientos. Estos, fueron divididos en 8 grupos de acuerdo a su morfología de colonia aislada y observación de morfología según tinción Gram ([Anexo 8.1](#)).

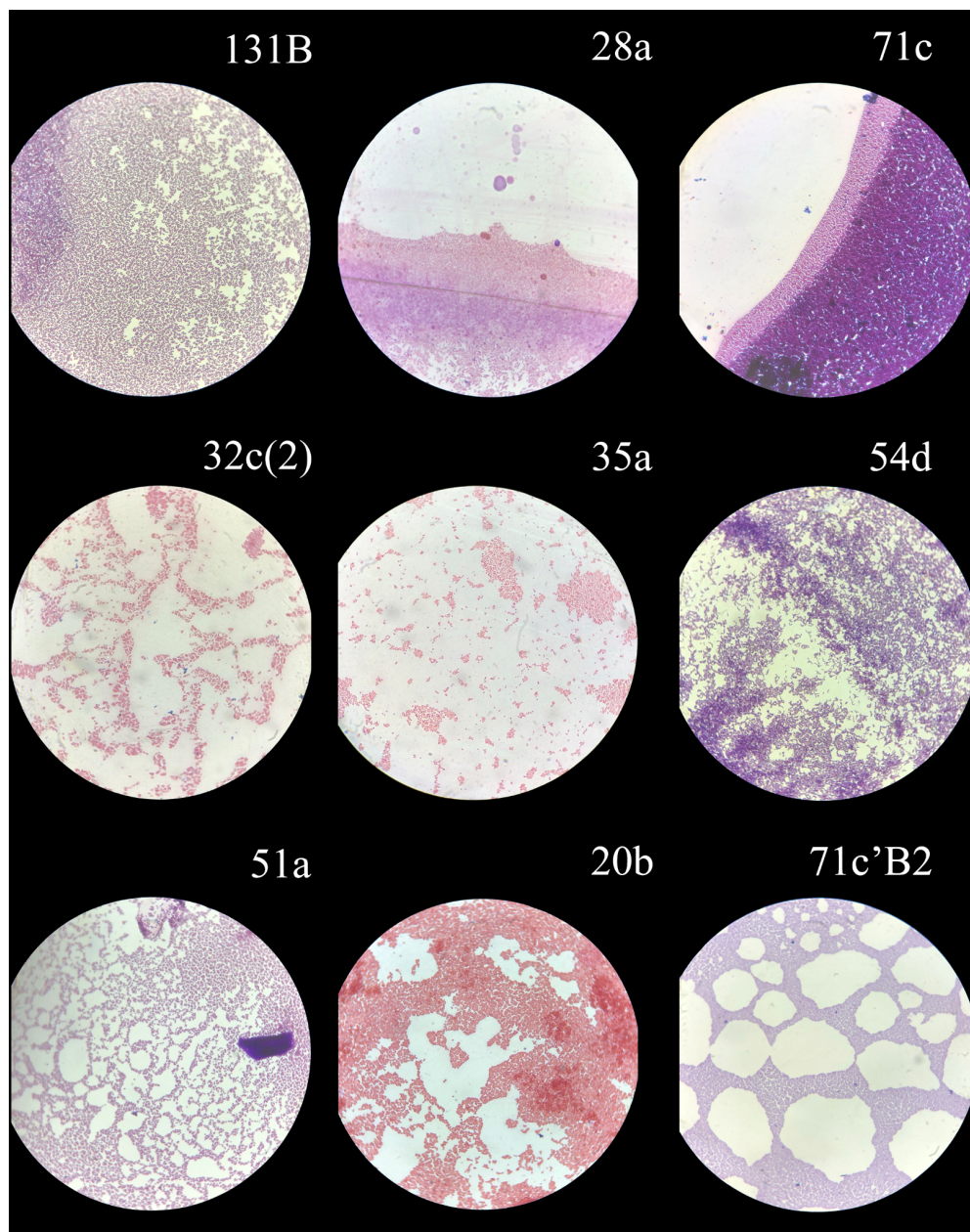


Figura 4.1 Observaciones de tinciones de gram de algunas cepas de trabajo en microscopio óptico. 131B bacilos gram (-); 28b bacilos gram (+); 71c cocos gram (+); 32c(2) cocobacilos gram (-); 35a cocos gram (-); 54d cocobacilos gram (+); 51a cocos gram (+); 20b cocobacilos gram (-); 71c'B2 cocos gram (+).

Una vez clasificadas las cepas en los 8 grupos primarios de acuerdo a la morfología de la colonia y tinción de Gram, se continuó con la técnica TP-RAPD PCR. El objetivo inicial de este procedimiento fue detectar aquellas cepas que se encontraran repetidas, de manera de disminuir el número de cepas de trabajo. Este método -descrito por Rivas, *et al.*, 2001- se basa en la obtención de *fingerprinting* propios de cada microorganismo y permite diferenciarlos a nivel de cepa. Este, es un método ampliamente utilizado en varias áreas como taxonomía bacteriana, estudios ecológicos y detección de nuevas especies bacterianas (Sakmanoglu, *et al.*, 2019).

La **Figura 4.2** muestra los patrones de bandas propios de cada grupo morfológico mencionado en el punto anterior. De estos resultados se observa que en los grupos I, III, IV y V existen aislamientos con patrones idénticos de bandas indicando que se trata de las mismas cepas. Por lo que de 64 cepas iniciales, 9 presentaron patrones de bandas repetidos, lo que permitió disminuir el número de cepas de trabajo a 59. De esta forma, se redujo el total de las cepas de estudio en un 7.8%. Estos resultados reflejan la amplia variedad de microorganismos psicrotolerantes con potenciales aplicaciones biotecnológicas, provenientes de muestras de suelo del ecosistema antártico.

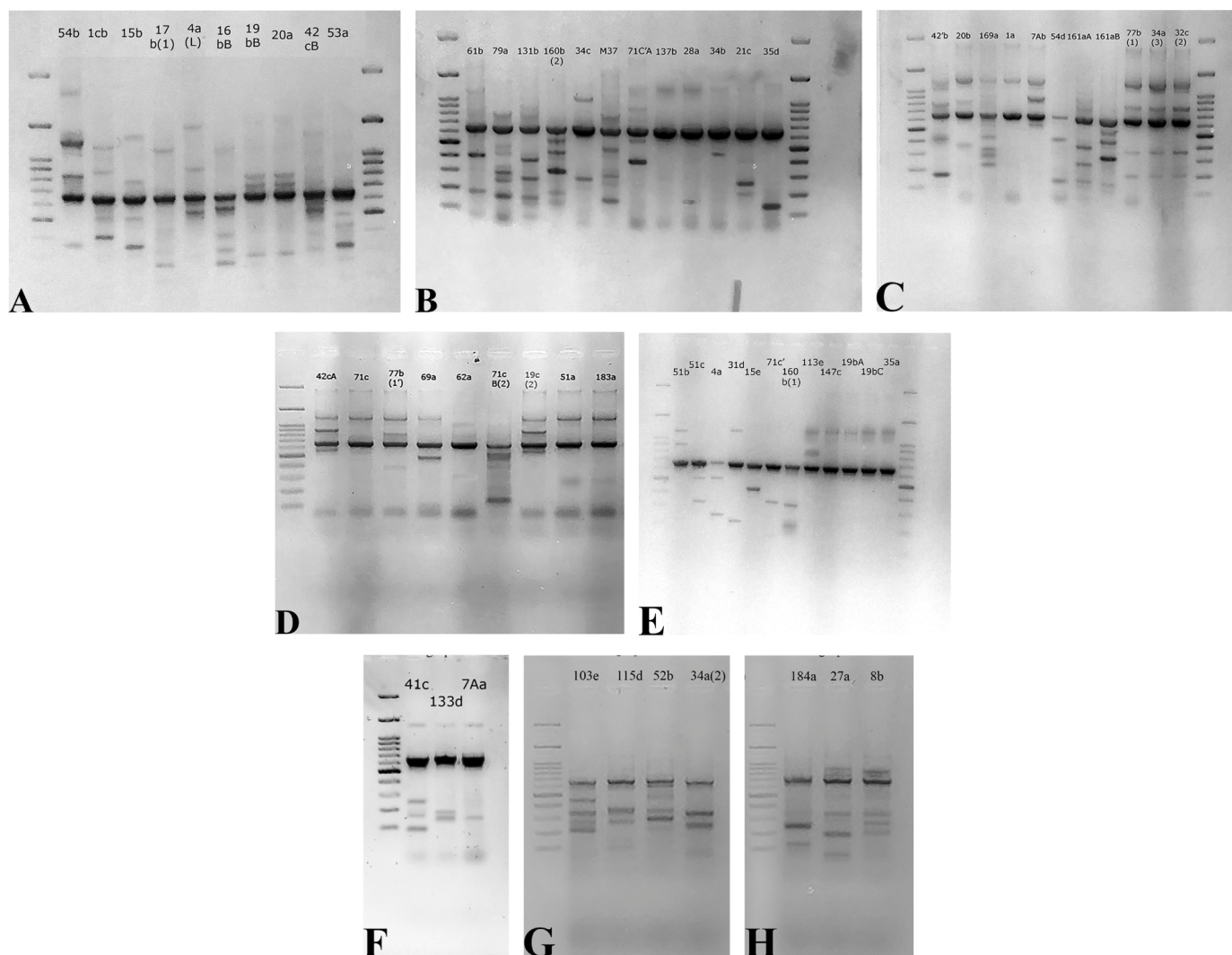


Figura 4.2 Perfiles de bandas de TP RAPD PCR en geles de agarosa al 2%. Puede observarse como aquellas cepas iguales presentan el mismo patrón de bandas. (A: cepas 19bB y 20a; C: cepas 77b (1), 34a (3) y 32c (2) y D: por un lado las cepas 51a y 183a y por otra parte las cepas 42cA y 19C (2)).

4.2 Bioprospección de bacterias con actividad lipolítica o esterasa

Se cultivaron las cepas de trabajo en medios de cultivo diferenciales, en los cuales se puede observar la presencia de actividad enzimática extracelular lipolítica o esterasa mediante la formación de halos alrededor de las colonias. El procedimiento consistió en la ejecución de medidas del diámetro de dichos halos generados por la hidrólisis de los sustratos - tributirina o Tween 80 respectivamente- y al diámetro de de cada colonia a los 7 y 14 días de incubación, a temperaturas de 4°C y 20°C. Para la selección de las cepas se consideraron únicamente las

medidas a los 14 días de incubación en el medio, debido a las diferencias en las velocidades de crecimiento entre los cultivos.

Este método es principalmente utilizado para determinar de forma cualitativa la presencia de bacterias con actividades lipolíticas y/o esterasas en función de su capacidad para hidrolizar los lípidos incorporados en medios sólidos, formando una zona clara de lipólisis (Lanka & Latha, 2015), o precipitado de sales en el caso de los medios con CaCl_2 para actividad esterasa. Otros métodos de detección en medios sólidos son utilizados, basándose en el mismo principio de detección de lípidos hidrolizados, como el uso de emulsiones de aceite de oliva-rodamina en agar, aunque este último presenta la desventaja de detectar hidrólisis no enzimática, lo que reduce la sensibilidad del ensayo, sobreestimando la capacidad lipolítica de los microorganismos (Jahn *et al.*, 2020). Estos ensayos semicuantitativos de selección siguen siendo hoy en día ampliamente utilizados para evaluar lipasas de diversos entornos (Hamid *et al.*, 2021; Ilesanmi *et al.*, 2020; Zhao *et al.*, 2021). Otra de las ventajas de los medios de cultivo utilizados en este trabajo es la reducción del costo de detección y protección de los microorganismos a los efectos inhibidores de varios colorantes indicadores (Lanka & Latha 2015).

Teniendo en cuenta las cepas repetidas vistas anteriormente, se descartaron 5 cepas por encontrarse repetidas. De las 59 cepas restantes, se continuó con 49 cepas diferentes de trabajo. De estas cepas, solo una no presentó crecimiento en ningún medio y 11 no presentaron ningún tipo de actividad. De las 37 cepas con actividad, 45.9% presentaron exclusivamente actividad lipolítica en cualquier condición, 13.5% únicamente actividad esterasa y 40.5% ambas actividades a cualquier condición. Dentro de las cepas con actividad lipolítica, 8 cepas presentaron actividad solo a 4 °C, 8 cepas solo a 20 °C y 16 cepas a ambas temperaturas. En lo que refiere a la actividad esterasa, 10 cepas presentaron actividad a 20 °C y 10 cepas presentaron actividad 4 y 20 °C.

