

Identificación y caracterización de enzimas hidrolíticas aptas para la producción de biocombustibles utilizando herramientas de metagenómica funcional

Tesis de Maestría
PEDECIBA Biología, Subárea Microbiología

María Cecilia Rodríguez Esperón

Director de Tesis: Dr. Francisco Noya

Tribunal: Dra. Susana Castro
Dr. José Sotelo Silveira
Dr. Raúl Platero

Departamento de Bioquímica y Genómica Microbianas
Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable
Montevideo, Uruguay, 2013.

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecerle a Francisco por toda su enseñanza, sus consejos y su eterna paciencia, y por darme la oportunidad de trabajar en este Instituto.

A todos mis compañeros de BIOGEM que muchos de ellos a esta altura ya son amigos muy cercanos y queridos (Vane, Rosco, Batti, Ceci (ex Lab, pero amiga y concubina) y Rufo), y a Elena, Ceci T, Cintia, Martín, Pupy, Inés, Fernanda, Arianne, Nacho, Ceci R, Ceci, Rafa y a Nilda.

A todos los compañeros de LEM (Alicia, Claudia, Nati, Liz, Dani, Gastón, Tandis, Paula y Jorge) y de MICROMOL (María, Anita, Mini, Karen, Vero, Silvia y Susana) y a los compañeros nuevos. También a Ceci M y a Uriel, por estar también a la distancia.

A mi familia (Angel, Chachi, Javi y a mi prima Fela) a mis amigas/os (Marian, Mari, Laurita, Inés, Clau, Silvia, Flor y Shei). Al Valente, Gustavo y al Dani por sus aportes técnicos a cualquier hora y en cualquier día de la semana.

Al tribunal (Susana, Rufo y Coya), por su paciencia, dedicación y buenos consejos.

Finalmente a todos aquellos que de alguna manera me ayudaron a realizar este trabajo.

Gracias.

TABLA DE CONTENIDO

Tabla de contenido	3
Tabla de figuras.....	7
Tabla de cuadros.....	9
Lista de abreviaturas.....	10
Lista de símbolos.....	12
Resumen.....	13
 1. Introducción	 15
1.1 Los biocombustibles	15
1.2 Tipos de biocombustibles	19
1.3 Un biocombustible alternativo.....	20
El biodiesel.....	20
1.3.1 Obtención de biodiesel.....	21
1.3.1.1 La transesterificación	22
1.3.1.2. Elección del solvente	23
1.3.1.3 Elección del catalizador	24
1.4 Propiedades del biodiesel	25
1.5 Fuentes de materia prima para la producción de biodiesel.....	26
1.6 Desventajas del proceso actual.....	27
2. Biocatalizadores	28
2.1 Lipasas y esterasas.....	30
2.1.1 Generalidades.....	30
2.1.2 Clasificación de enzimas lipolíticas	33
2.1.3 Producción de enzimas lipolíticas.....	36
2.1.4 Plegamiento y secreción	37
2.1.5 Aplicaciones biotecnológicas de lipasas y esterasas.....	39
3. Diversidad microbiana.....	39
4. Metagenómica.....	41
4.1 Aproximaciones utilizadas en metagenómica	42
4.1.1 Análisis basado en la secuencia	43
4.1.2 Análisis basado en la detección funcional	45

4.2 Construcción de bibliotecas metagenómicas	49
4.2.1 Selección del ambiente	49
4.2.2 Estrategias de clonado	50
4.2.3 Métodos de detección funcional	51
4.2.4 Selección del hospedero heterólogo	56
2. Hipótesis y Objetivos	58
2.1 Hipótesis de trabajo	58
2.2 Objetivo general	58
2.3 Objetivos específicos	58
3. Estrategia Experimental	60
3.1 Construcción de una biblioteca metagenómica a partir del contenido ruminal vacuno	60
3.1.1 Obtención de la fracción microbiana asociada al rumen vacuno	60
3.1.2 Gradiente diferencial de Percoll	62
3.1.3 Extracción y purificación del ADN genómico bacteriano	62
3.1.4 Construcción de la biblioteca metagenómica	64
3.1.4.1 Reparación y selección de fragmentos de ADN genómico de entre 40-50 Kb	64
3.1.4.2 Ligación del ADN genómico al vector y empaquetamiento de los fósidos en el fago lambda	65
3.1.4.3 Transformación de <i>E. coli</i> EPI300T1R por infección con el fago lambda	66
3.1.4.4 Colecta y almacenamiento de los clones transformantes	66
3.2 Selección de clones con actividad lipolítica	66
3.3 Identificación de genes responsables de actividad lipolítica	67
3.4 Análisis filogenético de las secuencias seleccionadas	69
3.5 Clonado del gen lipolítico lip10	69
3.5.1 Diseño de cebadores y amplificación del gen lip10	69
3.5.2 Predicción de hotspot o puntos calientes	70
3.5.3 Predicción del péptido señal	71
3.6 Sobreexpresión de la proteína recombinante Lip10	71
3.6.1 Construcción del plásmido recombinante pETlip10	71
3.6.2 Transformación del hésped de expresión	72

3.6.3 Crecimiento, inducción y solubilidad de lip10 en la cepa BL21 de <i>E.coli</i>	72
3.6.4 Purificación enzimática por cromatografía de afinidad.....	73
3.6.4.1 Obtención de la proteína recombinante Lip10 a partir del sobrenadante de medio de cultivo	73
3.6.4.2 Preparación del extracto celular	74
3.6.4.3 Purificación de la proteína recombinante Lip10.....	74
3.7 Caracterización bioquímica	75
3.7.1 Ensayo de actividad de Lip10 frente a diferentes sustratos	75
3.7.2 Determinación de la temperatura óptima de Lip10	76
3.7.3 Efecto del pH sobre la actividad de la enzima Lip10	76
3.7.4 Determinación de los parámetros cinéticos	77
4.Resultados.....	79
4.1 Construcción de una biblioteca metagenómica a partir del contenido ruminal vacuno.....	79
4.1.1 Colecta y procesamiento de las muestras	79
4.1.2 Extracción y purificación del ADN genómico bacteriano.....	82
4.1.3 Ligación, empaquetado y transformación	83
4.2 Selección de clones con actividad lipolítica	84
4.3 Identificación de clones con actividad lipolítica.....	86
4.3.1 Mutagénesis generalizada	86
4.3.2 Secuenciación.....	87
4.4 Clonación del gen lipolítico lip10	89
4.4.1 Motivos conservados en Lip10	90
4.4.2 Predicción del péptido señal.....	96
4.5 Análisis filogenético de las secuencias seleccionadas	97
4.6 Sobreexpresión de la proteína recombinante Lip10.....	99
4.6.1 Construcción del plásmido recombinante pETlip10	99
4.6.2 Verificación de la expresión y actividad enzimática	100
4.6.3 Inducción de 6xHislip10 en la cepa BL21 de <i>E. coli</i>	101
4.6.3.1 Predicción de <i>hotspot</i> o puntos calientes de Lip10.....	101
4.6.3.2 Estudio de la solubilidad de Lip10	102
4.6.4 Purificación de la proteína recombinante Lip10	105
4.7 Caracterización bioquímica de Lip10.....	107

4.7.1 Ensayo de actividad de Lip10 con diferentes sustratos	107
4.7.2 Efecto del pH sobre la actividad de Lip10.....	108
4.7.3 Efecto de la temperatura sobre la actividad de lip10	108
4.7.4 Determinación de parámetros cinéticos.....	109
5. Discusión y conclusiones	115
5.1 Estrategia experimental utilizada para la construcción de la biblioteca metagenómica	115
5.2 Detección funcional para actividad lipolítica	115
5.3 Enzimas encontradas	118
5.3.1 Sobreexpresión de la proteína recombinante Lip10	119
5.4 Caracterización filogenética de Lip10	121
5.5 Caracterización bioquímica de Lip10.....	121
5.6 Perspectivas.....	124
6. Anexos.....	128
6.1 Medios de cultivo.....	128
6.2 Tampones generales.....	129
6.3 Soluciones utilizadas para la purificación de la proteína recombinante 6xHisLip10.....	129
6.4 Soluciones utilizadas en electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE).....	130
6.5 Soluciones utilizadas en electroforesis en geles de agarosa	132
6.6 Protocolos	132
6.6.1 Preparación de células electrocompetentes	132
6.6.2 Preparación de células de quimiocompetentes	132
6.6.3 Transformación mediante choque térmico.....	133
6.7 Tabla de cepas.....	134
6.8 Tabla de vectores.....	134
6.9 Mapas de vectores	134
6.9.1 Mapa del vector pCC1FOS	134
6.9.2 Mapa del vector pET14b	136
7. Bibliografía.....	137

TABLA DE FIGURAS

Figura 1: Consumo energético mundial en MTOE.....	16
Figura 2: Determinación mensual del promedio global de CO ₂ atmosférico sobre diferente sitios de la superficie marina, realizada por Mauna Loa Observatory Hawaii.	17
Figura 3: Reacción de transesterificación (alcoholólisis) a partir de un TAG para producir biodiesel.	23
Figura 4: Tipos de enzimas utilizadas en biotransformaciones industriales.	28
Figura 5: Topología característica de la familia de las α/β hidrolasas.....	29
Figura 6: Reacciones químicas catalizadas por las lipasas	32
Figura 7: Vías utilizadas por las bacterias Gram positivas y Gram negativas para secretar las enzimas lipolíticas.....	37
Figura 8: Estrategia para la construcción y tipo de aproximación utilizada en una biblioteca metagenómica	43
Figura 9: Esquema del protocolo seguido para el procesamiento de rumen vacuno	61
Figura 10: Resultado de la centrifugación isopícnica en gradiente Percoll.....	79
Figura 11: Microscopía de las fracciones obtenidas luego del procesamiento de la muestra de rumen vacuno	81
Figura 12: Gel de agarosa 1% con las distintas fracciones (Lq, As y Ad) extraídas con lisis química y con lisis química/mecánica (esferas de zirconia)	82
Figura 13: Selección de fragmentos para la construcción de la biblioteca metagenómica	83
Figura 14: Clones con actividad lipolítica en medio tributirina 1%,	85
Figura 15: Identificación de clones que perdieron la actividad lipolítica en medio tributirina 1% obtenidos por mutagénesis generalizada <i>in vitro</i> utilizando el transposón Tn5 <Km>	86
Figura 16: Gel agarosa 1% con el producto de la amplificación del gen lip10.....	89
Figura 17: Secuencia aminoacídica de la proteína Lip10.....	91
Figura 18: Resultado de los alineamientos realizados con el ORF traducido de Lip10 con sus homólogos más cercanos.....	93
Figura 19a: Estudio de filogenia de Lip10, su homólogo más cercano EST5S, Lip 5 , Lip6 y las representantes de todas las familias de enzimas lipolíticas.	94
Figura 19b: Estudio de filogenia de Lip10, su homólogo más cercano EST5S, Lip 5, Lip6 y las representantes de todas las familias de enzimas lipolíticas.	95
Figura 20: Resultados de la predicción del péptido señal de la proteína Lip10, utilizando el programa SignalP4.0.	96
Figura 21: Gel agarosa 1% de los perfiles de restricción realizados con las enzimas	100
Figura 22: Placa de medio de selección para actividad lipolítica, utilizando tributirina-rodamina	

B	101
Figura 23: Área normalizada de los hotspot de la 6xHislip10.....	101
Figura 24: Estudio de la solubilidad de Lip10	102
Figura 25: Gel SDS-PAGE de la inducción de la expresión de Lip10 a 30°C durante 4 horas	104
Figura 26: Gel SDS-PAGE de la inducción de la expresión de Lip10 a 18°C durante 17 horas	104
Figura 27: Gel SDS-PAGE de la purificación Lip10.....	106
Figura 28: Actividad de Lip10 frente a diferentes sustratos.....	107
Figura 29: Determinación del pH óptimo de Lip10.....	108
Figura 30: Determinación de temperatura óptima de Lip10	109
Figura 31: Curva de Michaelis-Menten de la proteína purificada Lip10.	110
Figura 32: Curva de Lineweaver-Burk de la proteína purificada Lip10.	111
Figura 33: Curva de Eadie-Hofstee de la proteína purificada Lip10.	112

TABLA DE CUADROS

Tabla 1: Enzimas microbianas aisladas de bibliotecas metagenómicas provenientes de diferentes ambientes	46
Tabla 2: Algunos métodos y sustratos utilizados para la detección de actividad lipolítica.	54
Tabla 3: Identificación de clones con actividad lipolítica.	85
Tabla 4: Resultados del análisis por blastp de los clones mutantes Lip5, Lip6 y Lip10 secuenciados.	88
Tabla 5: Resultados de los parámetros obtenidos de la predicción del péptido señal para Lip10.....	97
Tabla 6: Porcentajes de similitud de la secuencia de Lip10 con sus homólogos más cercanos.....	98
Tabla 7: Algunas propiedades y parámetros cinéticos (K_m , $V_{máx}$ y K_{cat}/K_m) de Lip10 y sus homólogos más cercanos.....	113

Lista de abreviaturas

Amp	ampicilina
ATP	adenosil trifosfato
CaCl ₂	cloruro de calcio
Chl	cloramfenicol
CO ₂	dióxido de carbono
CTAB	bromuro de cetiltrimetil amonio
CoSO ₄	sulfato de cobalto
CuCl ₂	cloruro de cobre
D.O	densidad óptica
DMS	dimetilsulfóxido
dNTP	ácido desoxiribonucleótido
EDTA	ácido etileno-diamino-tetraacético
kDa	Kilo Dalton
Km	Kanamicina
FeSO ₄	sulfato ferroso
HCl	ácido clorhídrico
HEPES	"4-(2-Hydroxyethyl) piperazine)-1-ethanesulfonic acid"
IPTG	Isopropil β-D-1-tiogalactopiranósido
MES	"4-Morpholineethanesulfonic acid sodium salt"
MgSO ₄	sulfato de magnesio
MnCl ₂	cloruro de manganeso
MgCl ₂	cloruro de magnesio
NaAc	acetato de sodio
NaH ₂ PO ₄	fosfato di ácido de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
NaCl	cloruro de sodio
NH ₄ SO ₄	sulfato de amonio
NiSO ₄	sulfato de níquel
ORF	"open Reading frame"
pNP	paranitrofenil