En la **Figura 4.3** se presenta la distribución de las cepas de acuerdo a su relación entre el diámetro total (diámetro del halo sumado al diámetro de la colonia, D_T) y el diámetro de la colonia (D_C) para las temperaturas estudiadas. Estas medidas fueron realizadas con el objetivo de tener una aproximación semicuantitativa de sus actividades hidrolíticas y de esta forma identificar aquellas cepas con rendimientos más atractivos. Se analizó la totalidad de las cepas para cada condición.

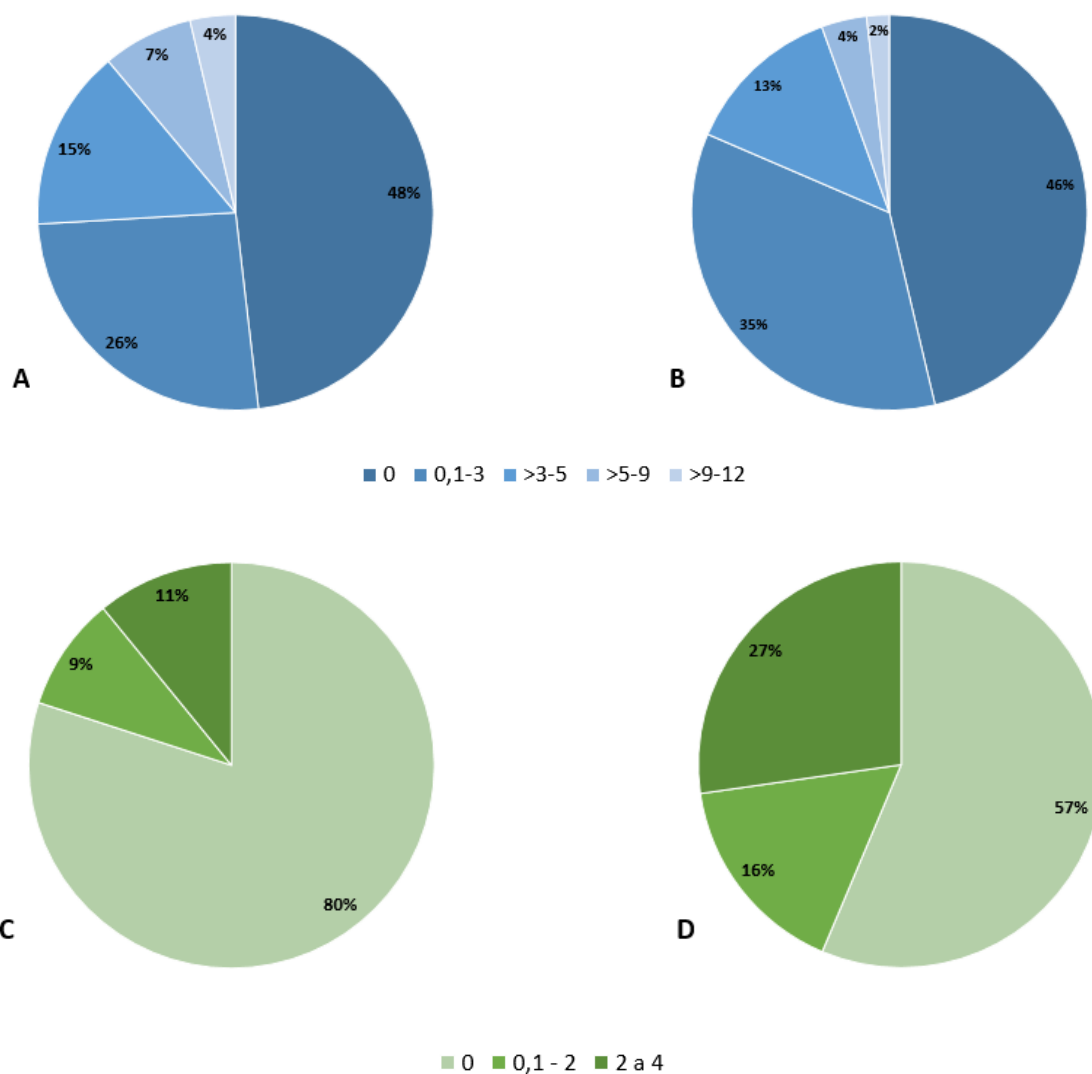


Figura. 4.3. Distribución de cepas según el factor D_T/D_C para: **A**, actividad lipolítica a 4°C; **B**, actividad lipolítica a 20°C; **C**, actividad esterasa a 4°C y **D**, actividad esterasa a 20°C.

Se seleccionaron aquellas cepas con mayor relación D_T/D_C a los 14 días de incubación: cuatro con actividad lipolítica y 5 con actividad esterasa. Dichas cepas corresponden a 19C(2), 51a, 103e y 20B en el caso de las cepas con actividad lipolítica y 169a, 35a, 27a, 147a y 71c'A a las cepas con actividad esterasa. Las medidas tomadas se encuentran en el [Anexo 7.2](#), **Tabla 7.2**. En el caso de las cepas con actividad esterasa, se tomó también como criterio de evaluación la intensidad del precipitado formado por los ácidos grasos liberados mediante hidrólisis, que se unen al calcio en el medio para formar cristales insolubles.

Para la selección de las cepas con actividad lipolítica, se optó por aquellas con valores más elevados de D_T/D_C . En el caso de 103e y 20B, si bien existen varias cepas con D_T/D_C comparables, 103e presentó actividad en ambas temperaturas y en el caso de 20B, presentó el D_T/D_C más elevado a 20 °C. En el caso de las cepas con actividad esterasa, si bien muchas de ellas tuvieron valores de D_C/D_T similares, se consideró la intensidad de formación de precipitado como otro criterio de selección. En la **Figura 4.4**, se presentan fotos de los halos característicos evaluados para actividad lipolítica y esterasa.

Tabla 4.1 Cepas seleccionadas y sus medidas D_T/D_{cel}

LIPASAS			ESTERASAS		
	4°C	20°C		4°C	20°C
Cepas	Relación D_T/D_{cel}	Relación D_T/D_{cel}	Cepas	Relación D_T/D_{cel}	Relación D_T/D_{cel}
19c(2)	8	7,8	169a	4	2,3
51a	10	4,2	35a	1,7	2,9
103e	4	3	27a	3,5	3,3
20B	3	10	147c	2	3,2
			71c`A	---	2,7

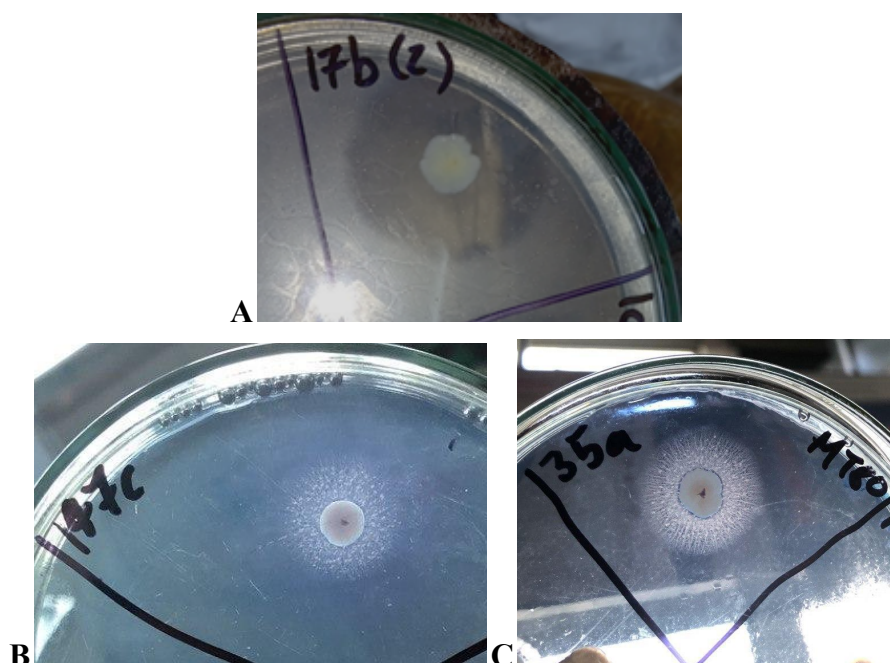


Figura 4.4. Fotografías de cepas en medio TBA (A) y Mest (B y C). Se puede observar el halo claro de hidrólisis característico de actividad lipolítica en TBA, y el precipitado de $CaCl_2$ alrededor de las colonias en medio Mest, correspondiente a la presencia de actividad esterasa.

4.3 Evaluación del potencial biotecnológico de las enzimas de estudio en términos de estabilidad frente a cambios de pH y temperatura

El potencial biotecnológico de una enzima puede evaluarse teniendo en cuenta diferentes parámetros entre los que se destacan, mantener estabilidad y actividad en amplios rangos de temperatura y pH, ser estables en medios no acuosos, hidrolizar un amplio rango de posibles sustratos, entre otros. En este trabajo, como una primera aproximación, se evaluó la estabilidad de las enzimas producidas por las cepas seleccionadas anteriormente frente a un amplio rango de temperaturas y pH.

Con el fin de conocer el desempeño de las enzimas en un rango amplio de temperaturas (10-40°C) y pH (5-9), se llevó a cabo el ensayo de determinación de actividad en base a hidrólisis de los sustratos pNPP y pNPB a pNP -para las actividades lipolítica y esterasa respectivamente- a partir de los sobrenadantes obtenidos de los cultivos. Con este objetivo, se utilizó como estrategia el uso de un diseño estadístico de superficie de respuesta (RSM del inglés Response Surface Methodology) que permite estudiar un amplio rango de condiciones, minimizando el número de ensayos. Esta metodología consiste en un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas que permite encontrar las condiciones con mejor desempeño para las respuestas de estudio para un sistema multivariable (Riswanto *et al.*, 2019). El pNP liberado fue cuantificado mediante espectrofotometría a 410 nm, utilizando curvas de calibración correspondiente para cada pH. Estos valores permitieron determinar la actividad enzimática, definiendo una unidad enzimática (U) como la cantidad de sustrato convertida en p-nitrofenol por minuto, bajo las condiciones de estudio.

En la **Figura 4.5**, se muestran los resultados obtenidos para el análisis de las superficies de respuesta, usando el programa de análisis estadístico STATISTICA®, para las enzimas con actividad lipolítica. Tal como se puede apreciar a partir de los gráficos, los efectos de las variables en la respuesta varían según la enzima analizada: la enzima producida por la cepa 19C(2) mostró ser afectada en su respuesta de actividad (U/ml) por los factores pH y temperatura (°C) de manera negativa (al aumentar cualquiera de estos dos factores, pH o temperatura, la respuesta en actividad de la enzima disminuye). En el caso de la enzima de la cepa 103e se ve afectada negativamente por variaciones en temperatura pero positivamente por el aumento de pH, efecto similar observado para las enzimas de las cepas 51a y 20b

En la **Figura 4.6**, se presentan los resultados para la actividad lipolítica para todas las cepas estudiadas. Tal como se expresó anteriormente a partir de las superficies de respuesta, la cepa 19C(2) disminuye su actividad catalítica al aumentar el pH y temperatura. Al observar el gráfico se aprecia que la actividad a pH 5 a 10 °C es mayor a la obtenida para el punto central (pH 7 a 25 °C) lo cual es concordante con el efecto del aumento de temperatura y pH con el descenso en la actividad. Aun así, la actividad medida en punto central es menor al resultado obtenido a 40 °C pero a pH 5 (mayor temperatura y menor pH). Esto podría parecer como un comportamiento bimodal, ya que si bien en la combinación de condiciones 40 °C pH 5 se ve un marcado descenso de la actividad en comparación al máximo obtenido, aún así es significativo y este no se ajustaría al efecto previsto de las variables. Se podría considerar entonces el efecto de cada variable de manera individual. Precisamente, a partir del análisis estadístico ([Anexo 8.4](#)) se aprecia que el efecto de la temperatura es menos significativo que el de pH, lo cual explicaría porque el aumento en la actividad catalítica a pH 5 a 10 °C comparado al punto central, y la comparación de este último contra la actividad a 40 °C pero a pH 5 se debe al efecto favorecedor del pH ácido. Por otro lado, en términos generales, se observó que la actividad de la enzima proveniente de la cepa 19C(2) es superior a la de las otras cepas para la mayoría de las condiciones. Esto la muestra como una enzima atractiva en términos de estabilidad para las diversas condiciones de trabajo. En lo que refiere a la enzima de la cepa 51a, se observan dos máximos, uno a pH 5 y 40 °C, y otro a pH 9 y 10 °C. Si bien, observando el gráfico de superficie de respuesta para esta cepa, no se aprecian dos máximos marcados, si se observa una curvatura de silla de montar, que podría aproximarse a un comportamiento bimodal. En este caso, ya que los posibles máximos se encuentran en condiciones opuestas del manto, podría indicar que se trata de dos enzimas diferentes con actividad lipolítica. En lo que refiere a la cepa 103e, se puede observar un leve aumento en su actividad al aumentar el pH, con el efecto opuesto de la temperatura. Esto concuerda con los datos observados para el análisis de RSM de dicha cepa. En lo que refiere a la enzima proveniente de la cepa 20b, se observa un máximo a pH 9 a 10 °C, lo que concuerda con el análisis de RSM.

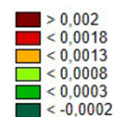
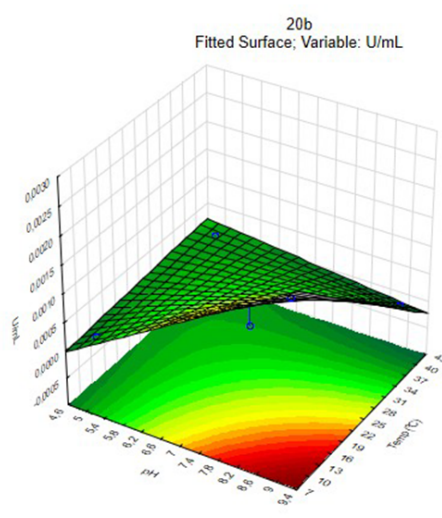
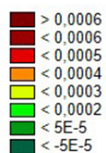
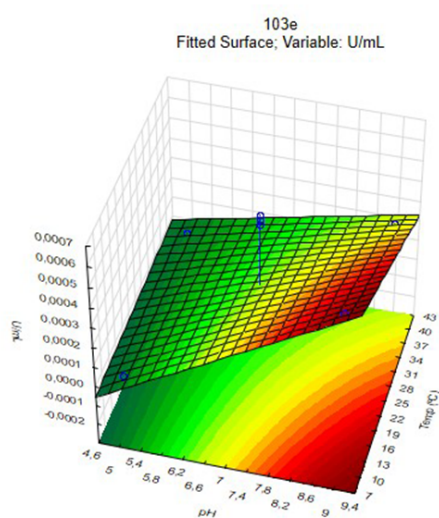
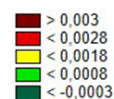
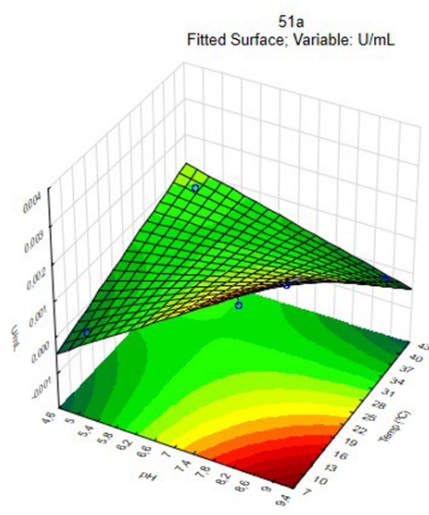
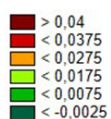
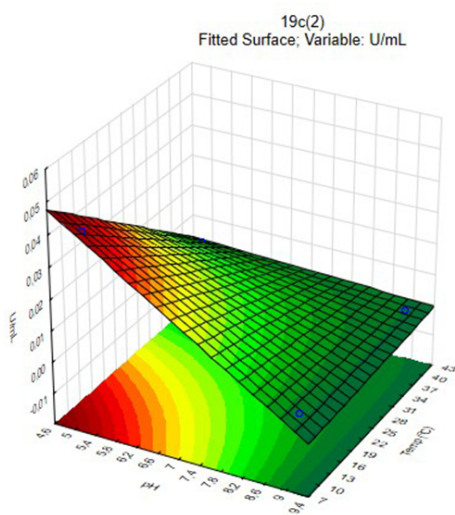


Figura. 4.5 Gráficos de superficie de respuesta para enzimas con actividad lipolítica

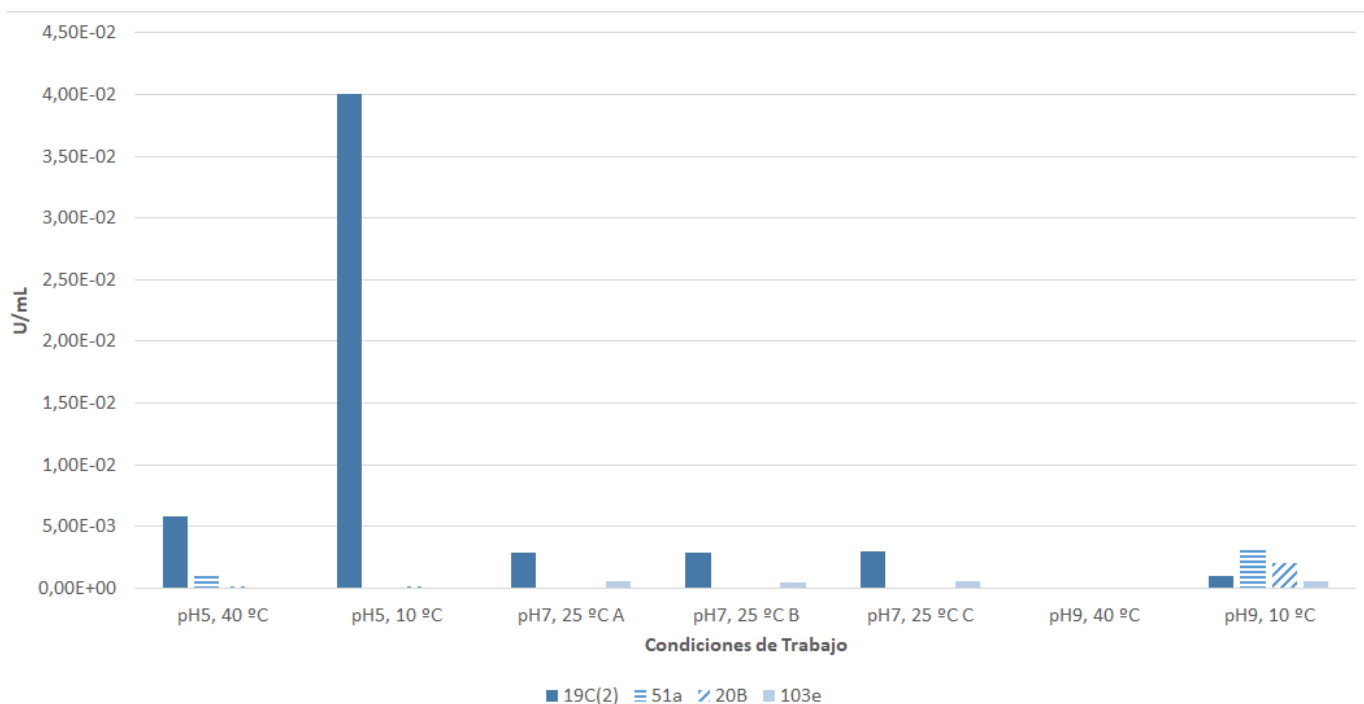


Figura. 4.6 Gráfico de actividad lipolítica en U/mL para las enzimas extracelulares provenientes de las cepas 19C(2), 51a, 103e y 20B, .

En la **Figura 4.7** se observan los gráficos de superficie de respuesta modelado para las enzimas con actividad esterasa. Los resultados de este estudio muestran que, en términos generales, estas enzimas comparten una clara tendencia a ser activas a pH ácido, sin ser afectadas de manera significativa por las fluctuaciones en la temperatura. Se observó que presentan su actividad máxima a valores de pH inferiores a 6, sin mayores efectos vinculados a la variación de la temperatura en el rango de estudio (10 y 40 °C). A su vez, los resultados análisis de regresión de los datos obtenidos a partir de diseño compuesto central ([Anexo 7.4, tabla 7.5](#)), muestran que el pH tiene un efecto negativo en relación a sus actividades enzimáticas, es decir, al aumentar este factor disminuye la actividad. Dentro del mismo análisis, la variable de temperatura no ocasiona efectos en la respuesta de actividad enzimática, lo cual concuerda con la observación anterior. Como excepción a este comportamiento la cepa 71 c'A si bien es estable a pH ácido, solo se registró actividad para este pH a 10 °C y según el modelo solo sería estable a temperaturas menores a 20 °C. Así mismo, en la **Figura 4.8** se observan las medidas obtenidas para cada cepa de estudio en actividad esterasa. Lo que se destaca de esta figura, como se comenta anteriormente, es como todas las medidas significativas se encuentran en las condiciones que implican pH ácido, en este caso pH5. Es importante destacar que todas las cepas

presentan actividades tanto a 10 como a 40. Como se comenta anteriormente - a excepción de la cepa 71 c'A – ninguna cepa presentó efectos significativos en su estabilidad frente a cambios en temperatura, lo que es significa un valor importante al considerar su uso en diversos procesos que involucren cambios de temperatura. La cepa 27a presenta las mayores actividades dentro del grupo de trabajo, seguida por la enzima producida por 169a, 35a y 147c en orden decreciente de actividades.