PMSF	"(phenyl-merhyl)-sulfonyl fluoride"
RNAsa	ribonucleasa
SDS	dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante en presencia de SDS
TEMED	"Tetramethylethylenediamine"
ZnSO ₄	sulfato de zinc

Lista de símbolos

Chl	Centímetros
g	gramo
Gb	giga bit
kpb	kilo pares de base
Kv	kilovolts
M	molar
Mb	mega base
ml	mililitro
min	minuto
mM	milimolar
mm	milímetro
mg	miligramo
ng	nanogramo
l	litro
pb	pares de bases
pg	pico gramo
ppm	parte por millón
seg	segundos
V	volts
U	unidad
xg	gravedad
µg	microgramos
µl	microlitro
%	por ciento
U\$S	dólares
°C	grados Celsius

RESUMEN

La producción de biodiesel por transesterificación química es costosa y desfavorable para el medio ambiente. Una alternativa es el uso de enzimas como las enzimas lipolíticas. Con el objetivo de identificar nuevas enzimas lipolíticas con potencial aplicación en la producción de biodiesel o en otros procesos biotecnológicos, se construyó una biblioteca metagenómica de 30.000 clones a partir de la fracción bacteriana libre (no asociada a las fibras) presente en el rumen vacuno. Utilizando fósmidos capaces de albergar fragmentos de hasta 40Kb se generó una biblioteca metagenómica con un tamaño total de 1.2 Gb aproximadamente. Se obtuvieron 8 clones con actividad lipolítica en medio con gliceril tributirato. Los genes responsables se identificaron mediante mutagénesis generalizada y por secuenciación. Uno de estos clones, denominado Lip10, no reveló una alta homología con las familias de enzimas lipolíticas descritas. Sin embargo, presentó una alta homología con una esterasa, Est5, proveniente de una bacteria no cultivable, la cual es miembro del clan AB hidrolasa. Est5S, junto con dos esterasas EstGK1 y EstZ3 presentaron una alteración de la tríada catalítica S-D/E-H, la cual es altamente conservada en la mayoría de las familias de enzimas lipolíticas. Estos resultados sugerirían que Lip10 junto con estas proteínas podrían formar parte de una nueva familia de enzimas lipolíticas denominada familia GHSQG. El ORF de Lip10 fue clonado y expresado como una proteína recombinante, la cual fue caracterizada de forma parcial bioquímicamente. Lip10 hidrolizó derivados de p-nitrofenilos de cadena $\leq$ a 10 átomos de carbono, lo cual era indicativo de su actividad esterasa. Por otro lado, presentó un rango de temperatura óptima entre 35°C y 40°C, y un pH óptimo en el rango entre 8.0 y 8.5. Además, se determinaron los parámetros cinéticos K_m 0.23 mM, $V_{m\acute{a}x}$ 2.37 U/mg, K_{cat} 13,67 s⁻¹ y K_{cat}/K_m 59,43 s⁻¹ mM⁻¹ al utilizar p-nitrofenil butirato (C4) como sustrato. Los resultados obtenidos en este trabajo confirman el potencial de la metagenómica para el descubrimiento de nuevas enzimas con aplicaciones biotecnológicas.

INTRODUCCIÓN

- 1.1 Los biocombustibles
- 1.2 Tipos de biocombustibles
- 1.3 Un combustible alternativo
El biodiesel
- 1.4 Propiedades del biodiesel
- 1.5 Fuentes de materia prima para la
producción de biodiesel
- 1.6 Desventajas del proceso actual
- 2.0 Biocatalizadores
- 2.1 Lipasas y esterasas
- 3.0 Diversidad microbiana
- 4.0 Metagenómica
- 4.1 Aproximaciones utilizadas en
metagenómica
- 4.2 Construcción de bibliotecas
metagenómicas

1. Introducción

1.1 Los biocombustibles

Los combustibles fósiles como el petróleo, el carbón y el gas natural, son la base de la sociedad industrial, ya que aportan un alto porcentaje de la energía primaria empleada en el mundo. El petróleo es un recurso natural no renovable, de origen fósil, compuesto por una mezcla homogénea de compuestos orgánicos, principalmente hidrocarburos, en su mayoría parafinas, naftenos y compuestos aromáticos, así como también sulfuros orgánicos, y trazas de metales como sodio, níquel, hierro y plomo.

Durante las últimas décadas, el consumo del petróleo se incrementó en una media de 0.6 billones de barriles diarios (b/d), y se estima que alcance valores de 88 billones de (b/d). En respuesta a ello, con el fin de cubrir la gran demanda mundial, la producción global de petróleo se ha incrementado en 1.1 millones de (b/d). Hacia fines del 2011, las reservas mundiales de petróleo se incrementaron en 1652.6 billones de (b/d), suficiente para cubrir la producción del mismo durante 54.2 años (medido a través de la relación reservas/producción) (24).

En el año 2011, el consumo de energía mundial aumentó en un 2.5%. En comparación con otras fuentes energéticas, como ser la energía hidroeléctrica, la energía nuclear, las energías renovables, el gas natural y el carbono, el petróleo continúa siendo la principal fuente de consumo de energía global con un 33.1% (24) (Figura 1).

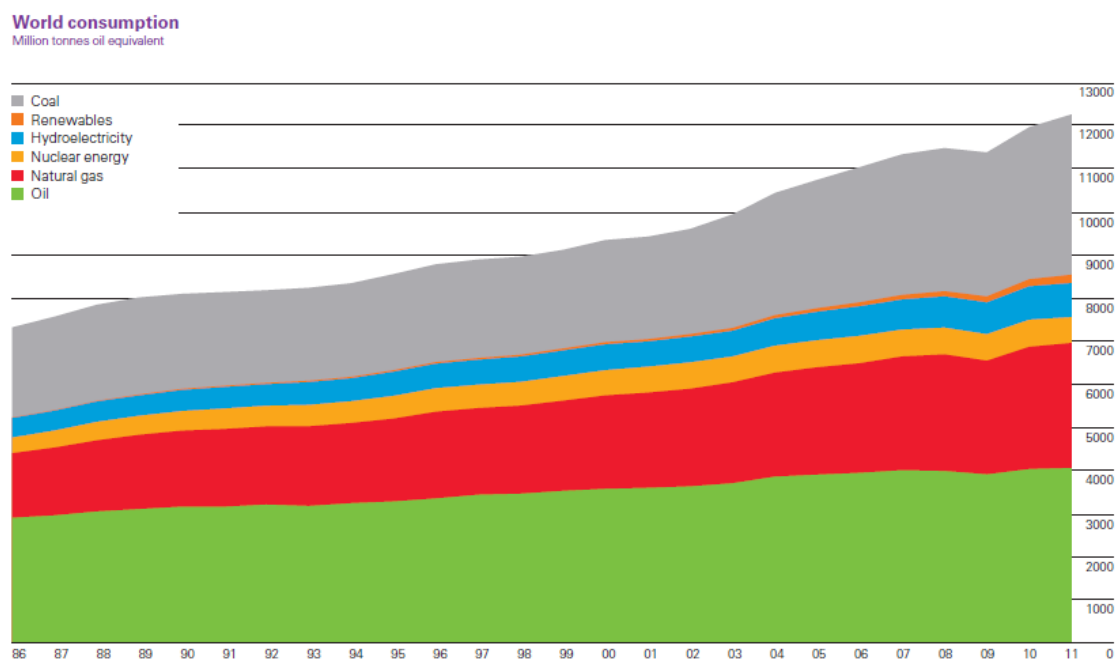


Figura 1: Consumo energético mundial en MTOE (equivalente en millones de toneladas de petróleo). Tomado de BP Statistical Review of World Energy (24).

En los últimos años se ha venido observando un aumento en la concentración atmosférica de gases con efecto invernadero debido al repunte de la actividad industrial tras la crisis económica global, a la destrucción de bosques tropicales y al uso generalizado de combustibles fósiles como el petróleo y el carbón (61). El CO_2 es el gas que más se vincula con el efecto invernadero. El CO_2 es constantemente intercambiado a través de la atmósfera, en los océanos, plantas, microorganismos y animales. Sin embargo, para asegurar la supervivencia de los mismos, se debe mantener un equilibrio entre las emisiones y las remociones del CO_2 .

Datos reportados por el Observatorio Mauna Loa en Hawaii, indican que la concentración del CO_2 atmosférico se incrementó rápidamente. En comparación con el año 2011, se detectó un incremento de 388.13 ppm de CO_2 a 390.53 ppm de CO_2 (61) (Figura 2).

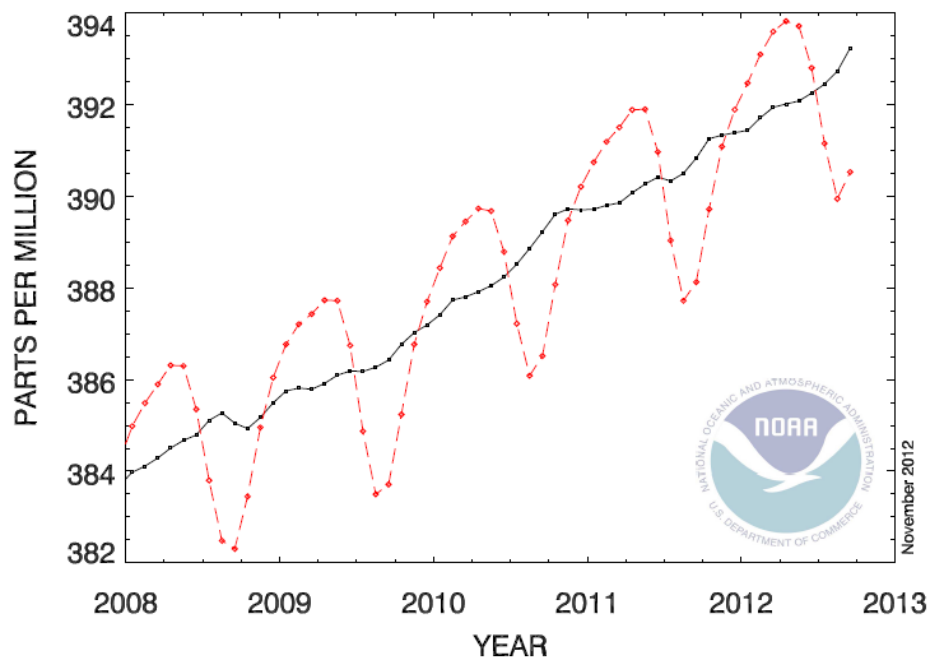


Figura 2: Determinación mensual del promedio global de CO_2 atmosférico sobre diferente sitios de la superficie marina, realizada por Mauna Loa Observatory Hawaii. La línea roja (con símbolos con forma de diamantes) representa los valores de la media mensual. Por otro lado la línea negra (con los símbolos cuadrados) representa los valores de la media mensual luego de realizar una corrección en base al ciclo medio estacional. Los datos son reportados como la fracción molar de aire seco, definida como la fracción del número de moléculas de dióxido de carbono y el número total de todas las moléculas en el aire, luego que el vapor de agua es removido. La fracción molar es expresada como parte por millón (ppm). Tomada de Trends in Atmospheric Carbon Dioxide (61).

Se denomina efecto invernadero al aumento de temperatura global en la superficie de la Tierra debido a la retención de energía infrarroja provocada por el aumento de determinados gases en la atmósfera. A estos gases se los denomina gases con efecto invernadero o "Greenhouse Gases" (GHGs). La consecuencia de este aumento de la temperatura de la superficie de la Tierra, provoca un cambio climático a nivel global.

Los principales gases con efecto invernadero son el dióxido de carbono (CO_2), el metano (CH_4), el óxido de nitrógeno (N_2O) y clorofluorocarbonos (CFCs), como por ejemplo el hexafluoruro de sulfuro (SF_6) (136). La principal fuente de emisión del CO_2 hacia la atmósfera es la quema de combustibles fósiles y biomasa en procesos industriales, en el transporte, y en las actividades domiciliarias (cocina y calefacción) (183, 250).

En el caso del metano la principal fuente natural de producción son los pantanos. El metano se produce también en la descomposición anaerobia de desechos en los rellenos sanitarios y en la descomposición de materia fecal de animales. Así como también, en la producción y distribución de gas y combustibles, y durante la combustión incompleta de combustibles fósiles (216). Por otro lado, el aumento del óxido de nitrógeno en la atmósfera deriva del uso de fertilizantes nitrogenados. Este gas también aparece como subproducto de la quema de combustibles fósiles y biomasa, asociado a diversas actividades industriales como la producción de nylon y producción de ácido nítrico (107). Dentro del grupo de los clorofluorocarbonos se encuentra el hexafluoruro de sulfuro que es un gas utilizado principalmente por la industria de energía eléctrica. A causa de su inercia y propiedades dieléctricas, este gas es el preferido de la industria para el aislamiento eléctrico, la interrupción de la corriente y la extinción de arco en la transmisión y en la distribución de la electricidad. Además, los CFCs son liberados hacia el ambiente contribuyendo a la pérdida de ozono (254).

La capacidad de todos estos gases para absorber la radiación térmica varía mucho. Datos estadísticos reportaron que los halógeno-alcanos es el grupo de gases con mayor efecto invernadero. Actualmente, presentan un crecimiento anual con un 4%, en comparación con el CH_4 (0.8%), CO_2 (0.4%) y N_2O (0.2%) (57). Sin embargo, como se comentó anteriormente, el CO_2 es el gas que más contribuye al calentamiento global.

Además, estudios han demostrado que en USA en el año 2010, la contribución del CO_2 al efecto invernadero, proveniente de actividades realizadas por el hombre fue del 84% en comparación con los años anteriores (66). Por lo cual, la utilización de estrategias con el fin de disminuir las emisiones de los gases con efecto invernadero deberían ser implementadas rápidamente.

Por otro lado, recientemente, debido al incremento en los precios del petróleo crudo (US\$ 111.26 por barril en el 2011, lo cual correspondió a un 40% de aumento con respecto al 2010), a los recursos limitados de las fuentes fósiles y a las dificultades ambientales causadas por los gases de invernadero tales (contaminación local del aire y el calentamiento global) se ha dirigido el interés hacia otras fuentes

renovables de energía como ser biocombustibles líquidos (bioetanol, biodiesel y biometanol), biogás, 2,5 dimetilfurano o DMF y biohidrógeno (52, 134, 171, 185).