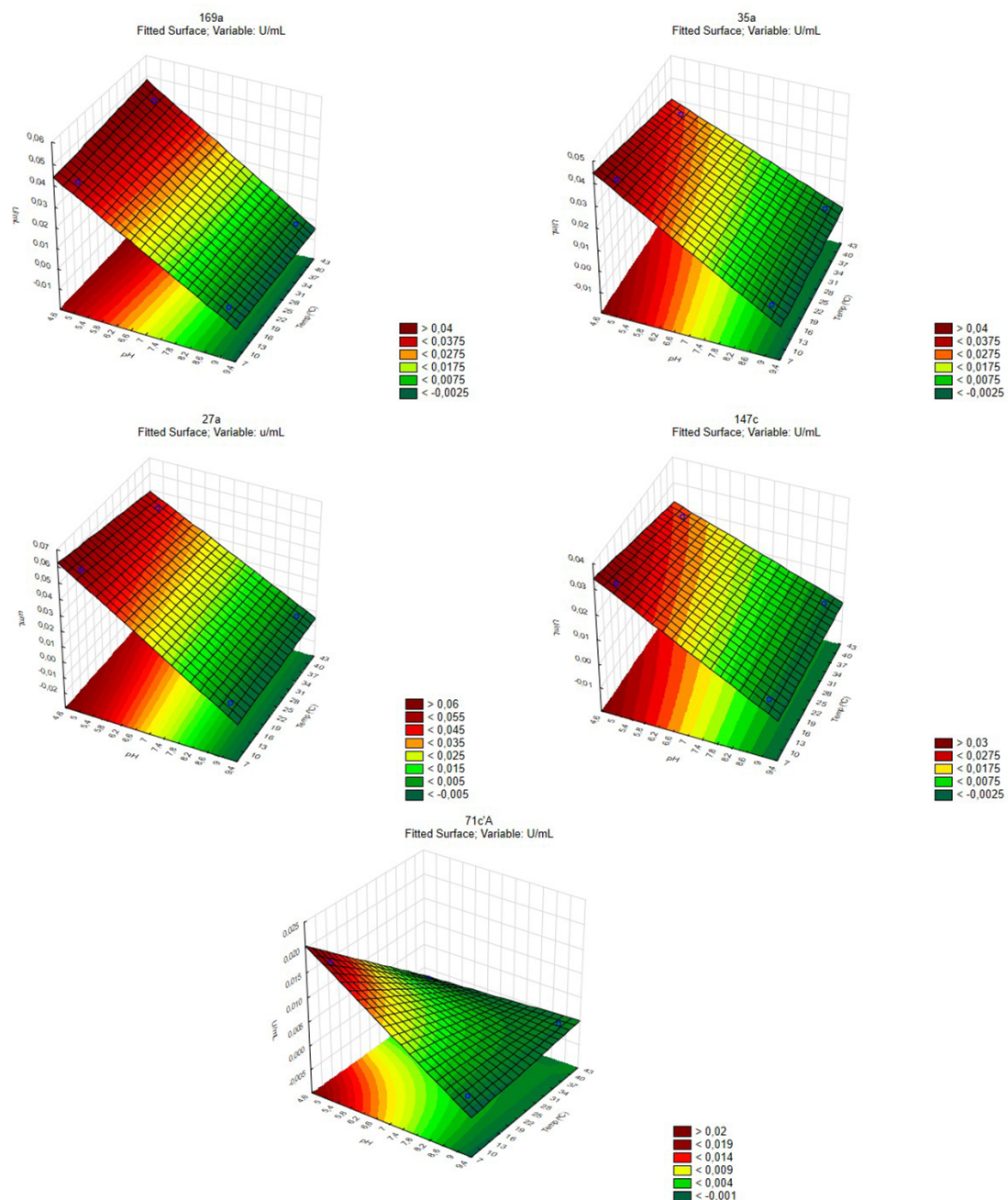


Figura. 4.7 Gráficos de superficie de respuesta para enzimas esterasas

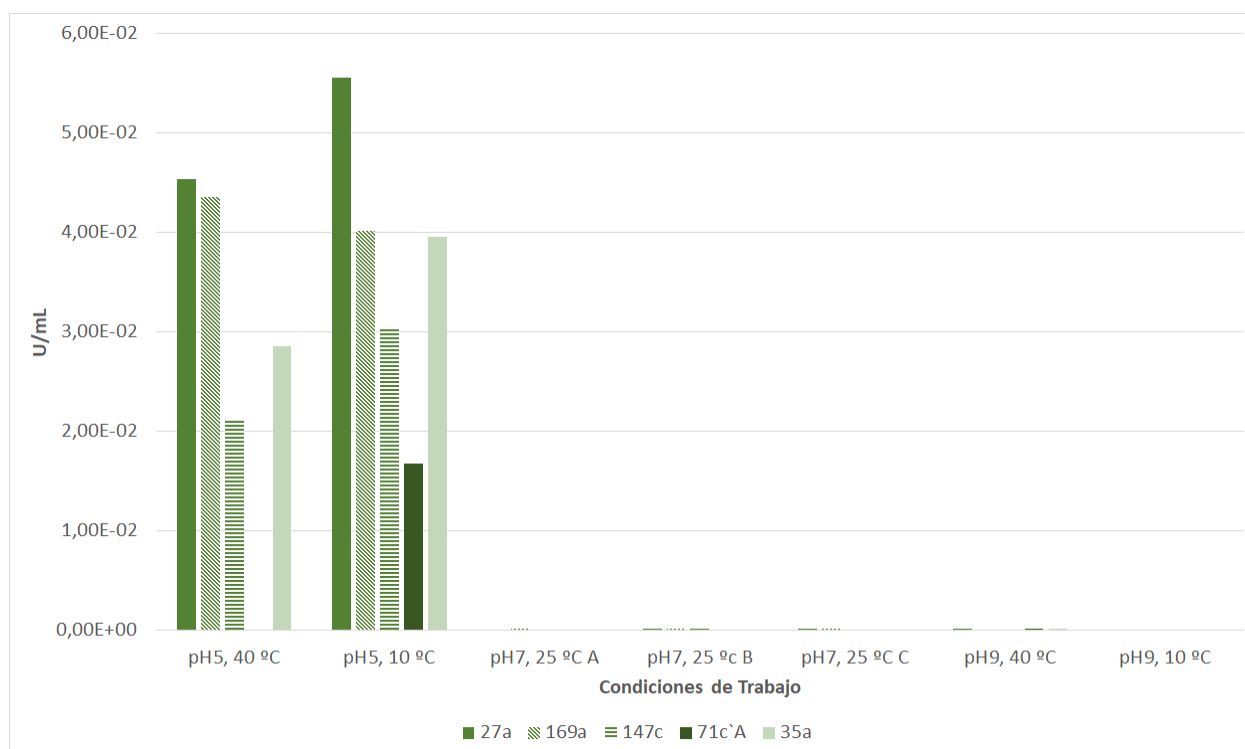


Figura. 4.8 Medidas de actividad enzimática (U/ml) para enzimas esterasas extracelulares.

Así como se evaluaron las actividades hidrolíticas de las cepas, se llevó a cabo un seguimiento de la concentración proteica total mediante técnica de Bradford. Esto permitió observar las diferencias en la producción de proteínas de las distintas cepas, bajo las mismas condiciones de cultivo (pH 7, 20 °C).

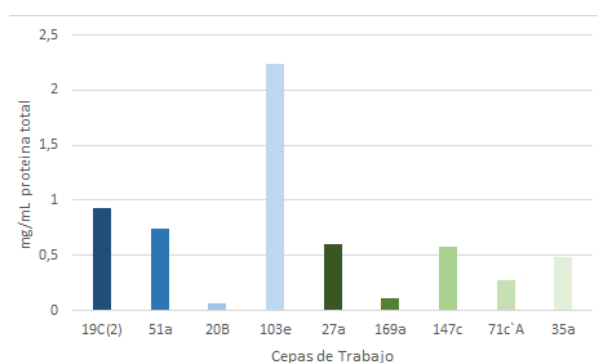


Figura 4.9. Concentraciones proteicas luego de 24 horas de incubación en medio de cultivo TSB a 20°C,

Tal como se observa en el gráfico, la cepa 103e produjo un alto contenido de proteínas extracelulares, en comparación a las demás cepas, sin embargo, sería necesario recurrir a técnicas de separación y purificación proteicas para conocer si esta cantidad de proteína corresponde a la enzima de interés. Por otra parte, la cepa 19C(2), también produjo un alto contenido extracelular de proteínas, lo que refuerza su posible interés biotecnológico.

4.4 Identificación a nivel de género y revisión de literatura

Las cepas de trabajo fueron identificadas a nivel de género a partir de secuenciación del gen mitocondrial 16S. A partir de la comparación con la base de datos de *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), se determinó que las cepas 19C(2), 51a, 20b, 35a y 147c pertenecen al género *Psychrobacter*, la cepa 103e pertenece al género *Arthrobacter*, 169a pertenece al género *Aeromonas*, 27a pertenece al género *Pseudomonas* y la cepa 71 c'A a *Acinetobacter* (Tabla 4.4).

Tabla 4.3 Resultados del alineamiento de secuencias. Las cepas 19Cc (2), 51a, 20b, 35a^a y 147c pertenecen al género *Psychrobacter*; 103e pertenece al género *Arthrobacter*; 169a pertenece al género *Aeromonas*, 27a pertenece al género *Pseudomonas* y la cepa 71 c'A a *Acinetobacter*.

Cepa	Accession number	Descripción	% Identidad
19C(2)	NR_025532.1	<i>Psychrobacter luti</i> strain NF11 16S ribosomal RNA, partial sequence	100
	JX196625.1	<i>Psychrobacter</i> sp. SON-1410 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100
	JX196608.1	<i>Psychrobacter</i> sp. SOD-1308 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100
51a	KX417186.1	<i>Psychrobacter fozii</i> strain 9.22 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100
	LT852770.1	<i>Psychrobacter glaciei</i> partial 16S rRNA gene, isolate KFS_Cu3	100
103e	AJ810894.1	<i>Arthrobacter</i> sp. ON14 partial 16S rRNA gene, isolate ON14	100
	GU062490.1	<i>Arthrobacter</i> sp. KOPRI 25420 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100
	GU062491.1	<i>Arthrobacter</i> sp. KOPRI 25422 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100
20b	AY864640.1	<i>Psychrobacter</i> sp. DVS12C 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100
	AY864643.1	<i>Psychrobacter</i> sp. DVS7b 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100
	AY864645.1	<i>Psychrobacter</i> sp. DVS150R 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100
169a	AB472980.1	<i>Aeromonas</i> sp. KC3 gene for 16S rRNA, partial sequence	100
	FR799758.1	<i>Aeromonas</i> sp. MG-2011-S18 partial 16S rRNA gene, strain MG-2011-S18	100
35a	AF260715.1	<i>Psychrobacter</i> sp. St1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100
	KP745580.1	<i>Psychrobacter fozii</i> strain 43Ls 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100
27a	KY476611.1	<i>Pseudomonas</i> sp. strain JL14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99
	MK577344.1	<i>Pseudomonas</i> sp. strain DZ-03-05-aga 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99
	KX417145.1	<i>Pseudomonas antarctica</i> strain 9.3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99
147c	AY864640.1	<i>Psychrobacter</i> sp. DVS12C 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100
	AY864643.1	<i>Psychrobacter</i> sp. DVS7b 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100
	DQ298407.1	<i>Psychrobacter</i> sp. BJ-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100
71 c'A	EU304251.1	<i>Acinetobacter</i> sp. Hg4-05 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100
	EU545154.1	<i>Acinetobacter</i> sp. BS8Y 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100
	EU373343.1	<i>Acinetobacter</i> sp. HNL08 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100
	FJ373025.1	<i>Acinetobacter lwoffii</i> strain W1-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100

El nombre *Psychrobacter* fue denominado hace más de 30 años por Juni y Heym (1986) para designar un género de bacterias aerobias gram negativas, inmóviles, en forma de bastón, que ha resultado ser uno de los taxones dominantes en ambientes de baja temperatura (Lasek *et al.*, 2016). Se ha informado que los aislamientos se recolectan no solo del hielo, la nieve y los suelos congelados, sino también de animales (incluidos humanos), alimentos y guano (Adhi-Satya 2020; Lasek *et al.*, 2016; Zeng *et al.*, 2016). Sobre producción de lipasas, varios estudios previos determinaron que cepas de *Psychrobacter* pueden producir lipasas y esterases adaptadas al frío (Chen *et al.*, 2011; Koo *et al.*, 2016; Novototskaya-Vlasova *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2018). Sin embargo la producción de estas enzimas a partir del organismo aislado es baja considerando las cantidades requeridas para su uso a escalas industriales, por lo que la mayoría de los trabajos actuales utilizan la enzima de *Psychrobacter* producida mediante expresión heteróloga en organismos huéspedes como *E. coli* (Adhi-Satya 2020; Koo *et al.*, 2016; Zeng *et al.*, 2018).

Estudios previos han informado lipasas de *Psychrobacter* activas en frío con estabilidades variables en pH de 6 a 9 y actividades altas en pH alrededor de 7 a 8 (Zhang *et al.*, 2018). Koo *et al.* reportaron una enzima lipasa proveniente de *Psychrobacter* aislada del mar Chuckchi en el océano Ártico, la cual clonaron y expresaron en *E. Coli*. Sus rangos de trabajo fueron de pH 6.0 a 10.0 y temperatura en el rango de 10 a 70 °C, encontrándose su pH óptimo de 8.0 a 8.5 sin variaciones aparentes en actividad según cambios en temperatura y con preferencia a hidrolizar ácidos grasos de 8°C (Koo *et al.*, 2016). Por otro lado Zhang *et al.*, 2018, identificaron y purificaron una lipasa de *Psychrobacter* proveniente de muestras árticas reportando actividades máximas a una temperatura de 40°C, actividades relativamente altas en pH 8.0 – 10.0 con un óptimo pH de 8.0 y preferencia por sustratos de 12°C o más aunque también demostró actividad hidrolítica hacia ácidos grasos de cadena corta de manera eficiente (Zhang *et al.*, 2018). En el trabajo de Adhi-Satya (2020) se informó de un aislamiento de *Psychrobacter* obtenido a partir de un almacenamiento de pescado en frío de un supermercado en Bogor, Indonesia. Los resultados del ensayo del efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática indicaron que la lipasa recombinante obtenida a partir de esa cepa es una lipasa adaptada al frío, con temperatura de reacción óptima a 30°C y estable en temperaturas entre 10 - 30 °C, activa en el rango de pH 9.0 - 11.0, con una actividad máxima a pH 10 y tasas catalítica más altas contra el sustrato caprilato de p-nitrofenilo (C8) (Adhi-Satya, 2020). En vista de éstos datos bibliográficos, resulta interesante que la mayoría de las enzimas provenientes de las cepas de *Psychrobacter* de este trabajo fueron

activas a valores de pH ácidos, lo cual tiene implicaciones importantes para el desarrollo de su uso para procesos que requieran entornos ácidos como procesamiento de ciertos alimentos, tratamiento de cueros o lanas, o biorremediación en condiciones ácidas (Chandra *et al.*, 2020). Las lipasas y esterasas obtenidas de organismos *Psychrobacter* -como son las cepas **19C(2), 51a, 20b, 35a y 147c**- presentan características que los convierten en catalizadores ideales para su uso en procesos en el rango de 7 - 16 °C, aunque también mantienen su estabilidad a temperatura ambiente, contribuyendo en su uso no solo a ahorrar energía, sino también a proteger los compuestos termolábiles (Mhetras *et al.*, 2021). Otra característica destacable es su capacidad (según la cepa) de ser estables bajo condiciones ácidas (pH 5 en el caso de cepas 19C(2), 35a y 147c) o alcalino (pH 9 para cepas 51a y 20b).

La dificultad en encontrar características comunes entre las lipasas producidas por diferentes especies de *Psychrobacter* se encuentra en las estrategias empleadas por los miembros de este género para vencer el estrés por frío. Estas son propias de cada cepa, lo que limita la universalidad de las conclusiones extraídas en base a la observación de algunas cepas particulares. Según Koo *et al* -quienes compararon las actividades enzimáticas de su estudio con otras cepas previamente trabajadas por otros grupos de investigación- se encuentran diferencias en su sustrato óptimo, el efecto de temperatura y pH en la actividad enzimática así como en la estabilidad proteica, o en la sensibilidad frente a diferentes detergentes (Koo *et al.*, 2016). Varios informes han mostrado la misma observación (Adhi-Satya, 2020; Koo *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2018). Una posible explicación de esto es que, como se menciona en la introducción, estas enzimas son determinantes en la supervivencia del organismo y por lo tanto sensibles a variaciones en el ambiente de manera de permitir la supervivencia. Como mecanismo de adaptación al medio, cada organismo desarrolla adaptaciones a nivel proteico propios para sobrevivir al nicho que habita, lo que afecta directamente a las características enzimáticas mencionadas.

Arthrobacter sp. es un género heterogéneo que suele presentar tinción gram positiva y se consideran entre las bacterias más comunes en microbiología de suelo (Madigan *et al.*, 2021). De este género se han aislado cepas que descomponen herbicidas, cafeína, nicotina, fenoles y otros compuestos orgánicos (Madigan *et al.*, 2021), así como de ambientes de bajas temperaturas como suelo congelado (permafrost) o glaciares (Shen, *et al.* 2021). Varias especies de este género son psicrotolerantes con crecimiento en temperaturas cercanas 0°C y temperaturas óptimas entre 28 y 30°C y su clasificación como productores de lipasas y esterasas varía según la

especie (Busse & Wieser 2018). Según el trabajo de Lamilla *et al.*, 2017, donde muestrearon en zonas cercanas a los puntos de origen de las muestras estudiadas en este trabajo -Isla rey Jorge, Antártida- se encontró que *Arthrobacter sp.* se encuentra en alta frecuencia dentro de la diversidad microbiana de las Islas Shetland del Sur. Las lipasas producidas por bacterias de este género han sido ampliamente reportadas como biocatalizadores en síntesis de principios farmacéuticos activos o sus intermediarios, uso en resolución cinética de compuestos racémicos, procesos de desimetrización enzimática, o en hidrólisis enantioselectiva y bioconversiones (como por ejemplo, bioconversión de sucralosa-6-acetato a sucralosa –splenda-) (Gupta *et al.*, 2021). A pesar de estos reportes en su uso, no se encuentra en la bibliografía una descripción clara de parámetros de temperatura o pH óptimos. En este trabajo la cepa **103e** fue identificada como *Arthrobacter sp.* Se identificó que las lipasas producidas por esta cepa en particular permanecen estables y presentan - calculado a partir del análisis estadístico- mayores actividades enzimáticas entre 7 y 10 °C y pH 9 . Estos resultados son significativos para el desarrollo en el uso de esta enzima en los procesos anteriormente mencionados. De ser posible, su utilización a bajas temperaturas presenta beneficios considerando su uso en farmacéutica y alimentación.

Las *Aeromonas sp.* son bacilos gram negativos, anaerobios facultativos, no formadores de esporas que son ubicuos, pero prosperan principalmente en agua dulce y ambientes marinos. Son conocidos por secretar una diversidad de enzimas extracelulares como lipasas y esterases (De Silva *et al.*, 2018). Muy pocos trabajos reportan caracterizaciones de enzimas hidrolíticas de este género. Kim *et al.*, describen *Aeromonas sp.* obtenida de tractos intestinales de una lombriz de tierra (*Eisenia fetida*) con actividad óptima de enzima purificada observada a 50°C y pH 8.0 usando p-Nitrofenil Butirato (actividad esterasa), y actividad óptima a 60°C y pH 8.0 usando p-Nitrofenil Palmitato (actividad lipasa). La enzima purificada se mantuvo estable en los rangos de 20 a 60°C y pH de 7.0 a 10.0 (Kim, *et al.*, 2016). De igual forma, trabajos previos de Lee *et al.* (2003) reportan *Aeromonas sp* obtenidas a partir de sedimentos marinos que se caracterizan por secretar una enzima hidrolítica que actúa sobre ácidos grasos de cadena media (C3-C10), pudiendo considerarse esterasa según la definición utilizada en este trabajo. Esta fue reportada con actividad máxima a pH 7 y 10°C y capacidad de mantenerse estable a temperaturas inferiores a 50° C. La cepa **169a** identificada en este trabajo como *Aeromonas sp.* sintetiza enzimas esterases que presentan nuevas características en comparación a las mencionadas anteriormente principalmente por su origen psicrotolerante. Su actividad máxima registrada en este trabajo (pH 5) y sin variaciones considerables en el rango de temperaturas trabajado (10 -

45°C) representan características prometedoras no solo como biocatalizador industrial en condiciones ácidas, sino porque suponen la posibilidad de obtener enzimas esterasas de una nueva fuente como es una *Aeromona* psicotolerante autóctona de la Antártida.

El género *Pseudomona sp.* Se compone de bacterias gram negativas, ampliamente distribuidas en la naturaleza. Dentro del mismo género, cada especie presenta sus propias cualidades características, por lo que la información disponible que componen fuera de características primarias nombradas es heterogénea. La capacidad de las cepas de este género de ser tan versátiles en su metabolismo y adaptaciones bioquímicas dificulta generar un consenso amplio sobre este género (Palleroni, 2015). Existen especies de *Pseudomonas* que han sido reportadas como productoras de lipasas y esterasas activas en frío (Ali *et al.*, 2019; Maharana y Ray, 2015). En el trabajo de Ali *et al.* (2019) identifican una nueva especie de *Pseudomonas* aislada del glaciar Rakaposhi, Pakistan. Al probar la actividad lipolítica del extracto crudo producido por esta cepa mediante medidas espectrofotométricas de hidrólisis de p-nitrofenil palmitato determinaron su temperatura óptima de catálisis en el rango de 15 a 25°C y pH óptimo de 9. Karakaş y Arslanoğlu (2020), evaluaron las condiciones óptimas de hidrólisis de una lipasa recombinante (clonada y expresada en *E. coli*) cuyo origen es una cepa previamente estudiada de *Pseudomonas fluorescens*. Su actividad enzimática fue medida mediante titulación de los ácidos grasos liberados de la hidrólisis con aceite de oliva como sustrato. La enzima mostró una actividad óptima a 25°C y pH 8.5. Por otro lado, Salwoom *et al.* (2019), caracterizaron una enzima recombinante producida en *E. coli*, a partir de una cepa de *Pseudomona sp.* aislada de muestras de suelo provenientes de la Isla Signy, Antártida. Dentro de un rango de trabajo entre 5 y 55°C y pH entre 3 y 12, esta enzima presentó mayor actividad a 30°C y pH 6, con preferencia a ácidos grasos de cadena larga (C12-C16). En este trabajo, la cepa **27a** fue identificada como *Pseudomona sp.*, y presentó actividades enzimáticas altas en todo el rango de temperaturas de trabajo, y pH ácido alrededor de 5.

Acinetobacter es un género compuesto por bacterias aerobias, gram negativas que se encuentran generalmente en suelo, aguas residuales e incluso en comidas (Juni, 2015). Se han reportado especies de este género como productoras de lipasas activas en frío (Kavitha, 2016, Kour *et al.*, 2019). Específicamente, Zheng *et al.* (2011) identificaron lipasas a partir de muestras de suelo provenientes de glaciares de la provincia de Xinjiang, China. Las mismas fueron identificadas mediante *touchdown* PCR utilizando primers degenerados basados en dominios conservados de lipasas activas en frío. Luego de su identificación llevaron a cabo la

sobreexpresión de la enzima en *E.Coli*. La misma cuenta con temperaturas de trabajo de 0°C a 60°C, pHs de 3 a 12 y con preferencia por ácidos grasos de cadenas de 2 a 16 C como sustratos. Su temperatura óptima correspondió a 15 °C y pH óptimo 10, con preferencia por sustrato de 8C. Por otra parte, Seren & Kati en 2018 caracterizaron dos cepas de *Acinetobacter psychrotolerans* provenientes del insecto *Xylosandrus germanus*. Frente a temperaturas de 10-90°C, y pH entre 3 y 10, ambas enzimas hidrolizaron pNP Palmitato (actividad lipasa) con actividades máximas a 30°C y pH 8. Como productora de enzimas esterases, Dong *et al.* (2017) identificaron una esterasa de *Acinetobacter hemolyticus* que frente a sustratos de diferentes largos de cadena, presentó actividad solo con pNP butirato. A diferencia de las condiciones probadas en este trabajo esta cepa no es psicrotolerante, y sus actividades fueron medidas en condiciones de temperatura de 30 a 60°C y pH de 6 a 10, encontrando sus máximos entre 35 - 40°C y pH 8. En este trabajo la cepa **71 c'A** fue identificada como *Acinetobacter sp.* productora de una posible enzima esterasa. Esta enzima mostró tener mayores actividades a pH 5 y temperaturas menores a 10°C. Si bien su estabilidad enzimática solo se mantiene en un rango limitado de temperaturas y pH en comparación al resto de las enzimas esterases trabajadas en este trabajo – que mostraron ser estables solo en pH ácido pero en un amplio rango de temperaturas-, en futuras investigaciones, podría ser posible caracterizar más a fondo esta enzima. Su relevancia se encuentra en ser una posible cepa de *Acinetobacter sp.* productora de una enzima esterasa la cual no está descrita en bibliografía a diferencia de cepas productoras de lipasas.

De manera común entre todos los géneros aquí mencionados, estas enzimas poseen características propias de cada cepa, relacionadas a adaptaciones moleculares particulares. Para desarrollar una caracterización completa de estas enzimas, futuros proyectos podrían (además de obtenerlas en forma aislada) establecer sus preferencias de sustrato contra varios largos de cadenas ácido grasas así como determinar sus parámetros cinéticos como Vmax, Kcat y Km.

5. CONCLUSIÓN

El objetivo del presente trabajo fue la búsqueda de microorganismos provenientes de cultivos antárticos de los cuales obtener enzimas hidrolíticas (esterasas y lipasas) activas en frío, y evaluar su posible valor industrial por su actividad a bajas temperaturas. A partir de los cultivos mixtos iniciales pudieron obtenerse 64 cepas de trabajo. De este grupo de trabajo inicial, 9 cepas fueron descartadas por identificarse como la misma cepa mediante TP-RAPD PCR, análisis que permite diferenciar microorganismos a nivel de cepa. De las 48 cepas que presentaron actividad, la mayoría (45.9%) presentan actividad exclusivamente lipolítica (ya sea a 4°C o 20°C). De aquellas con actividad lipolítica, 50% presentó actividad lipolítica a 20 y 4 °C, mientras que las cepas restantes se repartieron entre actividad sólo 20 °C (25%) y solo a 4 °C (25%). En cuanto a la actividad esterasa, la mayoría no presentan actividad exclusivamente esterasa bajo las condiciones de estudio (13.5%). Ninguna de las cepas estudiadas presentó actividad a 4°C. Dentro de las cepas evaluadas, solo 10 presentaron actividad a 20°C y otras 10 cepas presentaron actividad a 4 y 20°C. Las cepas que presentaron mayor actividad enzimática fueron identificadas a nivel de género y la mayoría presentan reportes como productores de lipasas y esterazas activas en frío (*Psychrobacter*: Chen *et al.*, 2011; Koo *et al.*, 2016; Novototskaya-Vlasova *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2018; *Arthrobacter*: Busse y Wieser, 2018; *Pseudomona*: Ali *et al.*, 2019; Maharana y Ray, 2015; *Acinetobacter*: Kavitha, 2016, Kour *et al.*, 2019)

Las cepas 19C(2), 51a y 20b fueron identificadas como *Psychrobacter sp.* productoras de lipasas. La cepa identificada como 19C(2) presentó mayores actividades frente a pH ácidos y temperaturas de 10 °C. Aun así, según el modelado estadístico, mantiene su estabilidad en un amplio rango de temperaturas (10 – 40 °C). Por otro lado las cepas 51a y 20b muestran un comportamiento similar entre sí (siendo mayor la actividad de 51a comparativamente). Ambas presentan mayores actividades a pH 9, 10 °C pero con un segundo máximo a pH 5, 40 °C. Este resultado podría indicar que en cada caso la cepa produce dos tipos de enzimas lipolíticas. En cuanto a las cepas 35a y 147c, identificadas como *Psychrobacter sp.* pero productoras de enzimas esterazas, los mejores valores para la eficiencia catalítica de estas enzimas fueron medidos en el rango de pH 5 y ninguna se ve afectada en gran medida por variaciones en temperatura. Estos últimos resultados resultan prometedores para el uso de las diferentes enzimas mencionadas en procesos industriales que requieran pH ácidos (manufactura de ciertos

alimentos, tratamiento de textiles entre otros (Chandra *et al.*, 2020)) con los beneficios de poder ser utilizadas a bajas temperaturas (Mhetras *et al.*, 2021).