1.2 Tipos de biocombustibles

Los biocombustibles hacen referencia a combustibles sólidos, líquidos o gaseosos, derivados de la materia orgánica. Los biocombustibles se dividen en biocombustibles primarios y secundarios. Así mismo, estos últimos se dividen en biocombustibles de primera, segunda y tercera generación. Los combustibles primarios utilizan materia prima sin un procesamiento previo como ser la leña, chips de madera y residuos de semillas, los cuales son utilizados por ejemplo para uso doméstico o la producción de electricidad. Los combustibles secundarios, son combustibles primarios que han sido procesados y producidos como combustibles sólidos, líquidos (etanol y biodiesel) gaseosos (biogás y biohidrógeno). La tercera generación de biocombustibles son aquellos que se pueden producir a partir de cultivos específicos como las microalgas, la cuales constituyen una alternativa energética más viable, la cual supera las limitaciones de las primera y segunda generación de biocombustibles (60, 165). La principal ventaja de estas clases de biocombustibles es la utilización de fuentes renovables y naturales para su producción, la cual tiene una mayor distribución geográfica, en comparación con los combustibles fósiles. Además, la producción de energía proporciona una independencia y seguridad en el suministro de energía. La primera generación de biocombustibles, las constituyen los combustibles líquidos que son producidos a partir de azúcares, de granos o de semillas. Por ejemplo, el bioetanol es producido a partir de la fermentación de azúcares provenientes de plantas como la caña de azúcar y del almidón de plantas de maíz. En el caso del biodiesel es producido a partir de aceites vegetales obtenidos de semillas oleaginosas como ser el girasol, la colza y la soja (177). La segunda generación de biocombustibles son generalmente producidos a partir de residuos orgánicos y biomásas lignocelulósicas. Por ejemplo, el etanol producido a partir de celulosa. El proceso de obtención consiste en convertir la celulosa en azúcares, la cual puede provenir de pastos perennes, restos de cosechas, tallos de maíz, bagazo de la caña de azúcar y de residuos orgánicos municipales. La principal ventaja de esta segunda clase de biocombustibles es que

los materiales utilizados no compiten con la producción alimenticia (85, 163, 205).. En el caso de los biocombustibles de tercera generación las microalgas son capaces de producir entre 15-300 veces más cantidad de biodiesel en comparación con el proceso tradicional de obtención del biocombustible. La utilización de microalgas para la producción de biocombustibles en comparación con la utilización de otros cultivos, presenta varias ventajas. Las microalgas sintetizan y acumulan grandes cantidades de lípidos (entre el 20-50% del peso seco de biomasa), requieren menor cantidad de agua, tienen bajos requerimientos nutricionales y no necesitan la aplicación de herbicidas o pesticidas (28). Además, las microalgas captan el CO₂ proveniente de la combustión de otros combustibles fósiles, disminuyendo el efecto invernadero. También, pueden ser cultivadas en diversos ambientes, presentan períodos de cosecha mucho más cortos (que varía entre 1 a 10 días), lo cual permite una cosecha continua y de alta producción (206). Además, su cultivo no compite con áreas para la agricultura convencional. También presenta la ventaja que dependiendo de la especie de microalga utilizada, otros componentes con aplicaciones biotecnológicas como polisacáridos, pigmentos, antioxidantes y proteínas pueden ser extraídos (28, 165).

1.3 Un biocombustible alternativo

El biodiesel

Desde el año 2005, nuestro país ha desarrollado cadenas agroindustriales en la búsqueda de un cambio en la matriz energética ya existente, generando nuevas fuentes de trabajo e incorporando nuevas tecnologías, que disminuyan el consumo del petróleo, las emisiones que producen el efecto invernadero y los efectos nocivos sobre la salud. Además, se aprobó una ley (Artículo 7, Ley 18.195) que obliga a la elaboración de biocombustibles con materias primas orgánicas nacionales. Esta ley obliga a la incorporación de hasta un 2% de biodiesel en el gasoil y hasta un 5% de bioetanol en las naftas. Una alternativa energética promisorio que ha resultado muy atractiva en los años recientes es la producción y utilización del biodiesel como combustible alternativo (58, 198).

El biodiesel, se define como un combustible de uso alternativo al diesel, producido a partir de una fuente biológica renovable como son los aceites vegetales o grasas

animales (170). Es biodegradable, no tóxico y con baja producción de emisiones con efecto invernadero, por lo cual estas su utilización es beneficiosa desde el punto de vista ambiental (236).

Según la ASTM (American Society for Testing and Materials) el biodiesel se define como un biocombustible compuesto por monoalquil ésteres de ácidos grasos de cadena larga, derivado de aceites vegetales o grasas animales, que cumplen los requerimientos de la norma ASTM D6751 (1). Sin embargo, los aceites vegetales y las grasas animales están fundamentalmente compuestos por triacilglicéridos (TAG), los cuales consisten en largas cadenas de ácidos grasos unidos por enlaces éster al glicerol.

1.3.1 Obtención de biodiesel

Desde un punto de vista técnico no es viable la utilización directa de aceites vegetales en motores diesel debido a su elevada viscosidad, baja estabilidad frente a la oxidación y a su baja volatilidad. Por estos motivos los aceites vegetales tienen que ser procesados con el fin de que puedan adquirir las propiedades necesarias para poder ser utilizados en los motores diesel.

La producción de biodiesel se puede llevar a cabo a través de: uso directo de aceites o mezclas de éstos con diesel fósil, por medio de microemulsiones, por medio de pirólisis y por medio de una reacción de transesterificación o alcoholisis (170, 251).

Las microemulsiones, son dispersiones (de aceite, agua y tensoactivos) isotrópicas, transparentes y termodinámicamente estables. Mediante este proceso, se puede obtener un combustible de baja viscosidad. Sin embargo, la inyección de este combustible en un motor no resulta eficiente y da lugar a una combustión incompleta. La microemulsión con alcoholes tales como metanol, etanol o 1-butanol disminuye la viscosidad del biodiesel.

La pirólisis consiste en la aplicación de energía térmica (400°C-750°C) a la materia prima (residuos orgánicos) en presencia de aire u oxígeno con el fin de obtener un producto con características similares a un combustible. La utilización de las tres

primeras alternativas en motores diesel es impráctica e insatisfactoria, ya que ocasiona problemas como ser la obstrucción de los inyectores, la formación de depósitos de carbono, la combustión incompleta, el desgaste excesivo del motor y el daño del lubricante. La transesterificación consiste en la reacción entre TAG (contenidos en el aceite) y un aceptor de grupos acilo. Dependiendo de la naturaleza de estos aceptores la reacción es denominada acidólisis (si el aceptor es un ácido carboxílico), alcoholólisis (si el aceptor es un alcohol) e interesterificación (si el aceptor es otro éster).

1.3.1.1 La transesterificación

Actualmente, la mayoría del biodiesel es producido mediante la reacción de transesterificación, debido a su rapidez y a las condiciones moderadas (baja presión y temperatura de 50°C) que la caracterizan (77, 166, 236). En la reacción de transesterificación, un TAG reacciona con un alcohol monohidratado o alcohol primario (como ser metanol) en presencia de un catalizador químico, a elevada temperatura, para formar alquil ésteres de ácidos grasos y glicerol. Esta reacción está afectada por la relación molar entre los TAG y el alcohol, por el tipo de catalizador utilizado ácido o alcalino, por la temperatura, por el tiempo de reacción, por los ácidos grasos libres y por el contenido de agua en la materia prima (236). En esta reacción, la materia prima con un alto contenido de agua o con un contenido de ácidos grasos libres (Free Fatty Acids) (FFA), requiere un pretratamiento con un catalizador ácido con el fin de esterificar los FFA (120, 253).

En la reacción de transesterificación, un TAG reacciona con un alcohol monohidratado o con un alcohol primario en presencia de un catalizador a elevada temperatura, para formar alquil ésteres de ácidos grasos (Fatty Acids Alkyl Ester) (FAAE) y glicerol (Figura 3). En esta reacción la conversión del TAG en biodiesel es un proceso de varias etapas. El alcohol inicialmente reacciona con el TAG como un anión alcóxido para producir FAAE y diacilglicerol (DAG), el cual reacciona rápidamente con el alcóxido para liberar otra molécula de FAAE y generar monoacilglicerol (MAG). Finalmente, los MAG sufren una alcoholólisis para generar glicerol y FAAE. En la reacción global se producen 3 moles de biodiesel o FAAE y 1

mol de glicerol, por cada mol de TAG utilizado. La reacción de transesterificación es reversible. Sin embargo, la reacción reversa en la cual a partir de los FFAE y glicerol se forman MAG es insignificante, lo cual es debido a que el glicerol no es miscible con los FFAE, específicamente con los metil ésteres de ácidos grasos (Fatty Acid Methyl Ester) (FAME), los cuales son producidos cuando se utiliza metanol como alcohol. La reacción se define como bifásica al comienzo y al final de la producción de biodiesel, lo cual es debido a que el metanol, los aceites vegetales, el glicerol y los FAME no son miscibles entre sí.

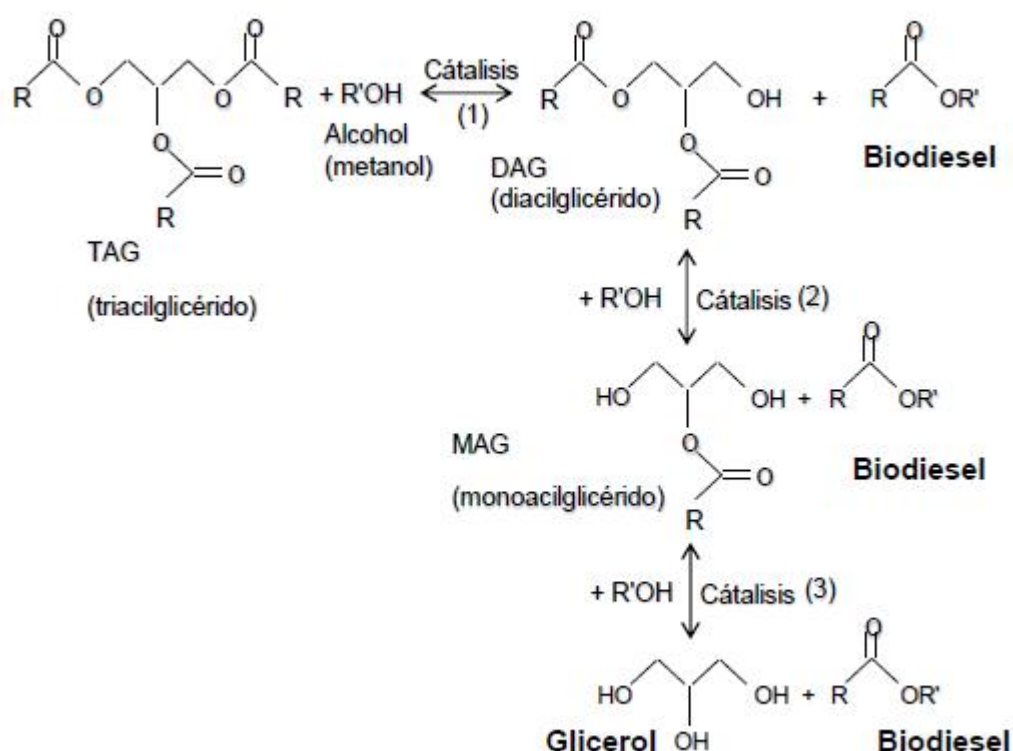


Figura 3: Reacción de transesterificación (alcoholólisis) a partir de un TAG para producir biodiesel.

1.3.1.2. Elección del solvente

Debido a su bajo costo en comparación a los otros alcoholes, generalmente el metanol es el alcohol más utilizado en la producción industrial del biodiesel, y en menor grado el etanol. Además, el metanol es más reactivo y los ésteres metílicos de los ácidos grasos son más volátiles que los correspondientes ésteres etílicos. Sin

embargo, el etanol es menos tóxico y puede obtenerse a partir de fuentes renovables por fermentación (170). También, la alcoholisis puede llevarse a cabo con otros alcoholes como ser propanol, butanol, isopropanol, tert-butanol, alcoholes ramificados y octanol, aunque incrementaría mucho el costo total de la operación (117).

1.3.1.3 Elección del catalizador

La reacción de transesterificación puede llevarse a cabo mediante el uso de catalizadores ácidos (ácido sulfúrico, fosfórico, clorhídrico o sulfónico), alcalinos (hidróxido de sodio o de potasio) o enzimáticos (enzimas lipolíticas).

En el caso de la catálisis ácida, es muy poco utilizada por la industria, debido a que los ácidos utilizados presentan la característica de ser corrosivos, por lo cual pueden provocar daños en el equipamiento (75). Actualmente, los procesos de producción de biodiesel a nivel industrial utilizan catalizadores básicos ya que actúan mucho más rápido, permiten operar en condiciones moderadas de reacción (temperaturas y presiones bajas), la reacción es menos costosa y es más completa químicamente (18, 19, 54, 74, 223).

Algunas industrias utilizan catalizadores alcalinos como ser el metóxido de sodio, ya que no se forma agua en la reacción con el alcohol en comparación con la utilización de hidróxido de sodio (255). Otros alcóxidos, como el etóxido de calcio pueden ser utilizados de forma eficiente como catalizadores. Sin embargo, se requieren mayores cantidades de metanol, y determinadas condiciones catalíticas. El inconveniente que presenta este tipo de catalizadores alcalinos es que deben de ser anhidros para evitar que se produzcan reacciones secundarias como la saponificación y que los TAG deban contener una baja proporción de ácidos grasos libres ($<0,5\%$) para evitar que se neutralicen con el catalizador y que también se formen jabones, lo cual conlleva a una disminución del rendimiento (156). Otro inconveniente en el uso de catalizadores alcalinos, es que se deben tratar los efluentes alcalinos generados, lo que supone el consumo de una gran cantidad de agua durante las etapas de lavado y purificación. Además, del proceso de obtención

de biodiesel también se obtiene como subproducto glicerol, que debe ser separado debido a su alta viscosidad y que a menudo se encuentra contaminado con el catalizador alcalino empleado. Por lo cual la utilización de un catalizador alcalino no resulta ser un método beneficioso ni desde el punto de vista operacional ni desde el punto de vista ambiental.