La cepa 103e fue identificada como *Arthrobacter sp.* la cual ha sido reportada como género de alta frecuencia dentro de la diversidad microbiana de las Islas Shetland del Sur, lugar de origen de los cultivos mixtos originales. Esta enzima lipasa presenta mayores actividades a temperaturas menores de 10 °C y pH básicos (pH9). Este resultado resulta de interés no solo por la potencialidad que presenta el uso de esta enzima en procesos que requieran bajas temperaturas y pH alcalinos sino que además, aunque ya se encuentra reportados usos de lipasas provenientes de cepas de *Arthrobacter* (Gupta *et al.*, 2021), ninguna implica el uso de enzimas activas en frío.

Se identificó a la cepa 169a como *Aeromonas sp.*, productora de esterases. Esta presentó actividades solo en entornos ácidos (pH 5), sin verse afectada por la variación en temperatura (10 – 40 °C). Como se comentó anteriormente, la posibilidad de utilizar esterases acidófilas es un beneficio a nivel industrial. Pero en segundo lugar, este resultado proporciona un precedente a un posible estudio de esterases procedentes de *Aeromonas* activa en frío de origen antártico, lo que no ha sido reportado hasta el momento.

Dentro de las cepas probadas como productoras de esterases, la cepa 27a fue la que presentó mayores actividades enzimáticas y fue identificada como *Pseudomonas sp.*. Esta, presenta actividades solo en condiciones ácidas (pH 5) sin verse afectada por la variación en temperaturas. Uno de los hallazgos más significativos que surgen de este estudio es que si bien existen reportes de esterases activas en frío provenientes de *Pseudomonas sp* (Ali *et al.*, 2019; Maharana y Ray, 2015), ninguna es activa en pH ácidos.

Por último la cepa 71 c'A fue la única cepa productora de esterases solo activa a pH 5 y a 10 °C. Esta, fue identificada como *Acinetobacter sp.*. Si bien en comparación a las cepas descritas en bibliografía tendría un limitado rango de variables de pH y temperatura en los cuales mantiene su estabilidad, estos resultados podrían significar la descripción de una esterase producida por este género.

Este trabajo se suma a la creciente área de investigación en bioprospección antártica que muestra la gran diversidad de la biodiversidad antártica y como los microorganismos que la

componen son valiosos como fuente de lipasas y esterasas rentables considerando sus posibles y amplios usos industriales.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Adhi-Satya, A. (2020). Expression and characterization of a novel cold-adapted lipase from psychrotolerant bacteria *Psychrobacter* sp. S1B. *Malaysian Journal of Microbiology*, 79-87.
- Agobo, K. U., Arazu, V. A., Uzo, K., & Igwe, C. N. (2017). Microbial lipases: a prospect for biotechnological industrial catalysis for green products: a review. *Ferment Technol*, 6(144), 2.
- Ali, Y. B., Verger, R., & Abousalham, A. (2012). Lipases or esterases: does it really matter? Toward a new bio-physico-chemical classification. In *Lipases and phospholipases* (pp. 31-51). Humana Press.
- Ali, Y., Ahmad, B., Alghamdi, K. M., Kamal, T., Ali, H. S. H. M., Anwar, Y., ... & Jomezai, N. U. (2019). Characterization of recombinant cold active lipase from a novel *Pseudomonas* spp. MG687270. *International Journal of Agriculture and Biology*, 22(5), 855-865.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. (1990) "Basic local alignment search tool", *Journal of Molecular Biology* 215 (3) 403–410.
- Armendáriz-Ruiz, M., Rodríguez-González, J. A., Camacho-Ruiz, R. M., & Mateos-Díaz, J. C. (2018). Carbohydrate esterases: An overview. *Lipases and Phospholipases*, 39-68.
- Arnold, F. H., Wintrode, P. L., Miyazaki, K., & Gershenson, A. (2001). How enzymes adapt: lessons from directed evolution. *Trends in biochemical sciences*, 26(2), 100-106.
- Bölter, M. (2004). Ecophysiology of psychrophilic and psychrotolerant microorganisms. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)*, 50(5), 563-573.
- Bracco, P., van Midden, N., Arango, E., Torrelo, G., Ferrario, V., Gardossi, L., & Hanefeld, U. (2020). *Bacillus subtilis* lipase a—Lipase or esterase?. *Catalysts*, 10(3), 308.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Breakwell, D. (2007). Colony Morphology Protocol. American Society for Microbiology: <https://asm.org/ASM/media/Protocol-Images/Colony-Morphology-Protocol.pdf?ext=.pdf>.
- Brock, T. D., & Freeze, H. (1969). *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a nonsporulating extreme thermophile. *Journal of bacteriology*, 98(1), 289-297.
- Bukhari, A., Atta, M., & Idris, A. (2017). Synthesis of Poly (L-) Lactide under Simultaneous Cooling and Microwave Heating by using Immobilised *Candida Antarctica* Lipase B. *Chemical Engineering Transactions*, 56, 1447-1452.

Business Communications Company (BCC), 2018, *Global Markets for Enzymes in Industrial Applications*,
<https://www.bccresearch.com/market-research/biotechnology/global-markets-for-enzymes-in-industrial-applications.html>

Busse, H.-J. and Wieser, M. (2018). *Arthrobacter*. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (eds M.E. Trujillo, S. Dedysh, P. DeVos, B. Hedlund, P. Kämpfer, F.A. Rainey and W.B. Whitman). <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00118.pub2>

Casas-Godoy, L., Duquesne, S., Bordes, F., Sandoval, G., & Marty, A. (2012). Lipases: an overview. *Lipases and phospholipases*, 3-30.

Chandra, P., Singh, R., & Arora, P. K. (2020). Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review. *Microbial Cell Factories*, 19(1), 1-42.

Chapman, J., Ismail, A. E., & Dinu, C. Z. (2018). Industrial applications of enzymes: Recent advances, techniques, and outlooks. *Catalysts*, 8(6), 238.

Chen, R., Guo, L., & Dang, H. (2011). Gene cloning, expression and characterization of a cold-adapted lipase from a psychrophilic deep-sea bacterium *Psychrobacter* sp. C18. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(2), 431-441.

Collins, T., & Gerday, C. (2017). Enzyme catalysis in psychrophiles. In *Psychrophiles: from biodiversity to biotechnology* (pp. 209-235). Springer, Cham.de

Collins, T., & Margesin, R. (2019). Psychrophilic lifestyles: mechanisms of adaptation and biotechnological tools. *Applied microbiology and biotechnology*, 103(7), 2857-2871.

Correa, T., & Abreu, F. (2020). Antarctic microorganisms as sources of biotechnological products. In *Physiological and Biotechnological Aspects of Extremophiles* (pp. 269-284). Academic Press002E

Cowan, D. A., & Tombs, M. P. (2020). Industrial enzymes. In *Biotechnology* (pp. 319-350). CRC Press.

D'Amico, S., Claverie, P., Collins, T., Georlette, D., Gratia, E., Hoyoux, A., ... & Gerday, C. (2002). Molecular basis of cold adaptation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 357(1423), 917-925.

D'Amico, S., Collins, T., Marx, J. C., Feller, G., Gerday, C., & Gerday, C. (2006). Psychrophilic microorganisms: challenges for life. *EMBO reports*, 7(4), 385-389.

De Luca, V., & Mandrich, L. (2020). Lipases/esterases from extremophiles: main features and potential biotechnological applications. In *Physiological and Biotechnological Aspects of Extremophiles* (pp. 169-181). Academic Press.

- De Maayer, P., Anderson, D., Cary, C., & Cowan, D. A. (2014). Some like it cold: understanding the survival strategies of psychrophiles. *EMBO reports*, 15(5), 508-517.
- De Santi, C., Altermark, B., de Pascale, D., & Willassen, N. P. (2016). Bioprospecting around Arctic islands: Marine bacteria as rich source of biocatalysts. *Journal of basic microbiology*, 56(3), 238-253.
- De Silva, B. C. J., Hossain, S., Dahanayake, P. S., & Heo, G. J. (2019). *Aeromonas* spp. from marketed Yesso scallop (*Patinopecten yessoensis*): molecular characterization, phylogenetic analysis, virulence properties and antimicrobial susceptibility. *Journal of applied microbiology*, 126(1), 288-299.
- Dong, H., Secundo, F., Xue, C., & Mao, X. (2017). Whole-Cell biocatalytic synthesis of cinnamyl acetate with a novel esterase from the DNA library of *Acinetobacter hemolyticus*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 65(10), 2120-2128.
- Gerday, C. (2013). Psychrophily and catalysis. *Biology*, 2(2), 719-741.
- Giudice, A. L., Poli, A., Finore, I., & Rizzo, C. (2020). Peculiarities of extracellular polymeric substances produced by Antarctic bacteria and their possible applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1-12.
- Giudice, A. L., Poli, A., Finore, I., & Rizzo, C. (2020). Peculiarities of extracellular polymeric substances produced by Antarctic bacteria and their possible applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 104(7), 2923-2934.
- Guajardo, N., & de María, P. D. (2018). Lipases in Green Chemistry: Deep Eutectic Solvents (DES) as New Green Solvents. In *Lipases and Phospholipases* (pp. 351-357). Humana Press, New York, NY.
- Gupta, P., Chaubey, A., Mahajan, N., & Anand, N. (2021). A review on *Arthrobacter* sp. lipase: A versatile biocatalyst for the kinetic resolution to access enantiomerically pure/enriched compounds. *Chirality*, 33(5), 209-225.
- Hamid, T. H. T. A. (2021). isolation of thermophilic lipase producing bacterium from hot springs at the east coast of peninsular malaysia. *Journal of Tropical Life Science*, 11(1).
- Hatice, K. A. T. I., & SEREN, Ş. (2018). Biochemical Characterization of Lipases Obtained from *Acinetobacter psychrotolerans* Strains. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 22(1), 7-12.
- Ilesanmi, O. I., Adekunle, A. E., Omolaiye, J. A., Olorode, E. M., & Ogunkanmi, A. L. (2020). Isolation, optimization and molecular characterization of lipase producing bacteria from contaminated soil. *Scientific African*, 8, e00279.

- Jadhav V.V., Pote S.S., Yadav A., Shouche Y., Bhadekar R.K. (2013). Extracellular cold active lipase from the psychrotrophic *Halomonas* sp. BRI8 isolated from Antarctic sea water. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 35(6): 623-630.
- Jahn, M., Zerr, A., Fedorowicz, F. M., Brigger, F., Koulov, A., & Mahler, H. C. (2020). Measuring lipolytic activity to support process improvements to manage lipase-mediated polysorbate degradation. *Pharmaceutical Research*, 37, 1-13.
- Javed, S., Azeem, F., Hussain, S., Rasul, I., Siddique, M. H., Riaz, M., ... & Nadeem, H. (2018). Bacterial lipases: a review on purification and characterization. *Progress in biophysics and molecular biology*, 132, 23-34.
- Joseph, B., & Ramteke, P. W. (2013). Extracellular solvent stable cold-active lipase from psychrotrophic *Bacillus sphaericus* MTCC 7526: partial purification and characterization. *Annals of microbiology*, 63(1), 363-370.
- Joseph, Babu., Ramteke, P. W., & Kumar, P. A. (2006). Studies on the enhanced production of extracellular lipase by *Staphylococcus epidermidis*. *The Journal of general and applied microbiology*, 52(6), 315-320.
- Juni, E. (2015). *Acinetobacter*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1-26.
- Juni, E., & Heym, G. A. (1986). *Psychrobacter immobilis* gen. nov., sp. nov.: genospecies composed of gram-negative, aerobic, oxidase-positive coccobacilli. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 36(3), 388-391.
- Karakaş, F., & Arslanoğlu, A. (2020). Gene cloning, heterologous expression, and partial characterization of a novel cold-adapted subfamily I. 3 lipase from *Pseudomonas fluorescence* KE38. *Scientific Reports*, 10(1), 1-13.
- Kavitha, M. (2016). Cold active lipases—an update. *Frontiers in life Science*, 9(3), 226-238.
- Kielkopf, C. L., Bauer, W., & Urbatsch, I. L. (2020). Bradford assay for determining protein concentration. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2020(4), pdb-prot102269.
- Kim, Y. W., Hong, S. W., & Chung, K. S. (2016). Purification and Characterization of a Lipolytic Enzyme Produced by *Aeromonas hydrophila* PL43. *Microbiology and Biotechnology Letters*, 44(2), 130-139.
- Koo, B. H., Moon, B. H., Shin, J. S., & Yim, J. H. (2016). A novel cold-active lipase from *Psychrobacter* sp. ArcL13: gene identification, expression in *E. coli*, refolding, and characterization. *Korean Journal of Microbiology*, 52(2), 192-201.