El proceso de obtención de biodiesel, utilizando un catalizador enzimático como son las lipasas en comparación con la catálisis alcalina presenta varias ventajas. Al utilizarse un catalizador enzimático el proceso es llevado a cabo en una menor cantidad de pasos, se utiliza una menor cantidad de energía (se trabaja a temperaturas menores de 50°C) y se reduce drásticamente la cantidad de agua residual. Las lipasas son producidas por los eucariotas y procariotas y su producción puede ser tanto extracelular como intracelular. Además, estas enzimas son capaces de catalizar la transesterificación (11, 90, 119, 166, 179, 214).

1.4 Propiedades del biodiesel

En contraste con el diesel de petróleo, el biodiesel ofrece varias ventajas ya que es una fuente de energía renovable y biodegradable (se degrada cuatro veces más rápido que el diesel) produce menos emisiones indeseables (CO, hidrocarburos aromáticos policíclicos, partículas de hollín, óxidos de azufre y nitrógeno, metales) durante su combustión debido a su estado oxigenado, siendo por ende menos nocivas (67).

El biodiesel es considerado un combustible alternativo muy atractivo desde el punto de vista industrial y comercial, ya que podría ser capaz de sustituir al diesel del petróleo. Por otro lado, el biodiesel es miscible con el diesel del petróleo en cualquier proporción, por lo cual puede ser utilizado, ya sea directamente (B100) o en mezclas biodiesel-diesel del petróleo 2% (B2), 5% (B5) y 20% (B20) (3, 207).

Además, el biodiesel posee propiedades lubricantes, las que reducen el desgaste del motor y es un material seguro para su transporte, almacenamiento y manejo, debido a su baja volatilidad y elevado punto de inflamación o "flash point" (100°C-

170°C). Además, contiene cantidades insignificantes de sulfuro, por lo que no genera dióxido de azufre, el cual contribuye a la contaminación ambiental. Asimismo, el biodiesel puede utilizar la misma infraestructura actual de almacenamiento y distribución para el diesel del petróleo. También, debido a la similitud de las propiedades físicas y químicas del diesel del petróleo con las del biocombustible, su uso no requiere de modificación alguna en los motores diesel convencionales. Sin embargo, presenta desventajas como ser el alto costo de la fuente de materia prima utilizada y la baja estabilidad oxidativa. Además, en el caso de que la calidad del biodiesel sea baja, podría incrementar las emisiones de óxido de nitrógeno, las cuales no son beneficiosas para la salud. También, el contenido energético del biodiesel es menor que el del diesel del petróleo, por lo cual su consumo es mayor. Estos inconvenientes pueden ser mejorados a través de la utilización de sistemas de refrigeración para el combustible, el uso de antioxidantes, aditivos, y mezclas con diesel del petróleo y/o por medio de la disminución del tiempo de almacenamiento (17, 35, 55, 91, 168, 211, 221, 222).

1.5 Fuentes de materia prima para la producción de biodiesel

Los aceites vegetales son la principal materia prima para la producción de biodiesel, razón por la cual el desarrollo de cultivos de alto contenido oleaginoso, ha sido objeto de estudios exhaustivos. Las principales materias primas utilizadas a nivel mundial para la producción de biodiesel son los aceites vegetales convencionales (aceite de girasol, colza, soja, coco, maní, oliva, mostaza y palma), aceites de semillas modificadas genéticamente (aceite de girasol de alto contenido de ácido oleico) y grasas animales (sebo de vaca o de búfalo) y aceites de frituras (151, 219). El mercado creciente de producción de biodiesel a partir de aceites vegetales comestibles, requiere la utilización de tierras fértiles, lo cual podría llevar a crisis alimentarias ante la escasez de los mismos. Por otro lado, el elevado costo de la materia prima, la cual contribuye del 50 al 90% del precio de producción del biodiesel, ha obstaculizado la comercialización del biocombustible. Por este motivo es que se ha propuesto el uso de aceites de desecho y de grasas animales, alternativa que no ha sido satisfactoria a causa de los gastos adicionales para el refinamiento y la transesterificación del material utilizado (59, 170).

1.6 Desventajas del proceso actual

La obtención de biodiesel a partir de plantas oleaginosas (comestibles y no comestibles) está limitada por varios inconvenientes como los largos períodos de producción inherentes a la tecnología agrícola, el rendimiento lipídico restringido, la dependencia de las condiciones climáticas, la ubicación geográfica, la fertilidad de los suelos y la variedad cultivada. Sin embargo, la principal dificultad es la extensa superficie de cultivo requerida y el enorme volumen de agua necesario para el riego. En base a ello se ha propuesto una alternativa prometedora a la obtención de aceites a partir de cultivos de microalgas. La sustentabilidad de la industria del biodiesel requiere de materias primas alternativas que permitan operar continuamente y superar las limitaciones señaladas tal como las algas verdes y las diatomeas (34, 105).

Como se comentó anteriormente, el proceso de obtención de biodiesel más utilizado en la industria es por medio de la transesterificación alcalina. En algunos casos, en los cuales la materia prima contiene un alto contenido de ácidos grasos libres (FFA) (por ejemplo al utilizarse grasas animales o aceites usados), se requiere un pretratamiento con un catalizador ácido con el fin de esterificar los FFA (120, 253). Este pretratamiento previo a la transesterificación, es necesario para reducir la formación de jabones (sales de ácidos grasos) indeseables, formados durante la reacción y para facilitar la separación del glicerol del biodiesel, junto con el catalizador y el agua residual (166). Además, la obtención del agua residual y su reutilización ha sido uno de los problemas, tanto desde el punto de vista energético como del medio ambiente (138).

Por otro lado, la utilización de un catalizador enzimático como ser las lipasas, frente a la catálisis ácida o alcalina, presenta varias ventajas. El proceso de obtención de biodiesel es llevado a cabo en una menor cantidad de pasos, se utiliza una menor cantidad de energía y se reduce drásticamente la cantidad de agua residual (10, 11, 90, 166).

2. Biocatalizadores

Los catalizadores son sustancias que aumentan la velocidad de las reacciones químicas, sin que se lleguen a consumir los mismos durante la reacción y sin modificar el equilibrio de la misma. Las enzimas son catalizadores biológicos capaces de interactuar con una gran variedad de moléculas complejas y sustratos. Su aplicación en el procesamiento de materiales biológicos presenta muchas ventajas, en relación a una mayor eficiencia de reacción, menor gasto de energía y sustentabilidad ambiental (73). Estas características han provocado un gran aumento en la demanda industrial por nuevas enzimas con el fin de mejorar un proceso ya existente o el de desarrollar nuevos procesos (210). A causa de esto, el potencial económico asociado a los biocatalizadores es muy alto. El mercado global de enzimas está estimado en 2.3 billones de dólares por año, divididos en la industria de detergentes (U\$789 millones), industria alimenticia (U\$634 millones), en la agricultura (U\$376 millones), en la industria textil (U\$237 millones), en la industria del papel y en la producción de reactivos químicos (U\$222 millones) (159). En comparación con otras enzimas como ser las transferasas, las oxidorreductasas, las liasas, y las isomerasas, las hidrolasas han resultado de gran interés, ya que son las que más demanda han tenido en el mercado de las enzimas (Figura 4).

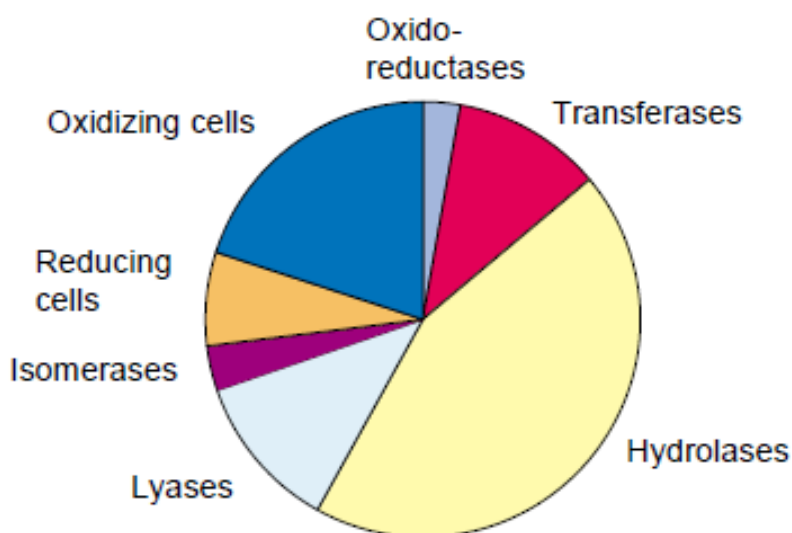


Figura 4: Tipos de enzimas utilizadas en biotransformaciones industriales. Las hidrolasas representan un 50% del mercado de biocatalizadores. Tomado de Straathof y colaboradores (226).

Desde el punto de vista estructural, las hidrolasas están compuestas por una región central de hojas β y α hélices (99). La organización canónica del plegamiento de las α/β hidrolasas está compuesto por 8 hojas β paralelas (con la excepción de la hoja $\beta 2$ que es antiparalela) envueltas en α hélices. También presentan la característica de un sitio activo formado por una tríada catalítica altamente conservada de un nucleófilo (serina, cisteína o ácido aspártico), posicionado luego de la hoja $\beta 5$, un residuo ácido posicionado luego de la hoja $\beta 7$, y un residuo de histidina altamente conservado, localizado luego de la última hoja β (Figura 5) (173).

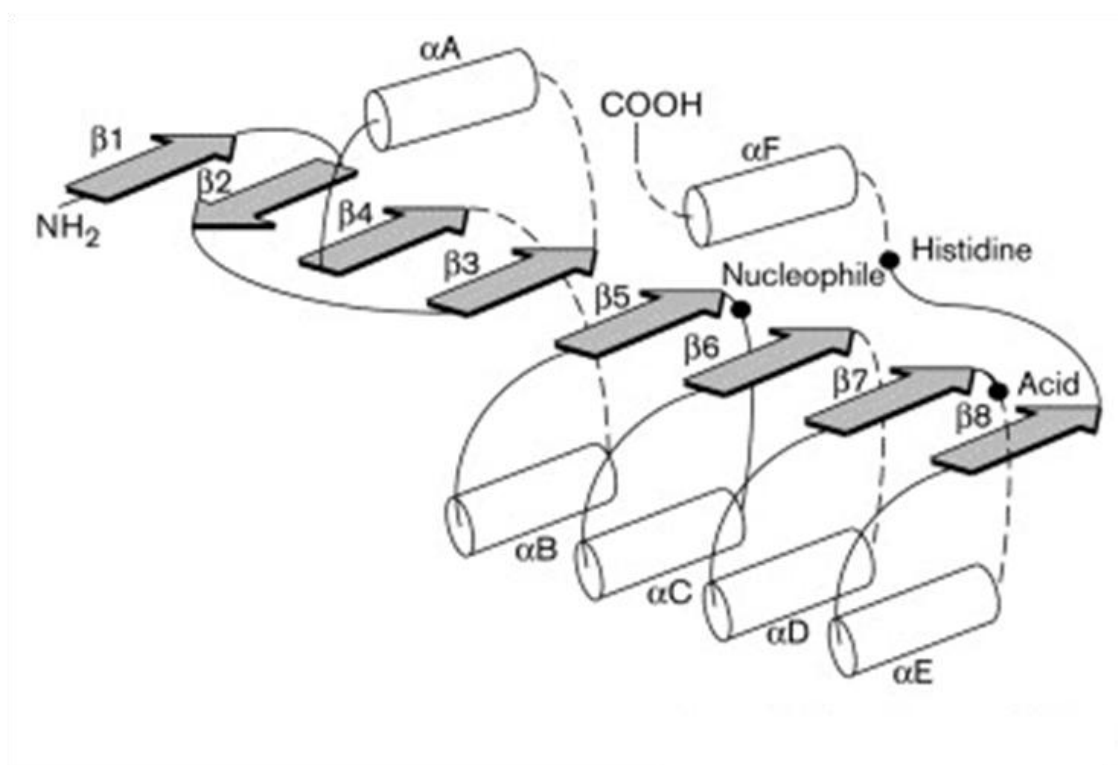


Figura 5: Topología característica de la familia de las α/β hidrolasas. Las α hélices son representadas por los cilindros y las hojas β por las flechas planas grises. Las posiciones topológicas de los residuos que forman el sitio activo están representadas por los círculos negros. El residuo nucleofílico se encuentra posicionado luego de la hoja $\beta 5$, el residuo de Aspartato/glutamato se encuentra después de la hoja $\beta 7$, y el residuo de Histidina se encuentra envuelto entre la hoja $\beta 8$ y la hélice αF . Tomado de Nardini y Dijkstra (173).

La familia de la α/β hidrolasas presentan características interesantes como ser una alta especificidad de sustratos, independencia de cofactores, termoestabilidad, actividad en pHs extremos y estabilidad en solventes orgánicos. Estas

características las ha llevado a ser el punto de atención para el campo de la biotecnología (22, 23). Las α/β hidrolasas más estudiadas son las amilasas, las celulasas, las proteasas, las esterasas y las lipasas (33, 130, 227, 252, 254).

2.1 Lipasas y esterasas

2.1.1 Generalidades

Las lipasas son enzimas ubicuas en la naturaleza producidas por plantas, animales, y microorganismos. Las lipasas de origen microbiano, mayoritariamente de bacterias y hongos, representan la clase de enzimas de origen metagenómico (Ver 4) más ampliamente utilizadas en aplicaciones biotecnológicas y en la química orgánica (89, 112, 248). Esto ha llevado a la clonación y caracterización de muchas de estas enzimas, así como al estudio de los mecanismos moleculares que controlan la expresión, el plegamiento y la secreción de las mismas (8, 182).

Tanto las lipasas como las esterasas pertenecen a la misma familia de α/β hidrolasas. Desde el punto de vista estructural la superfamilia de α/β hidrolasas definidas por Ollis y colaboradores en el año 1992, incluía una gran variedad de enzimas, de las cuales su actividad estaba relacionada con una tríada de residuos catalíticos normalmente formada por residuos de Serina, histidina y aspartato (180). En el caso de las lipasas y esterasas, la tríada está compuesta por residuos de serina, aspartato e histidina (S-D-H). El residuo de serina se encuentra en el centro de un pentapéptido conservado GXSXG, donde G es una glicina, X es cualquier aminoácido y S corresponde a la serina catalítica.

Las lipasas hidrolizan los enlaces éster de los acilglicéridos mediante la adición de una molécula de agua, dando lugar a los ácidos grasos libres y glicerol (89). Dependiendo de la cantidad de agua en la reacción son capaces de hidrolizar el enlace éster o de sintetizarlo (89, 111, 112). Una de las principales características de las lipasas consiste en que son enzimas muy versátiles, ya que pueden catalizar reacciones de hidrólisis sobre un amplio rango de lípidos, como ser TAG, ésteres hidrolizables y sales biliares (80, 160). Sin embargo, su producción puede ser

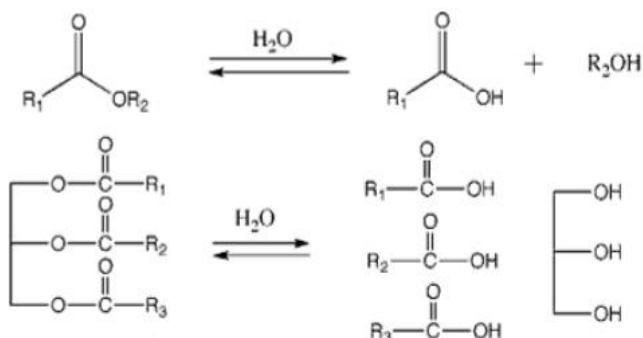
altamente influenciada por la presencia de otras fuentes de carbono, como ser azúcares y polisacáridos (81, 82, 160, 192).

Las lipasas pueden ser definidas como carboxilesterasas, que catalizan la hidrólisis de ésteres de glicerol de cadena larga. Sin embargo, no hay una definición descrita para el término “cadena larga”. Enzimas capaces de hidrolizar ésteres de glicerol con una cadena carboxílica de 10 átomos de carbono o más pueden ser consideradas lipasas (EC 3.1.1.1), mientras que las enzimas que actúan en ésteres de glicerol con una cadena menor a 10 átomos de carbono son clasificadas como esterasas (EC 3.1.1.3) (111). Sin embargo, la mayoría de las lipasas son también capaces de hidrolizar ésteres de glicerol de cadenas cortas.

Otra característica que diferencia la mayoría de las lipasas de las esterasas es el fenómeno de activación interfacial, que se refiere al intenso aumento de actividad de la enzima en la interface lípido-agua de substratos emulsificados o micelares, provocado por un rearrreglo estructural del sitio activo. En el caso de las lipasas, en ausencia de interface, el sitio activo apolar de la enzima está cubierto por un tapón (lid) y la enzima se encuentra en una conformación cerrada. En presencia de sustancias hidrofóbicas, el tapón es removido exponiéndose una gran superficie hidrofóbica, y quedando los residuos catalíticos accesibles al substrato (conformación abierta) (193).

En presencia de solventes orgánicos, son también capaces de catalizar reacciones de síntesis o de intercambio de grupos (transesterificación e interesterificación) entre diferentes moléculas, incluyendo lípidos, glúcidos y aminoácidos (Figura 6) (20)

1) Hidrólisis



2) Transesterificación



3) Interesterificación

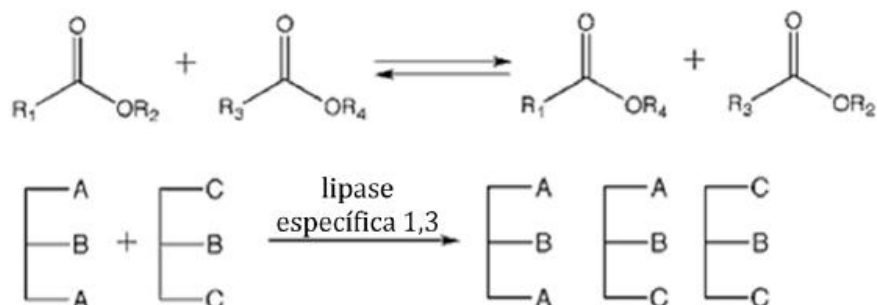


Figura 6: Reacciones químicas catalizadas por las lipasas

La interesterificación química es uno de los procesos más importantes en la modificación de las características fisicoquímicas de las grasas y de los aceites, ya que modifica la estructura de los TAG, mejorando las propiedades físicas y nutricionales de los lípidos (122, 131, 178). Además, la interesterificación es una reacción que modifica la distribución de los TAG produciendo un reordenamiento en su distribución, sin cambiar la composición química (Figura 6 panel 3). También, se ha utilizado industrialmente para modificar grasas y así brindar propiedades de plasticidad y untabilidad, características de textura deseables en productos como

margarinas (178). Las enzimas lipolíticas pueden realizar todas estas reacciones con una elevada especificidad de sustrato, así como de forma quimio, regio o estereoespecífica. Son altamente estables en un amplio rango de pHs, temperaturas y solventes orgánicos. Además, no requieren la presencia de cofactores (137). También son estables frente a diferentes detergentes, iones y agentes químicos, y algunas son afectadas por la presencia de cationes divalentes (113). Se ha demostrado que en presencia de cationes divalentes se estimula o inhibe la capacidad lipolítica de lipasas producidas por *Burkholderia* sp, *Bacillus* sp, *Pseudomonas* sp (89, 121). Algunos estudios han demostrado que en *Bacillus* sp, *Acinetobacter* sp, y *Burkholderia* sp, el pH inicial del medio de cultivo es crítico para la producción de lipasas (12, 89).

Por lo cual, todas éstas características las hace interesantes en el campo de la biotecnología (112, 114).

2.1.2 Clasificación de enzimas lipolíticas

Desde hace varios años se han venido realizando una gran cantidad de trabajos de investigación con el fin de identificar los motivos conservados en las enzimas lipolíticas de una gran variedad de organismos. Estos incluyen vertebrados, invertebrados, hongos y bacterias. Así como también se han estudiado los elementos involucrados en mantener la estructura tridimensional del sitio catalítico.

En el año 1999, Arpigny y colaboradores clasificaron 53 secuencias de enzimas lipolíticas bacterianas en ocho familias (I-VIII) y subfamilias, en base a la similaridad en la secuencia aminoacídica y en algunas propiedades biológicas fundamentales (8).

a) Familia I o lipasas verdaderas

La familia I se divide en 6 subfamilias, del I.1 al I.6. Desde el punto de vista estructural presentan un residuo de serina catalítico inmerso en el motivo conservado GHSXG.

Inicialmente las lipasas verdaderas se ordenaron en un grupo denominado *Pseudomonas* 1, 2 y 3. Esto fue debido a que probablemente las lipasas producidas por las *Pseudomonas*, fueron el primer grupo predominante estudiado, y que tenían

un rol de interés para la industria. Otras lipasas producidas por especies de *Bacillus* presentan sustituciones en el pentapéptido conservado, en el cual un residuo de glicina es sustituido por un residuo de alanina en el pentapéptido AXSXG.

b) Familia II o familia GDSL

La familia II también es conocida como familia GDSL, debido a que los miembros de esta familia no presentan el pentapéptido conservado GX SXG, en su lugar presentan el motivo GD SL. Enzimas como las producidas por las especies de *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* y *Photobacterium luminescens*, presentan un dominio C-terminal adicional, el cual abarca aproximadamente un tercio de su secuencia completa y se encuentra plegado. Además, estas enzimas presentan una gran cercanía con una nueva familia identificada de factores de autotransporte de virulencia bacterianos (100, 161).

c) Familia III

Esta familia de proteínas fue identificada primeramente por Cruz et al. (50). En el año 1998 Wei y colaboradores, obtuvieron la primer estructura terciaria de la lipasa producida por la cepa M11 de *Streptomyces exfoliatus*. Los miembros de esta familia presentan el pentapéptido conservado formado por los residuos de Gly-His-Ser-Met-Gly. Las enzimas de esta familia, también se caracterizan por presentar un plegamiento canónico de α/β hidrolasas, así como también semejanza estructural con la proteína acetil hidrolasa humana PAF.

d) Familia IV

Los miembros de esta familia se caracterizan por mostrar similitud con las lipasas sensibles a hormona de mamíferos (mammalian hormone-sensitive lipase) (HSL). Esta familia es conocida como la "familia HSL" de enzimas lipolíticas (8). Los miembros de esta familia presentan la tríada catalítica de residuos conservados aspartato, histidina y el nucleófilo serina formando parte del pentapéptido consenso GX SXG. Por otro lado, se han reportado sustituciones donde el residuo de aspartato es remplazado por un residuo de glutamato (39, 106).

e) Familias V y VI

Las proteínas pertenecientes a la familia V presentan el típico plegamiento α/β hidrolasa, así como también, el pentapéptido conservado GX SXG. Por otro lado también presentan un motivo conservado formado por los residuos PTL, descrito por Arpigny y colaboradores (8). Se han reportado esterasas con sustituciones de este motivo por el motivo PTQ y por el motivo PAL (244). Esta familia son originarias de organismos mesófilos, termófilos y psicrófilos. También se ha descrito que presentan similitud con otras enzimas no lipolíticas.

Las enzimas pertenecientes a la familia VI presentan un peso molecular entre 23 y 26 KDa, siendo las más pequeñas entre todas las familias (8). Una de las primeras en identificarse como miembro de esta familia es la carboxilesterasa producida por *Pseudomonas fluorescens*. Presenta la clásica tríada catalítica formada por residuos de Serina, Aspartato, e Histidina (S-D-H), así como también el pegamiento de α/β hidrolasas. Presentan la característica de hidrolizar pequeños sustrato, con un amplio rango de especificidad, y no presentan actividad con TAG de ácidos grasos largos de cadenas largas. Miembros de esta familia también presentaron alta similitud con las fosfolipasas de eucariotas.

f) Familia VII

Los miembros de esta familia se caracterizan por mostrar similitud con carboxil esterases de eucariotas. Específicamente la esterasa producida por *Arthrobacter oxydans* hidroliza herbicidas como el fenilcarbamato (187). Presentan el pentapéptido conservado GX SXG., así como también la típica tríada catalítica S-D-H. Esterasas de esta familia como la producida por *Bacillus subtilis* presenta la ventaja de hidrolizar p-nitrofenil ésteres, los cuales deben ser removidos durante la síntesis de antibióticos β lactámicos (256).

g) Familia VIII

Los miembros pertenecientes a esta familia muestran una remarcable similaridad con la familia de clase C de β -lactamasas y con la familia de unión a penicilina "penicillin-binding protein" (20). También se las ha relacionado a las acetilesterasas

de eucariotas. Ambas familias presentaban una variación en el pentapéptido típico de las lipasas y esterases GX SXG, el cual es sustituido por el motivo SXXK. Además, los miembros de esta familia, contienen aproximadamente 380 residuos aminoácidos, con un peso molecular de aproximadamente 42 kDa.

Sin embargo, desde la clasificación realizada por Arpigny y colaboradores nuevas enzimas lipolíticas han sido aisladas e identificadas, y se han propuesto nuevas familias adicionales (102, 125, 144).

Por ejemplo en un estudio realizado en el año 2006, se identificó una lipasa denominada LipG, la cual presenta la típica triada catalítica característica de la familia de las α/β hidrolasas, así como también el pentapéptido conservado GX SXG. Sin embargo, la característica que provocó el postulado de esta nueva familia denominada familia LipG fue la presencia de los residuos Arg-Gly en el extremo N-terminal los cuales formarían el oxi anión, a diferencia de lo observado en la mayoría de las lipasas bacterianas y de algunos hongos, en los cuales se observan los residuos His-Gly (123).

Años más tarde, en el año 2009, a partir de análisis filogenéticos se demostró que la lipasa denominada LipEH tampoco pertenecía a ningún grupo previamente descrito, ya que no presentaba homología de secuencia con secuencias de enzimas lipolíticas ya descritas, a pesar de presentar el pentapéptido conservado GX SXG. Estos resultados, además de la identificación bioquímica sugirieron la existencia de una familia adicional de lipasas denominada familia LipEH (125, 144).

2.1.3 Producción de enzimas lipolíticas

Las lipasas bacterianas, por ejemplo las producidas por varias especies de *Bacillus*, son sobreexpresadas en hospederos como *Escherichia coli*, utilizando los sistemas convencionales de expresión. Sin embargo, la obtención de lipasas producidas por *Pseudomonas* y *Burkholderia* no es posible utilizando los sistemas de expresión convencionales (110). Por ejemplo las lipasas de *Pseudomonas* requieren la presencia funcional de 30 proteínas celulares para poder ser recuperadas del

sobrenadante celular enzimáticamente activas. Esto indicaría, que el plegamiento y secreción son procesos altamente específicos, y que podrían no funcionar correctamente en hospederos heterólogos (201).

2.1.4 Plegamiento y secreción

Las lipasas extracelulares deben ser translocadas a través de las membranas bacterianas. Se han identificado cuatro sistemas de secreción por el cual las bacterias son capaces de secretar las enzimas lipolíticas, el transportador ABC, el sistema de secreción tipo II y dos maquinarias de secreción denominadas Sec y Tat (Figura 7) (112).