- Kour, D., Rana, K. L., Kaur, T., Singh, B., Chauhan, V. S., Kumar, A., ... & Gupta, V. K. (2019). Extremophiles for hydrolytic enzymes productions: biodiversity and potential biotechnological applications. *Bioprocessing for biomolecules production*, 321-372.
- Kristiansen, E. (2020). Thermal Hysteresis. In *Antifreeze Proteins Volume 2* (pp. 131-158). Springer, Cham.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K. (2016) MEGA7: “molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets”, *Molecular Biology Evolution* 33 (7) 1870–1874.
- la, T., & Abreu, F. (2020). Antarctic microorganisms as sources of biotechnological products. In *Physiological and Biotechnological Aspects of Extremophiles* (pp. 269-284). Academic Press.
- Lamilla, C., Pavez, M., Santos, A., Hermosilla, A., Llanquiao, V., & Barrientos, L. (2017). Bioprospecting for extracellular enzymes from culturable Actinobacteria from the South Shetland Islands, Antarctica. *Polar Biology*, 40(3), 719-726.
- Lanka, S., & Latha, J. N. L. (2015). A short review on various screening methods to isolate potential lipase producers: lipases-the present and future enzymes of biotech industry. *Int. J. Biol. Chem*, 9(4), 207-219.
- Lasek, R., Dziewit, L., Ciok, A., Decewicz, P., Romaniuk, K., Jedrys, Z., ... & Bartosik, D. (2017). Genome content, metabolic pathways and biotechnological potential of the psychrophilic Arctic bacterium *Psychrobacter* sp. DAB_AL43B, a source and a host of novel *Psychrobacter*-specific vectors. *Journal of biotechnology*, 263, 64-74.
- Lee, H. K., Ahn, M. J., Kwak, S. H., Song, W. H., & Jeong, B. C. (2003). Purification and characterization of cold active lipase from psychrotrophic *Aeromonas* sp. LPB 4. *Journal of microbiology*, 41(1), 22-27.
- Lima-Ramos, J., Tufvesson, P. & Woodley, J. (2014). Application of environmental and economic metrics to guide the development of biocatalytic processes. *Green Processing and Synthesis*, 3(3), 195-213. <https://doi.org/10.1515/gps-2013-0094>
- Liu, D. (2015). *Aeromonas*. In *Molecular Medical Microbiology* (pp. 1099-1110). Academic Press.
- Madigan, M., Aiyer, J., Buckley, D., Sattley, W. and Stahl, D., (2021). *Brock Biology of Microorganisms, EBook, Global Edition*. Harlow: Pearson Education, Limited.
- Maharana, A. and P. Ray, 2015. A novel cold-active lipase from psychrotolerant *Pseudomonas* spp. AKM-L5 showed organic solvent resistant and suitable for detergent formulation. *J. Mol. Catal. B Enzym.*, 120: 173–178

- Margesin, R., & Miteva, V. (2011). Diversity and ecology of psychrophilic microorganisms. *Research in microbiology*, 162(3), 346-361.
- McDonald, A. G., & Tipton, K. F. (2021). Enzyme Nomenclature and Classification: the State of the Art. *The FEBS journal*.
- Melani, N. B., Tambourgi, E. B., & Silveira, E. (2020). Lipases: from production to applications. *Separation & Purification Reviews*, 49(2), 143-158.
- Metpally, R. P. R., & Reddy, B. V. B. (2009). Comparative proteome analysis of Rivas, R., Velázquez, E., Valverde, A., Mateos, P. F., & Martínez-Molina, E. (2001). A two primers random amplified polymorphic DNA procedure to obtain polymerase chain reaction fingerprints of bacterial species. *Electrophoresis*, 22(6), 1086-1089. psychrophilic versus mesophilic bacterial species: Insights into the molecular basis of cold adaptation of proteins. *BMC genomics*, 10(1), 1-10.
- Mhetras, N., Mapare, V., & Gokhale, D. (2021). Cold Active Lipases: Biocatalytic Tools for Greener Technology. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1-22.
- Morita, R. Y. (1975). Psychrophilic bacteria. *Bacteriological reviews*, 39(2), 144.
- National Center for Biotechnology Information; Basic Local Alignment Search Tool; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- Nolasco-Soria, H., Moyano-López, F., Vega-Villasante, F., del Monte-Martínez, A., Espinosa-Chaurand, D., Gisbert, E., & Nolasco-Alzaga, H. R. (2018). Lipase and phospholipase activity methods for marine organisms. In *Lipases and phospholipases* (pp. 139-167). Humana Press, New York, NY.
- Novototskaya-Vlasova, K. A., Petrovskaya, L. E., Rivkina, E. M., Dolgikh, D. A., & Kirpichnikov, M. P. (2013). Characterization of a cold-active lipase from *Psychrobacter cryohalolentis* K5 T and its deletion mutants. *Biochemistry (Moscow)*, 78(4), 385-394.
- Olson, B. J. (2016). Assays for determination of protein concentration. *Current protocols in pharmacology*, 73(1), A-3A.
- Palleroni, N.J. (2015). *Pseudomonas*. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (eds M.E. Trujillo, S. Dedysh, P. DeVos, B. Hedlund, P. Kämpfer, F.A. Rainey and W.B. Whitman). <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm01210>
- Park, S. H., Park, S. J., & Choi, J. I. (2018). Expression, Purification, and Characterization of a Cold-adapted Lipase from *Janthinobacterium* sp. *Microbiology and Biotechnology Letters*, 46(1), 51-58.

Patel, N., Rai, D., Shahane, S., & Mishra, U. (2019). Lipases: sources, production, purification, and applications. *Recent patents on biotechnology*, 13(1), 45-56.

Poger, D., Caron, B., & Mark, A. E. (2014). Effect of methyl-branched fatty acids on the structure of lipid bilayers. *The journal of physical chemistry. B*, 118(48), 13838–13848. <https://doi.org/10.1021/jp503910r>

Pohanka, M. (2019). Biosensors and bioassays based on lipases, principles and applications, a review. *Molecules*, 24(3), 616.

R. Berlemont, C. Gerday (2011) - Extremophiles, Editor(s): Murray Moo-Young, Comprehensive Biotechnology (Second Edition), Academic Press, 2011, Pages 229-242, ISBN 9780080885049, <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00030-1>.

Riswanto, F. D. O., Rohman, A., Pramono, S., & Martono, S. (2019). Application of response surface methodology as mathematical and statistical tools in natural product research. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 9(10), 125-133.

Rivas, R., Velázquez, E., Valverde, A., Mateos, P. F., & Martínez-Molina, E. (2001). A two primers random amplified polymorphic DNA procedure to obtain polymerase chain reaction fingerprints of bacterial species. *Electrophoresis*, 22(6), 1086-1089.

Rodrigues, D. F., & Tiedje, J. M. (2008). Coping with our cold planet. *Applied and environmental microbiology*, 74(6), 1677-1686.

Ronald M.A. 2000. Handbook of Microbiological Media, pp: 949.

Sakmanoglu, A., Sayin, Z., Pinarkara, Y., Uslu, A., Ucan, U. S., & Erganis, O. (2019). Evaluation of random amplified polymorphic DNA and multiple-locus variable number tandem repeat analyses for *Mycoplasma cynos*. *Journal of microbiological methods*, 161, 1-7.

Salzoom, L., Salleh, A. B., Convey, P., & Mohamad Ali, M. S. (2019). New recombinant cold-adapted and organic solvent tolerant lipase from psychrophilic *Pseudomonas* sp. LSK25, isolated from Signy Island Antarctica. *International journal of molecular sciences*, 20(6), 1264.

Santiago, M., Ramírez-Sarmiento, C. A., Zamora, R. A., & Parra, L. P. (2016). Discovery, molecular mechanisms, and industrial applications of cold-active enzymes. *Frontiers in microbiology*, 7, 1408.

Scott, P. (2001). Bioprospecting as a conservation tool: history and background. In *Crossing Boundaries in Park Management: Proceedings of the 11th Conference on Research and Resource Management in Parks and on Public Lands*, The George Wright Society, Michigan, USA

Sethi, M. K., Chakraborty, P., & Shukla, R. (2017). Biocatalysis—A Greener Alternative in Synthetic Chemistry. In *Biocatalysis* (pp. 44-76).

Shen, L., Liu, Y., Allen, M. A., Xu, B., Wang, N., Williams, T. J., & Cavicchioli, R. (2021). Linking genomic and physiological characteristics of psychrophilic *Arthrobacter* to metagenomic data to explain global environmental distribution. *Microbiome*, 9(1), 1-15.

Shivaji, S., & Prakash, J. S. (2010). How do bacteria sense and respond to low temperature?. *Archives of microbiology*, 192(2), 85-95.

Siddiqui, K. S., Shemsi, A. M., Guerriero, G., Najnin, T., & Ertan, H. (2017). Biotechnological improvements of cold-adapted enzymes: commercialization via an integrated approach. In *Psychrophiles: From Biodiversity to Biotechnology* (pp. 477-512). Springer, Cham.

Singh, V., Singh, M. P., Verma, V., Singh, P., Srivastava, R., & Singh, A. K. (2016). Characteristics of cold adapted enzyme and its comparison with mesophilic and thermophilic counterpart. *Cell Mol Biol*, 62, 144.

Suzuki T, Nakayama T, Kurihara T, Nishino T, Esaki N. 2001. Cold-active lipolytic activity of psychrotrophic *Acinetobacter* sp. strain no. 6. *J Biosci Bioeng*. 92:144–148.

Tan, S., Apenten, R. O., & Knapp, J. (1996). Low temperature organic phase biocatalysis using cold-adapted lipase from psychrotrophic *Pseudomonas* P38. *Food chemistry*, 57(3), 415-418.

Tattersall, G. J., Sinclair, B. J., Withers, P. C., Fields, P. A., Seebacher, F., Cooper, C. E., & Maloney, S. K. (2012). Coping with thermal challenges: physiological adaptations to environmental temperatures. *Comprehensive Physiology*, 2(3), 2151-2202.

Thompson, JD., Higgins, DG., Gibson, TJ. (1994) CLUSTAL W: “improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice”, *Nucleic Acids Reserche*. 22 (22)4673–4680.

Xiang, H., Yang, X., Ke, L., & Hu, Y. (2020). The properties, biotechnologies, and applications of antifreeze proteins. *International journal of biological macromolecules*, 153, 661-675.

Zeng, Y. X., Yu, Y., Liu, Y., & Li, H. R. (2016). *Psychrobacter glaciei* sp. nov., isolated from the ice core of an Arctic glacier. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 66(4), 1792-1798.

Zhang, Y., Ji, F., Wang, J., Pu, Z., Jiang, B., & Bao, Y. (2018). Purification and characterization of a novel organic solvent-tolerant and cold-adapted lipase from *Psychrobacter* sp. ZY124. *Extremophiles*, 22(2), 287-300.

Zhang, Y., Sun, W., Elfeky, N. M., Wang, Y., Zhao, D., Zhou, H., ... & Bao, Y. (2020). Self-assembly of lipase hybrid nanoflowers with bifunctional Ca^{2+} for improved activity and stability. *Enzyme and microbial technology*, 132, 109408.

Zhao, J., Ma, M., Zeng, Z., Yu, P., Gong, D., & Deng, S. (2021). Production, purification and biochemical characterisation of a novel lipase from a newly identified lipolytic bacterium *Staphylococcus caprae* NCU S6. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 36(1), 248-256.

Zheng, X., Chu, X., Zhang, W., Wu, N., & Fan, Y. (2011). A novel cold-adapted lipase from *Acinetobacter* sp. XMZ-26: gene cloning and characterisation. *Applied microbiology and biotechnology*, 90(3), 971-980.

7. ANEXO

7.1 Clasificación y caracterización morfológica

Tabla 7.1. Grupos morfológicos de cepas de trabajo.