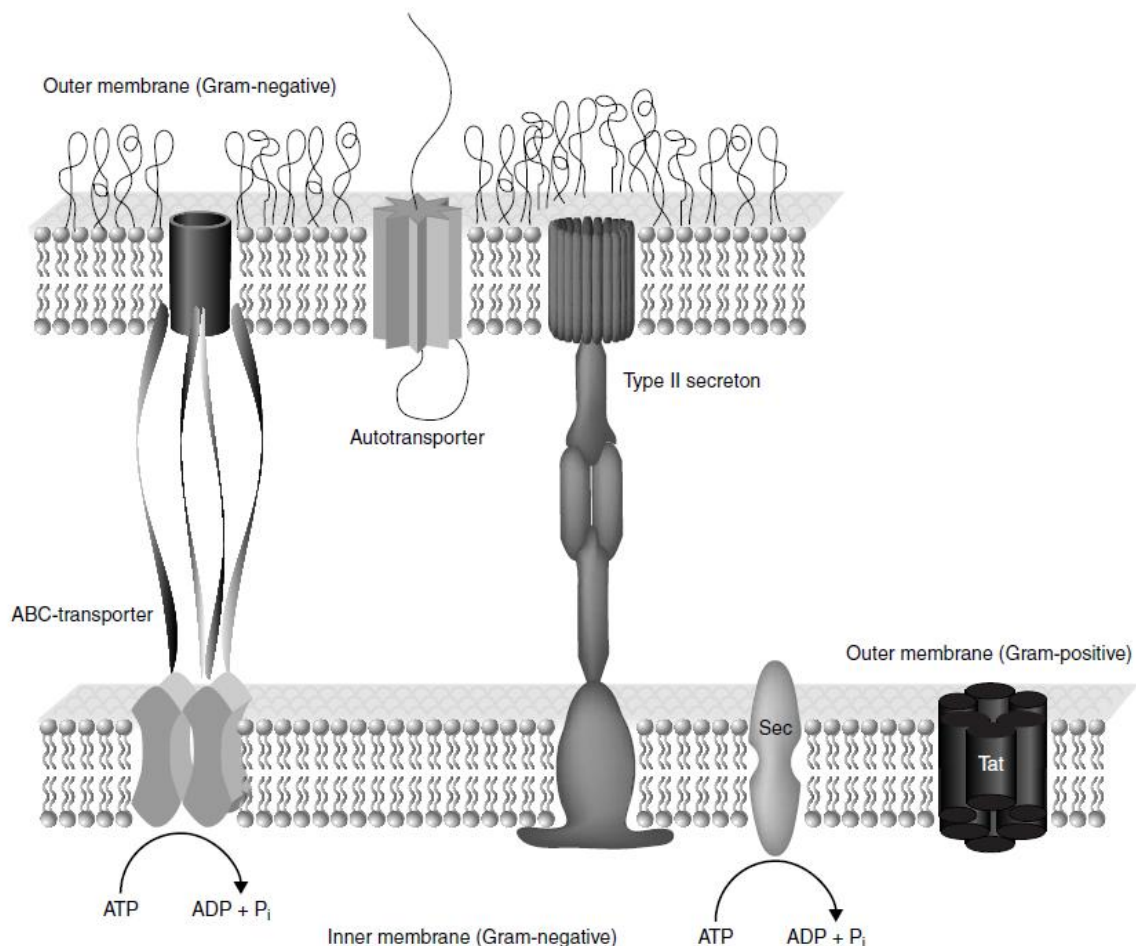


Figura 7: Vías utilizadas por las bacterias Gram positivas y Gram negativas para secretar las enzimas lipolíticas. Tomado de Jaeger y Eggert (112).

En las bacterias Gram positivas, a diferencia de las bacterias Gram negativas, las enzimas secretadas tienen que atravesar solamente una membrana citoplasmática. Generalmente, estas proteínas contienen una secuencia señal, la cual dirige su translocación vía la maquinaria denominada Sec (69). Ha sido descrita una segunda vía de translocación denominada vía Tat (Twin arginine translocation), la cual reconoce proteínas que presentan péptidos señales con una secuencia muy conservada, caracterizada por la presencia de dos argininas continuas (RR) (197).

Los sistemas de secreción Sec y Tat median la translocación de proteínas a través de la membrana interna y operan tanto en bacterias Gram positivas como en Gram negativas. En el genoma de *Bacillus subtilis*, han sido identificadas 188 proteínas como potenciales enzimas secretadas. Estas incluyen dos lipasas, en la cual la lipasa LipA contiene la secuencia señal Tat, mientras que LipB, con la cual contiene alta homología contiene la secuencia Sec (233).

Muchas bacterias Gram negativas, son conocidas por la eficiencia de secretar lipasas extracelulares, entre las que se encuentran las especies *Pseudomonas* y *Burkholderia*. En bacterias Gram negativas el transporte y el autotransporte están mediados por los sistemas de secreción tipo ABC (transportador ABC) o tipo I y tipo II (secretón), respectivamente.

En *Pseudomonas aeruginosa*, se han identificado al menos cuatro sistemas de secreción. En este sistema de secreción tipo II o secretón, luego de que la enzima ha sido secretada a través de la membrana interna vía la maquinaria Sec, es plegada en el periplasma en su conformación activa. El plegamiento en el periplasma requiere de moléculas que asistan, el correcto plegamiento y la correcta secreción de la enzima. Esta asistencia a cargo por determinadas chaperonas intermoleculares como la denominada proteína Lif (lipase-specific foldase) (113). Sin embargo, se identificó una lipasa de una especie de *Pseudomonas* la cual era capaz de plegarse en su conformación activa y desarrollar el 63% de actividad enzimática en comparación a la cepa salvaje, en ausencia de la proteína Lif, lo cual sugirió que estas proteínas no eran del todo esenciales para el plegamiento (124). Por otro lado, las lipasas producidas por *Pseudomonas fluorescens* y por *Serratia marcescens* no contienen el típico péptido señal en el extremo N-terminal y las proteínas son secretadas directamente por el sistema tipo I de secreción o por el transportador ABC. Algunos estudios han demostrado que una sobreexpresión del transportador

ABC, incrementa considerablemente la producción y secreción de las lipasas producidas por *P. fluorescens* y por *S. marascens* (2, 213).

2.1.5 Aplicaciones biotecnológicas de lipasas y esterasas

Por medio de la utilización de la metagenómica (Ver 4.0) se han identificado más de 80 nuevas lipasas y esterasas, pero unas pocas han sido caracterizadas (224). La caracterización de esas nuevas enzimas ha revelado características interesantes para aplicaciones en procesos biotecnológicos. Li y colaboradores identificaron una lipasa capaz de degradar un insecticida y sugiere su uso en la biorremediación de ambientes contaminados (149). También se han caracterizado varias lipasas con aplicaciones en la industria farmacéutica. En el año 2001, se caracterizó una lipasa proveniente de *Serratia marcescens* capaz de catalizar con alta enantioselectividad la hidrólisis asimétrica de un compuesto intermediario para la síntesis del fármaco diltiazem, el principal vasodilatador coronario (213). Años más tardes, Ferrer y colaboradores identificaron una esterasa enantioselectiva, capaz de hidrolizar preferencialmente el compuesto (S)-solketal, utilizado como molécula para la síntesis de fármacos, con un rendimiento mucho mayor que el de las enzimas usualmente utilizadas (71). También, son utilizadas en la resolución de mezclas racémicas como ser (R,S)-ibuprofeno y (R,S-) mentol (31, 32). También, se han reportado trabajos donde estas enzimas pueden ser utilizadas en la producción de detergentes, biocombustibles y en la industria de alimentos (15). Recientemente, se han caracterizado nuevas esterasas y lipasas temoresistentes con interesantes características para la industria (4, 16, 43, 62, 133, 167). Sin embargo, la búsqueda de nuevas enzimas que sean capaces de optimizar procesos industriales, continúa en aumento, y se han descrito muchas más.

En otro estudio, fue reportada una esterasa EstCS2, la cual presentaba una alta estabilidad en solventes orgánicos y actuaba sobre ésteres de ketoprofeno, alcoholes terciarios, y en poliuretano, lo que la sugería en aplicaciones para la biotransformación y la biorremediación (40).

3. Diversidad microbiana

Los procariotas son capaces de crecer y desarrollarse en un amplio rango de ambientes, que van desde lagos alcalinos hasta fumarolas hidrotermales, lo cual

indica que pueden contener enzimas que son estables y activas en estas condiciones extremas (41, 158, 189, 229). En base a ello, los microorganismos (bacterias y hongos) constituyen la base de la biotecnología, tanto como sintetizadores de productos naturales o actuando directamente en bioprocesos. Por lo cual estas moléculas biocatalizadoras han resultado de mucho interés en procesos industriales.

Sin embargo, la mayoría de los microorganismos provenientes de estos ambientes, aunque estén activos, generalmente son muy difíciles de cultivar por métodos de cultivo clásicos (7). Durante muchos años los microorganismos fueron cultivados, purificados e identificados por medios bioquímicos. Muchos antibióticos, y otros productos de aplicación biotecnológica fueron obtenidos en base a estas técnicas tradicionales (53). Sin embargo, una de las principales limitaciones para utilizar moléculas biocatalizadoras en la industria fue que se las podían obtener solamente a partir de aislamientos bacterianos (147).

En el año 1980, se publicó un trabajo que describía un proceso de purificación de ADN de toda la comunidad bacteriana presente en una muestra de suelo (235). A través de curvas de cinética de reasociación de ADN de esas muestras comparadas con la cinética del genoma puro de *E. coli*, se sugirió la existencia de aproximadamente cinco mil genomas en la muestra analizada, lo cual permitió acceder a una mayor diversidad genética allí existente (234, 235).

Por otro lado, Carl Woese basándose en que los genes que codifican para las subunidades de los ribosomas, se encontraban presentes en todo los procariotas, y que su secuencia posee regiones conservadas y otras variables, postuló la idea de utilizar los genes ribosomales como reloj molecular para descifrar las relaciones filogenéticas entre microorganismos (246, 247). A partir de este descubrimiento, se definieron los 3 dominios de la vida (Bacteria, Archaea y Eucaria).

A partir del postulado de Woese, en 1986, se utilizaron cebadores específicos para amplificar el gen ARNr de 16S, con el fin de caracterizar la biodiversidad de muestras de suelo (181). Esta técnica tuvo un gran impacto en los sistemas utilizados hasta ese momento para clasificar filogenéticamente las bacterias.

Estudios realizados con un gran número de secuencias, han revelado que en los ambientes naturales, existe una vasta diversidad de microorganismos y más del 99% de éstos no pueden ser cultivados en el laboratorio. Se estima que en el suelo y en las aguas oceánicas hay presentes entre $4\text{-}5 \times 10^{30}$ y 3.6×10^{29} células microbianas, respectivamente (49, 217). Estas complejas comunidades no cultivables, representan un enorme reservorio de diversidad genética y metabólica. La caracterización de esta diversidad permite no solamente la exploración de nuevas funciones, sino también comprender nuevas actividades metabólicas, las interdependencias microbianas existentes en los diferentes hábitats, y los roles de cada microorganismo en el ecosistema.

Para abordar esta complejidad un nuevo abordaje denominado Metagenómica, se está utilizando en los últimos años.

4. Metagenómica

Actualmente los procesos biotecnológicos se encuentran continuamente incrementando la demanda de nuevas moléculas biocatalizadoras. Esto ha sido un disparador del desarrollo de nuevas estrategias experimentales para la búsqueda e identificación de genes que codifican enzimas participantes en estos procesos.

La metagenómica se define como el análisis funcional y de secuencia de genomas colectivos, contenidos en un determinado ambiente (93). A partir de esto se define a un metagenoma como el conjunto de genomas provenientes de una muestra ambiental. El método utiliza técnicas clásicas de la biología molecular que incluyen la purificación del ADN, clonado, transformación y técnicas de microbiología.

A través de la metagenómica se ha podido acceder a un gran número de genes, los cuales codifican para nuevas enzimas o para enzimas más eficientes desde el punto de vista biotecnológico. Operones que codifican para una vía metabólica entera también pueden ser caracterizados por medio de este abordaje y utilizados en la producción de metabolitos secundarios (51).

El término “metagenómica” se ha venido utilizando desde el año 1998 (93). Sin embargo, el trabajo realizado por Stein y colaboradores en el año 1996, es considerado el primer trabajo en este campo. En ese trabajo, se analizaron fragmentos de ADN de 40Kb, derivado de una arquea marina y el objetivo fue

evidenciar la presencia del microorganismo en una muestra de ADN ambiental utilizando la técnica de PCR por medio de cebadores específicos para el gen 16S del ARNr (225).

No fue hasta el año 2000 que se publicó el primer trabajo de metagenómica a partir de muestras de suelo. En este trabajo los autores utilizaron todas las técnicas que son utilizadas actualmente en el campo de la Metagenómica, realizando además del análisis de filogenia, análisis funcional para la detección de enzimas de interés industrial como ser celulasas, lipasas, esterases, amilasas, quitinasas, queratinasas, nucleasas. Los clones que poseían el inserto de interés o sea que tenían el gen que codificaba para dicha función, fueron secuenciados y las proteínas fueron purificadas y caracterizadas (200).

4.1 Aproximaciones utilizadas en metagenómica

El análisis de las bibliotecas genómicas puede ser realizado a través de dos aproximaciones o metodologías. La primera se basa en el análisis de las secuencias obtenidas directamente del metagenoma y la segunda se basa en la búsqueda de determinada actividad funcional (Figura 8) (92).

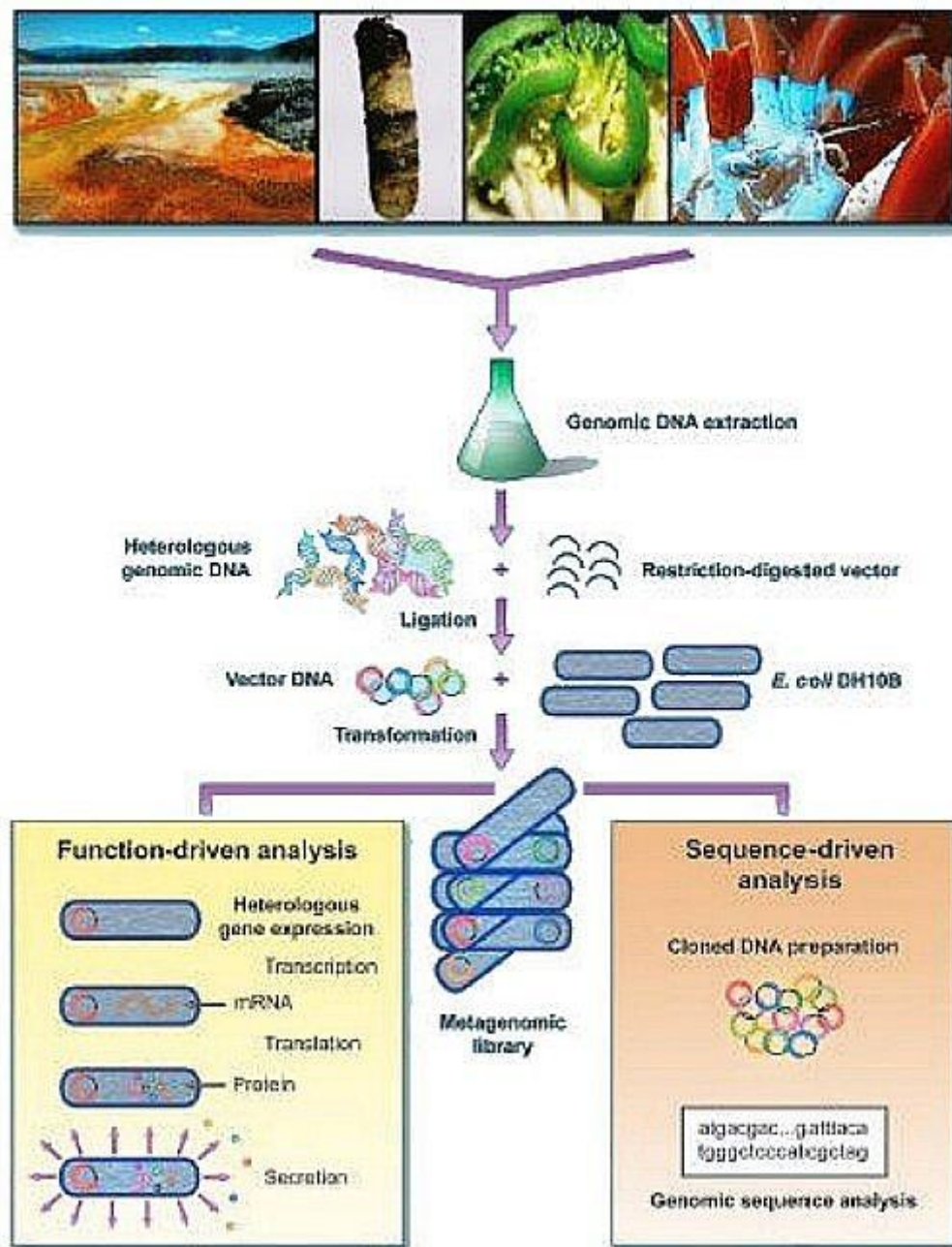


Figura 8: Estrategia para la construcción y tipo de aproximación utilizada en una biblioteca metagenómica. Tomado de Handelsman y colaboradores (92).

4.1.1 Análisis basado en la secuencia

En el año 2004, Venter y colaboradores, publicaron el primer trabajo utilizando secuenciamiento por "shotgun" de ADN proveniente de muestras de agua colectadas del Mar de Sargasso (237). Esta estrategia de secuenciamiento se basa

en que el genoma total de la comunidad es fragmentado, luego los fragmentos de ADN son secuenciados y ensamblados. Desde entonces hasta la actualidad, la cantidad de información conocida acerca de los genomas ambientales, se ha venido incrementando debido al crecimiento de los proyectos de secuenciación de ADN proveniente de diversos ambientes. Como consecuencia de ello, se han identificado genes que codifican nuevas enzimas con distintas aplicaciones biotecnológicas. Por ejemplo, el análisis de datos genómicos provenientes del secuenciamiento de ambientes marinos, permitió identificar una gran cantidad de nuevas enzimas hidrolíticas, que incluían 113 celulasas y 20 lipasas (45, 195).

La aproximación basada en el análisis de secuencia utiliza varias metodologías para la obtención de las secuencias. Una primera metodología utiliza regiones conservadas del ADN, con el fin de diseñar cebadores para ser utilizados en reacciones de PCR y así amplificar regiones que guarden homología con genes de interés. Otro abordaje utiliza el secuenciamiento de los extremos del inserto de ADN clonado, o de todo el ADN metagenómico de una determinada muestra ambiental, (169, 237). Por medio de esta aproximación la identificación es realizada por comparación de las secuencias obtenidas con las secuencias de los bancos de datos.

4.1.2 Análisis basado en la detección funcional

El método basado en la detección funcional identifica células con idéntica información genética provenientes de una misma cepa parental (clon). La identificación del fenotipo es realizada en medio de selección sólido conteniendo un sustrato selectivo para una función de interés, por ejemplo se le suplementa leche en polvo al medio para detectar actividad proteasa. Los clones que estén expresando dichas enzimas, formarán un halo de hidrólisis alrededor de la colonia.

En comparación a la aproximación basada en la secuencia, la detección funcional está limitada al sistema de expresión de la célula hospedera. Permite identificar nuevas enzimas basado en sus actividades y no en su secuencia. También, es posible acceder a un mayor nivel de diversidad genética, a través de la detección de funciones de genes desconocidos, sin embargo, la identificación de un determinado gen, no garantiza que este gen sea expresado en la célula hospedera, así como tampoco, que la proteína codificada posea una función que esté anotada en la base de datos. En un análisis basado en la secuenciación de biofilms de agua potable, se detectaron parcialmente 21 genes codificantes para actividad lipasa (209). Por otro lado, a través de la detección funcional del mismo biofilm se detectaron 6 clones con actividad lipasa lo que sugirió que el bajo número de clones lipolíticos pudo haber estado relacionado con las limitaciones en la expresión de genes heterólogos (64).

Con el fin de obtener nuevas enzimas con aplicaciones biotecnológicas, se construyeron varias bibliotecas a partir de distintos tipos de muestras, de suelo, de aguas, de biofilms de agua bebible, de rumen bovino, de la cavidad bucofaríngea humana (48, 56, 64, 133, 172, 200, 209). En la siguiente tabla se resumen algunas de las nuevas enzimas identificados utilizando el enfoque metagenómico, así como también la estrategia utilizada y algunas aplicaciones biotecnológicas de las enzimas identificadas (Tabla 1).

Tabla 1: Enzimas microbianas aisladas de bibliotecas metagenómicas provenientes de diferentes ambientes. Tomado y adaptado de Singh y et al, y de Ferrer y colaboradores (70, 215).

Enzima	Ambiente	Screening	Aplicaciones biotecnológicas	Ref.
Esterasas	Sedimentos de Mar, Suelos selváticos, Agua bebible, Rumen vacuno	Análisis Funcional	<u>Industria farmacéutica</u> (alta quimio regio y estero-especificidad de compuestos para síntesis de fármacos). <u>Biotransformación y Biorremediación</u> (presentan alta estabilidad en solventes orgánicos y actúan sobre ésteres de ketoprofeno, alcoholes terciarios, y en poliuretano).	(64, 115, 129, 143, 195)
Lipasas	Suelo y compost	Análisis Funcional	<u>Biotransformación</u> (presentan alta estabilidad en solventes orgánicos y actúan sobre ésteres de ketoprofeno, alcoholes terciarios, y en poliuretano). <u>Biorremediación</u> (degradación de insecticidas en ambientes contaminados). Industria del transporte (utilizadas en el proceso de obtención de biodiesel como combustible alternativo).	(139, 144, 185, 186, 241)
β -Lactamasas	Sedimentos de suelos oceánicos	Análisis basado en la secuencia (PCR)	<u>Industria farmacéutica</u> (acción antibiótica).	(220)
Amilasas	Musgo (crecido sobre lodo)	Análisis Funcional	<u>Industria panificadora</u> y de bebidas (son utilizadas para hidrolizar el almidón y así obtener azúcares sencillos, oligo y monosacáridos). <u>Industria del transporte</u> (utilización del almidón como materia prima para la producción de etanol como combustible alternativo).	(177, 199, 208, 252)
β -Glucanasas	Intestino de ratón	Análisis Funcional	<u>Industria de bebidas (Industria cervecera)</u> (son utilizadas para disminuir la viscosidad de los mostos, por medio de la digestión del material celulósico, por lo cual se mejora su filtración, y se obtienen cervezas ligeras o con menor contenido de calorías).	(208)
Celulasas	Suelo, rumen vacuno, lagos, mares	Análisis Funcional	<u>Industria de alimentos y bebidas</u> (favorecen la extracción y filtración de jugos de frutas o verduras, filtración de mostos y la extracción de aceites comestibles). <u>Industria textil</u> (utilizadas en el desteñido de prendas, se adicionan a los detergentes para eliminar microfibrillas adheridas a la fibras principales, de forma de suavizar las prendas). <u>Industria del transporte</u> (producción de etanol).	(60, 108)

Quitinasas	Ambientes acuáticos : mares y lagos hipersalinos alcalinos	Análisis basado en la secuencia (PCR)	Potenciales insecticidas, protección contra patógenos fúngicos,	(44, 142)
Xilanasas	Intestino humano, intestino de insectos (polilla, termita)	Análisis Funcional	<u>Industria de la pulpa y papel</u> (se utilizan en el proceso de bioblanqueo, con el fin de realzar la brillantez de las pulpas y disminuir la cantidad de cloro utilizado en las etapas de blanqueo). <u>Industria de alimentos</u> (clarificación de jugos y vinos, licuefacción de mucilago de café, extracción de saborizantes, pigmentos, aceites de plantas y semillas y en la maceración de material vegetal) <u>Industria panificadora</u> (mejora la calidad de la masa, mejorando la textura y el sabor)	(29, 97)
Pectinasas	Suelo de áreas tropicales	Análisis Funcional	<u>Industria textil</u> (solubilización de la pectina no deseable durante el proceso de limpieza del algodón).	(218)
Ciclodextrinasas	Sedimentos de suelo y rumen vacuno	Análisis Funcional	<u>Industria farmacéutica</u> (síntesis de fármacos)	(72, 231)
Proteasas	Ecosistemas marinos	Análisis Funcional	<u>Industria farmacéutica</u> (formulación de antitrombóticos, coadyuvantes digestivos, antiinflamatorios y aceleradores de la coagulación sanguínea así como en la formulación de detergentes). <u>Industria de Alimentos</u> (fabricación de queso) y fabricación de bebidas (Industria cervecera) <u>Industria del cuero</u> (depilado de pieles en curtiembres).	(55, 88)

La mayor cantidad de trabajos en metagenómica se han realizado a partir de la construcción de bibliotecas de suelos y en menor grado de otros ambientes (26, 46, 123, 150, 212). Se han descrito varios protocolos para la purificación del ADN a partir de muestras de suelo (153). Estos han sido punto de partida para muchos estudios posteriores. Las metodologías más utilizadas se dividen en métodos directos y métodos indirectos (51).

Dependiendo de la muestra ambiental de partida se han descrito diferentes estrategias. En el método directo (en el caso de muestras de suelo) la purificación de ADN es realizada con la muestra de suelo en su totalidad, e incluye un paso de lisis mecánica, en el cual el suelo es mezclado con esferas de sílice, y es sometido a agitación mecánica. El objetivo de esta etapa es romper los agregados de suelo, liberar el máximo posible de células (en solución) y ayudar en la fragmentación de la pared celular de bacterias resistentes a la lisis química. En el método indirecto de purificación de ADN, las muestras son sometidas a varios ciclos de lavado, centrifugación, seguidos de una lisis química, con el fin de separar las células bacterianas de la matriz del suelo. Luego de obtenerse una suspensión de células, se realiza una purificación de ADN genómico bacteriano. Ambas metodologías presentan ventajas y desventajas. En el método directo al no realizarse lavados, se accede a una mayor cantidad de células y por lo tanto a una mayor diversidad de especies en la muestra, en comparación con el indirecto. Sin embargo, presenta una gran cantidad de contaminantes. Por otro lado, la agitación del ADN con las esferas de sílica, puede provocar una fragmentación excesiva del mismo lo que puede ser un inconveniente al momento de querer construir bibliotecas metagenómicas con insertos de gran tamaño. En el método indirecto, por realizarse varios lavados y una lisis química se obtiene un ADN más puro y de alto peso molecular. Sin embargo, se piensa que una parte del ADN bacteriano se pierde por esta metodología la cual incluye el paso de lavado, ya que no todo el ADN es removido de la matriz del suelo (139).

Como se comentó anteriormente, la utilización de la metagenómica ha venido acelerando fuertemente el descubrimiento de nuevas moléculas que intervienen en la

biocatálisis, muchas de ellas con propiedades inusuales o poco estudiadas (59, 65, 83, 115, 116, 143). Por ejemplo, en el año 2009, Steele y colaboradores mencionaron un total de 15 publicaciones, en las cuales se reportaron un total de 92 clones con actividad positiva de lipasas y/o esterasa, provenientes de diferentes bibliotecas metagenómicas. De los 92 clones con actividad lipolítica positiva, al menos 19 clones fueron sobreexpresados, purificados y caracterizados desde el punto de vista bioquímico (64, 195, 200, 224, 238). Cabe destacar que desde entonces hasta la actualidad, estos números continúan en aumento.

4.2 Construcción de bibliotecas metagenómicas

Hay varios factores a tener en cuenta en el momento de construir bibliotecas metagenómicas. Algunos de ellos son la selección del ambiente, el muestreo, el tamaño del inserto a ser clonado y la estrategia de clonado a utilizar, el método de detección y la elección del hospedero.

4.2.1 Selección del ambiente

Los estudios en metagenómica, se agrupan en tres categorías en función de la selección del ambiente. El primer grupo selecciona ambientes que en base a la bibliografía se conoce que son abundantes en la molécula biocatalizadora a identificar, como por ejemplo la búsqueda de enzimas xilanasas en el intestino de termitas (29). El segundo grupo se basa en la selección de ambientes con alta diversidad genómica, como por ejemplo el suelo. El tercer grupo se basa en el estudio de ambientes extremos, y la búsqueda de biocatalizadores, los cuales son estables bajo las condiciones ambientales que experimentan los microorganismos allí existentes (71). En los ambientes con alta diversidad genómica, en comparación con los ambientes de condiciones extremas las condiciones ambientales suelen ser variables en términos de estar sujetos a grandes fluctuaciones de temperatura, pH o salinidad. Las moléculas biocatalizadoras obtenidas de estos ambientes generalmente muestran un alto nivel de estabilidad y actividad bajo un amplio rango de condiciones (64, 239).

Una estrategia para obtener una mayor diversidad de moléculas biocatalizadoras de un determinado ambiente es enriquecer las comunidades presentes para luego extraer y

clonar su ADN. Es importante destacar que la elección de un ambiente enriquecido para la búsqueda de moléculas biocatalizadoras, no garantiza una alta frecuencia de detección de las mismas. Un estudio realizado a partir de un metagenoma de rumen bovino proveniente de un ambiente naturalmente rico en amilasas, encontró un clon con actividad en un total de 14.000 clones estudiados (77Mb de ADN) (71). Esto significó mucho menos que el rango de detección de amilasas proveniente de suelo donde, un clon con actividad fue encontrado por cada 12.5 Mb de ADN sometido a detección funcional (200).