GRUPO I			GRUPO II		
cepa	morfología	Gram	cepa	morfología	Gram
54b	BLANCA	BG-	61b	BLANCA	BG-
1cb	BLANCA	BG-	79a	BLANCA	BG-
15b	BLANCA	BG-	131b	BLANCA	BG-
17b(1)	BLANCA	BG-	160b(2)	BLANCA	BG-
4a (L)	BLANCA	BG-	34c	BLANCA	BG-
16bB	BLANCA	BG-	M37	BLANCA	BG-
19bB	BLANCA	BG-	71c'A	BLANCA	BG-
20a	BLANCA	BG-	137b	BLANCA	BG-/G+
42cB	BLANCA	BG-	28a	BLANCA	BG-/G+
53a	BLANCA	BG-	34b	BLANCA	BG+
			21c	BLANCA	BG+
			35d	BLANCA	BG+
GRUPO III			GRUPO IV		
cepa	morfología	Gram	cepa	morfología	Gram
42'b	BLANCA	BG-/CBG-	71c	BLANCA	CG-/G+
20b	BLANCA	CBG-	77b(1')	BLANCA	CG-/G+
169a	BLANCA	CBG-	42cA	BLANCA	CBG+
1a	BLANCA	CBG-	69a	BLANCA	CG+
7Ab	BLANCA	CBG-	62a	BLANCA	CG+
54d	BLANCA	CBG-	71c'B2	BLANCA	CG+
161aA	BLANCA	CBG-	19c(2)	BLANCA	CG+
161aB	BLANCA	CBG-	51a	BLANCA	CG-
77b(1)	BLANCA	CBG-/G+	183a	BLANCA	CG-
34a(1.3)	BLANCA	CBG-/G+			
32c(2)	BLANCA	CBG-/G+			
GRUPO V			GRUPO VI		
cepa	morfología	Gram	cepa	morfología	Gram
51b	BEIGE	BG-	41c	NARANJA	CG+
51c	BEIGE	BG-	133d	NARANJA	CG+
4a	BEIGE	BG-	7Aa	NARANJAS	CG-
31d	BEIGE	BG-	GRUPO VII		
15e	BEIGE	BG-	103e	AMARILLA	BG+
71c'	BEIGE	BG+	115d	AMARILLA	BG+
35a	BEIGE	CG-	52b	AMARILLA	CBG+
160b(1)	BEIGE	CBG+	34a(1.2)	AMARILLA	CBG-
113e	BEIGE	CG+	GRUPO VIII		
147c	BEIGE	CG+	184a	CLARAS	BG-
19bA	BEIGE	CG+	27a	CLARAS	BG-
19bC	BEIGE	CG+	8b	CLARAS	BG-

7.2 Pre selección de cepas finales de trabajo.

Tabla 7.2 Medidas de diámetro total (diámetro del halo sumado al diámetro de la colonia) sobre diámetro de la colonia (DT/Dcol)

GRUPO I	4°C						20°C					
	7 dias			14 dias			7 dias			14 dias		
	mt80	tba	mest	mt80	tba	mest	mt80	tba	mest	mt80	tba	mest
54b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1cb	H.V	2,2	-	H.V	2,7	-	H.V	1,5	-	1,3	1,5	-
15b	H.V	5,0	-	H.V	4,8	-	H.V	1,8	-	-	1,8	-
17b(1)	H.V	4,0	-	H.V	4,2	-	H.V	2,5	-	-	2,5	-
19bB	6,0	-	-	3,7	-	-	2,8	-	6,0	1,7	-	2,3
42cB	H.V	-	-	H.V	-	-	1,7	-	-	1,7	-	-
53a	H.V	-	-	H.V	-	-	H.V	-	-	H.V	-	-
GRUPO II	4°C						20°C					
	7 dias			14 dias			7 dias			14 dias		
	mt80	tba	mest	mt80	tba	mest	mt80	tba	mest	mt80	tba	mest
61b	H.V	-	-	H.V	-	-	-	-	-	-	-	-
79a	H.V	-	-	H.V	-	-	-	-	-	-	-	-
131b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
160b(2)	H.V	2,8	-	H.V	2,5	-	H.V	-	-	H.V	-	-
34c	-	1,5	-	-	2,0	-	H.V	-	-	H.V	-	-
M37	H.V	3,8	-	H.V	2,7	-	H.V	-	-	H.V	-	-
71c'A	H.V	5,0	-	H.V	6,0	-	2,7	-	-	2,7	-	-
28a	-	8,0	-	-	3,0	-	-	1,3	-	-	1,3	-
34b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,5	-
35d	SIN CRECIMIENTO											
GRUPO III	4°C						20°C					
	7 dias			14 dias			7 dias			14 dias		
	mt80	tba	mest	mt80	tba	mest	mt80	tba	mest	mt80	tba	mest
42'b	H.V	2,1	-	H.V	3,8	-	H.V	-	1,2	H.V	-	1,2
20b	H.V	4,0	1,5	H.V	3,0	1,3	H.V	2,5	2,5	H.V	10,0	2,2
169a	H.V	2,8	4,0	H.V	2,7	4,0	H.V	3,7	2,3	H.V	2,0	2,3
1a	H.V	-	2,5	H.V	-	1,8	-	1,9	3,3	-	2,0	2,1
7Ab	H.V	-	-	H.V	-	-	H.V	-	1,3	H.V	2,5	1,4
54d	H.V	-	-	-	-	-	H.V	4,0	-	-	3,8	-
161aA	H.V	-	-	H.V	-	-	1,4	1,7	2,7	1,4	1,7	2,7
161aB	H.V	8,5	-	H.V	10,0	-	2,3	2,0	2,1	2,3	2,0	2,1
32c(2)	H.V	2,7	-	-	3,3	-	-	1,5	-	-	3,3	-
GRUPO IV	4°C						20°C					
	7 dias			14 dias			7 dias			14 dias		
	mt80	tba	mest	mt80	tba	mest	mt80	tba	mest	mt80	tba	mest
71c	H.V	2,7	-	H.V	3,3	-	H.V	1,3	-	H.V	1,3	-
77b(1')	H.V	4,5	-	H.V	6,5	-	H.V	2,0	-	H.V	1,8	-
62a	-	2,0	-	H.V	2,9	-	-	-	-	-	-	-
71c'B2	-	2,7	-	H.V	2,9	-	-	-	-	H.V	-	-
19c(2)	H.V	12,0	-	H.V	8,0	2,4	H.V	7,0	1,7	2,4	7,5	1,7
51a	H.V	10,0	-	2,9	15,0	2,1	H.V	8,7	1,8	2,3	4,2	2,3
GRUPO V	4°C						20°C					
	7 dias			14 dias			7 dias			14 dias		
	mt80	tba	mest	mt80	tba	mest	mt80	tba	mest	mt80	tba	mest
4a	-	3,0	-	1,2	3,0	-	1,7	-	-	2,0	-	-
31d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2
71c'	-	-	-	-	-	-	H.V	-	-	H.V	-	1,5
35a	-	-	-	1,71428571	3,0	1,0	-	-	-	2,9	2,0	1,8
160b(1)	H.V	-	-	H.V	-	-	-	-	-	-	-	-
113e	H.V	-	-	H.V	-	-	H.V	-	-	H.V	4,0	-
147c	-	-	-	2,0	-	3,0	-	-	-	3,2	-	4,2
19bA	H.V	-	-	H.V	-	-	H.V	3,0	-	H.V	3,0	3,0
19bC	H.V	2,0	-	H.V	2,0	-	-	5,0	2,1	1,7	3,0	2,1
GRUPO VI	4°C						20°C					
	7 dias			14 dias			7 dias			14 dias		
	mt80	tba	mest	mt80	tba	mest	mt80	tba	mest	mt80	tba	mest
41c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
133d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7Aa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GRUPO VII	4°C						20°C					
	7 dias			14 dias			7 dias			14 dias		
	mt80	tba	mest	mt80	tba	mest	mt80	tba	mest	mt80	tba	mest
103e	-	9,0	-	H.V	4,0	-	-	3,7	-	-	3,0	-
115d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
52b	-	-	-	-	-	-	-	2,5	-	-	3,3	-
GRUPO VIII	4°C						20°C					
	7 dias			14 dias			7 dias			14 dias		
	mt80	tba	mest	mt80	tba	mest	mt80	tba	mest	mt80	tba	mest
27a	2,0	4,0	2,5	3,5 (HV)	2,8	2,9	2,7 (HV)	2,0	2,5	3,3	1,9	1,7
8b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

7.3 Secuenciación

Tabla 7.3 Programa de PCR utilizado para la amplificación de fragmentos correspondientes al gen ribosomal 16S

Programa amplificación TP RAPD PCR		
Temperatura	Tiempo	Ciclos
95°C	3 min	1
94°C	45 seg	35
50°C	45 seg	
70°C	90 seg	
72°C	7 min	1

7.4 Ensayos de actividad enzimática

Tabla 7.4. Diseño experimental para determinar pH y temperatura óptimos de cada enzima.

DISEÑO			Valores reales	
Ensayo	Temperatura	pH	Temperatura (°C)	pH
1	1	-1	40	5
2	1	1	40	9
3	-1	-1	10	5
4	0	0	25	7
5	0	0	25	7
6	-1	1	10	9
7	0	0	25	7

Tabla 7.5 Resultados análisis de regresión de los datos obtenidos a partir de diseño compuesto central.

La tabla muestra cómo las variables de temperatura (C°) y pH afectan las respuestas de cada cepa

19c(2)					51a				
	Effect	Std.Err.	t(2)	p		Effect	Std.Err.	t(2)	p
Mean/Interc.	0,011714	0,000017	676,304	0,000002	Mean/Interc.	0,001007	0,00		
Curvatr.	-0,01760 2	0,000053	-332,652	0,000009	Curvatr.	-0,002014	0,00		
(1)pH	-0,02244 4	0,000035	-647,902	0,000002	(1)pH	0,001036	0,00		
(2)Temp (°C)	-0,01766 0	0,000035	-509,785	0,000004	(2)Temp (°C)	-0,001036	0,00		
1 by 2	0,016676	0,000035	481,383	0,000004	1 by 2	-0,002014	0,00		
103e					20b				
	Effect	Std.Err.	t(2)	p		Effect	Std.Err.	t(2)	p
Mean/Interc.	0,000191	0,000012	15,90729	0,003929	Mean/Interc.	0,000338	0,000169	2,00000	0,139326
Curvatr.	0,000646	0,000037	17,56804	0,003224	Curvatr.	0,000820	0,000447	1,83426	0,163972
(1)pH	0,000383	0,000024	15,90729	0,003929	(1)pH	-0,000997	0,000447	-2,23173	0,111817
(2)Temp (°C)	-0,00014 2	0,000024	-5,90921	0,027464	(2)Temp (°C)	-0,001004	0,000447	-2,24829	0,110113
1 by 2	-0,00014 2	0,000024	-5,90921	0,027464	1 by 2	-0,001004	0,00		
169a					35a				
	Effect	Std.Err.	t(2)	p		Effect	Std.Err.	t(2)	p
Mean/Interc.	0,020935	0,000011	1982,66	0,000000	Mean/Interc.	0,017019	0,00		
Curvatr.	-0,04166 5	0,000032	-1291,58	0,000001	Curvatr.	-0,034038	0,00		
(1)pH	-0,04187 1	0,000021	-1982,66	0,000000	(1)pH	-0,034034	0,00		
(2)Temp (°C)	0,001684	0,000021	79,74	0,000157	(2)Temp (°C)	-0,005505	0,00		
1 by 2	-0,00168 4	0,000021	-79,74	0,000157	1 by 2	0,005509	0,00		
27a					147c				
	Effect	Std.Err.	t(2)	p		Effect	Std.Err.	t(2)	p
Mean/Interc.	0,025257	0,000023	1079,84	0,000001	Mean/Interc.	0,012842	0,000007	1822,64	0,000000
Curvatr.	-0,05044 6	0,000071	-705,97	0,000002	Curvatr.	-0,025669	0,000022	-1192,44	0,000001
(1)pH	-0,05044 9	0,000047	-1078,45	0,000001	(1)pH	-0,025685	0,000014	-1822,64	0,000000
(2)Temp (°C)	-0,00509 2	0,000047	-108,86	0,000084	(2)Temp (°C)	-0,004524	0,000014	-321,03	0,000010
1 by 2	0,005157	0,000047	110,25	0,000082	1 by 2	0,004524	0,000014	321,03	0,000010
71 c'A									
	Effect	Std.Err.	t(2)	p					
Mean/Interc.	0,004195	0,00							
Curvatr.	-0,00839 0	0,00							
(1)pH	-0,00836 9	0,00							
(2)Temp (°C)	-0,00836 9	0,00							
1 by 2	0,008390	0,00							