Uno de los más significativos desarrollos es la utilización de la metagenómica para la detección de productos farmacéuticos relevantes como lo son antibióticos y drogas contra el cáncer, provenientes de ambientes marinos simbióticos (186, 240). Las bacterias simbióticas son capaces de producir productos naturales, los cuales fueron primeramente inaccesibles, debido a las restricciones de cultivo de ese microorganismo. La utilización de la metagenómica ha permitido sortear este obstáculo.

4.2.2 Estrategias de clonado

El ADN metagenómico, puede ser clonado para obtener bibliotecas de insertos de gran tamaño o de pequeño tamaño. Las bibliotecas con insertos de gran tamaño pueden ser generadas en vectores tipo cósmidos (46, 65), en BACs (cromosomas artificiales bacterianos) (200), o en fósidos (129, 195). Las bibliotecas de insertos pequeños son mantenidas en vectores plasmídicos como ser el vector pBluescript SK+ (101), pUC19 (190), pZero-2 (79), y en el vector pBBRIMCS (222). Los vectores plasmídicos pueden albergar ADN foráneo de un tamaño aproximado entre 2-8 Kb y replicarlo de forma estable en un determinado hospedero (242).

Los vectores BACs presentan la ventaja de mantener de forma estable en la célula insertos de ADN foráneo mayores a 200Kb, los cuales se replican en bajo número de copias, lo que facilita su mantenimiento (148, 200). Sin embargo, la utilización de BACs como vectores de clonado presenta la desventaja, de que el ADN a ser clonado por ser de gran tamaño, requiere un tratamiento previo como por ejemplo someter la totalidad

del ADN metagenómico a un gel electroforético de campo pulsado, con el fin de seleccionar el tamaño de fragmentos a clonar (242).

Las bibliotecas con insertos de gran tamaño, presentan la ventaja de que requieren un bajo número de clones para tener una completa cobertura, lo cual minimiza la cantidad de trabajo necesario para detectar varias actividades de interés. Sin embargo, el gran tamaño de los mismo y bajo número de copias hacen que la detección de genes foráneos de baja expresión sea más dificultosa (51).

En base a que la mayoría de los genes de rutas metabólicas en procariotas se encuentran en operones, se ha demostrado que bibliotecas que contienen insertos mayores a 10Kb, son propicias para la identificación de enzimas de vías metabólicas completas reguladas por varios genes, de sistemas de secreción y de islas de patogenicidad (83, 84).

Otra aproximación utilizada en metagenómica para la detección de nuevos genes utiliza la estrategia de subclonado, por medio de la técnica de nebulización o de sonicación del ADN. A partir de ésta se obtienen sub-bibliotecas de pequeños fragmentos de 1.5 a 7 Kb (48, 172). Presenta la ventaja de que permite la identificación de genes que codifican para una actividad de interés. Sin embargo, no es aplicable a estudios donde se pretende identificar genes involucrados en vías metabólicas, en las cuales podrían intervenir más de un operón u otros genes que además requieren para su expresión proteínas accesorias o chaperonas (103).

4.2.3 Métodos de detección funcional

Muchos de los métodos utilizados en la detección funcional se basan en el plaqueo de los clones en medios de cultivo que incluyen indicadores tales como colorantes o sustratos específicos para determinadas enzimas. Por ejemplo, para la detección de clones con actividad lipolítica se utilizan indicadores como el colorante rodamina B, sustratos específicos como triacilglicéridos (tributirina, trioleína, tricaprilina), bacto lípidos y el α -naftil acetato entre los más utilizados (64, 71, 102, 132, 200). Los TAG, dependiendo el largo del ácido graso que contengan el sustrato, se utilizan para detectar tanto actividad esterasas como actividad lipasa. La actividad lipasas o

esterasa positiva puede ser detectada mediante la visualización directa o mediante titulación. Utilizando la primer metodología la actividad positiva se detectan por la aparición de un halo de hidrólisis alrededor de la colonia. Mediante la segunda metodología la actividad positiva es detectada por la titulación de los ácidos grasos liberados utilizando el método conocido como pH estático (*pH Stat*) (Tabla 2).

En el caso de utilizar el colorante rodamina B (Sigma, Aldrich), las placas que lo tienen incorporado al agar, lucen opacas y de color anaranjado. La producción de actividad lipolítica es monitoreada al irradiar las colonias con luz UV a 350nm. Luego de las 16 horas de incubación a 37°C, las colonias que presenten una fluorescencia de color anaranjada tendrán actividad lipasa positiva. De continuar la incubación bajo las mismas condiciones, las colonias que presenten halos de hidrólisis fluorescentes alrededor de la colonia, también estarán expresando actividad lipolítica positiva. Las colonias que no presentan actividad lipolítica, acumulan el colorante, forman un halo de color anaranjado, pero no muestran fluorescencia al momento de ser irradiadas (132).

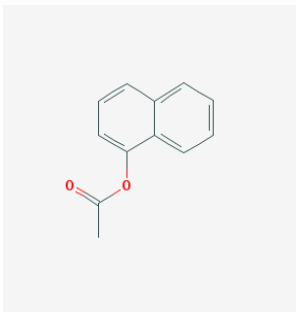
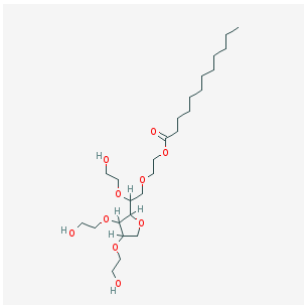
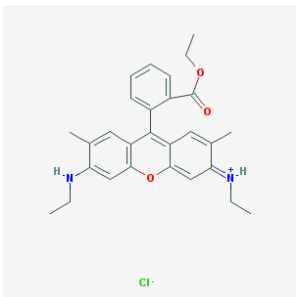
Al utilizarse el reactivo Bacto Lípido (Difco, Detroit, Mich), se detecta actividad lipolítica positiva por la aparición de un halo de hidrólisis alrededor de la colonia a las 72 horas luego de la inoculación (199, 200). También son utilizados el detergente Tween 20 al 3% y el reactivo α -naftil acetato. En el caso del Tween 20, la actividad esterasa positiva también es detectada por la aparición de un halo translúcido de hidrólisis alrededor de la colonia.

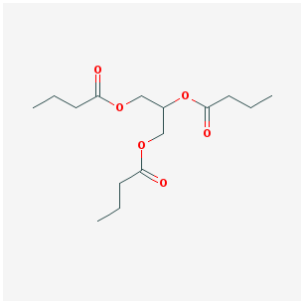
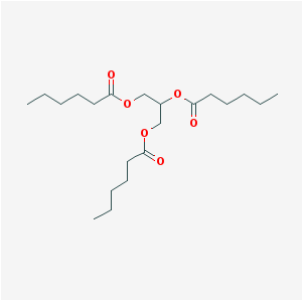
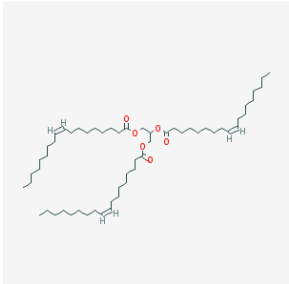
Al utilizar el α -naftil acetato, primeramente se incorpora top agar (0.8%) conteniendo el colorante Fast blue RR (20 μ g/ml) y el reactivo α -naftil acetato (80 μ g/ml). El naftol, producto de la hidrólisis del ester de α -naftil interacciona con el colorante Fast blue RR dando lugar a la formación de un complejo de color amarronado. De esta forma, la aparición de un halo de color amarronado alrededor de las colonia, luego de 5 min de finalizada la reacción es un indicador de actividad esterasa positiva. La ventaja de la utilización de este reactivo es que es posible detectar actividad lipolítica en menor tiempo, en comparación con las técnicas que utilizan tanto la rodamina, los detergentes

y los TAG, ya que al utilizar éstos últimos no hay un tiempo estipulado para detectar dicha actividad

En la Tabla 2 se presentan algunos de los sustratos más utilizados para la determinación de actividad lipolítica, el tipo de método de detección utilizado, así como sus características más relevantes.

Tabla 2: Algunos métodos y sustratos utilizados para la detección de actividad lipolítica.

Sustrato	Actividad buscada	Estructura del sustrato	Método de detección	Detección de actividad
Bacto Lípido	Actividad lipasa	Mezcla de tributirina y Tween 80 (composición no disponible por el fabricante).	Visualización directa	Halo translúcido azul alrededor de la colonia
α -naftil acetato	Actividad esterasa	<chem>CH3CO2C10H7</chem> 	Visualización directa	Halo de color amarronado alrededor de las colonia, luego de cinco min de finalizada la reacción
Tween 20	Actividad esterasa	<chem>C26H50O10</chem> 	Visualización directa	Halo translúcido azul alrededor de la colonia
Rodamina B	Actividad lipasa y/o esterasa	<chem>C28H31N2O3</chem> 	Irradiación con UV a 350nm a las 16 horas de inoculación	Halo translúcido y/o fluorescente alrededor de la colonia

Gliceril Tributirato o Tributirina	Actividad lipasa y/o esterasa	C ₁₅ H ₂₆ O ₆ 	a) Visualización directa b) Titulométrico	a) Monitoreo de la aparición de un halo translúcido alrededor de la colonia b) Titulación de ácidos grasos liberados
Gliceril tricaproato o Tricaprilina	Actividad lipasa	C ₂₇ H ₅₀ O ₆ 	a) Visualización directa b) Titulométrico (pH Stat)	a) Monitoreo de la aparición de un halo translúcido alrededor de la colonia b) Titulación de ácidos grasos liberados
Gliceril trioleato o Trioiefina	Actividad lipasa y/o esterasa	C ₅₇ H ₁₀₄ O ₆ 	a) Visualización directa b) Titulométrico (pH Stat)	a) Monitoreo de la aparición de un halo translúcido alrededor de la colonia b) Titulación de ácidos grasos liberados

4.2.4 Selección del hospedero heterólogo

Como se comentó anteriormente el objetivo de las búsquedas de actividad funcional es detectar las reacciones biocatalizadas y luego caracterizar los genes responsables de llevar a cabo dichas reacciones. Para ello, esta aproximación requiere que el ADN metagenómico sea expresado en un hospedero heterólogo. Como es de esperar, el sistema de expresión se ve limitado cuando los factores de transcripción y traducción del ADN metagenómico no se encuentran presentes en el hospedero. Algunos de los hospederos utilizados por la metagenómica son *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida*, *Saccharomyces lividans*, *Sinorhizobium meliloti* y *Sinorhizobium leguminosarum* (152, 164, 240-242). *E. coli* ha sido el hospedero más utilizado para la construcción de bibliotecas metagenómicas, ya que se conoce su metabolismo y es muy fácil la incorporación de ADN foráneo en su genoma. Sin embargo, en un estudio de 32 genomas procariotas, se ha demostrado que solamente el 40% de los genes pudieron ser expresados utilizando *E. coli* como hospedero (78). Aún cuando un gen sea expresado, el nivel de expresión puede ser tan bajo que no se puede detectar por medio de la búsqueda de la actividad. En base a ello, en algunos casos se debe potenciar la expresión de estos genes heterólogos mediante la incorporación de promotores fuertes de *E. coli*. Por ejemplo, el transposón MuExpress es capaz de integrarse *in vitro* en BACs o en una bibliotecas de cósmidos y permitir la inducción de la expresión de las regiones flanqueantes en ambas direcciones (146).

HIPOTESIS Y **OBJETIVOS**

2.1 Hipótesis de trabajo

2.2 Objetivos generales

2.3 Objetivos específicos

2. Hipótesis y Objetivos

2.1 Hipótesis de trabajo

Se ha reportado que en el rumen vacuno existen bacterias, las cuales son capaces de producir enzimas con actividad lipolítica (154). Además, la construcción de librerías metagenómicas funcionales permite identificar nuevas enzimas con propiedades deseadas. Se plantea la búsqueda y caracterización de enzimas lipolíticas aptas para la producción de biocombustibles a partir de una biblioteca metagenómica de ADN proveniente del contenido ruminal vacuno.

Con el fin de llevar a cabo este trabajo se propone los siguientes objetivos:

2.2 Objetivo general

Identificar y caracterizar nuevas enzimas lipolíticas a partir de una biblioteca metagenómica de rumen vacuno

2.3 Objetivos específicos

- a. Construir una biblioteca metagenómica a partir de rumen vacuno.
- b. Seleccionar e identificar clones con actividad lipolítica.
- c. Purificar la o las proteínas responsables de esta actividad.
- d. Caracterizar bioquímicamente la o las enzimas con actividad lipolítica

ESTRATEGIA **EXPERIMENTAL**

- 3.1 Construcción de una biblioteca metagenómica a partir del contenido ruminal vacuno
- 3.2 Selección de clones con actividad lipolítica
- 3.3 Identificación de genes responsables de actividad lipolítica
Mutagénesis generalizada
- 3.4 Clonación del gen lipolítico Lip10
- 3.5 Análisis filogenético de las secuencias seleccionadas
- 3.6 Sobreexpresión de la proteína recombinante Lip10
- 3.7 Caracterización bioquímica

3.Estrategia Experimental

3.1 Construcción de una biblioteca metagenómica a partir del contenido ruminal vacuno

Con el fin de realizar la construcción de una biblioteca metagenómica a partir del contenido ruminal vacuno, se utilizó el rumen de un novillo Holando alimentado con pradera, fundamentalmente con trébol rojo y lotus. La muestra fue obtenida por el Frigorífico Pando (Canelones, Uruguay) e inmediatamente luego de sacrificado el animal, la muestra se transportó a nuestro laboratorio en hielo.

3.1.1 Obtención de la fracción microbiana asociada al rumen vacuno

Para aislar las bacterias presentes en el rumen vacuno, se procesaron las fibras vegetales que se encuentran en el contenido ruminal. Se utilizó una modificación del protocolo de Laure y colaboradores (141) (Figura 9). La muestra se filtró a través de dos paños de queso estériles, obteniéndose la fracción remanente ruminal (fracción retenida) y la fracción líquida (Lq).

A la fracción retenida se le adicionó 150ml de tampón PBB (Anexo 6.2) se agitó manualmente durante 30 segundos y la resuspensión se filtró nuevamente a través de dos paños de queso. A partir de este segundo filtrado se obtuvo una segunda fracción retenida y la fracción asociada (As). Con el fin de separar y descartar el material insoluble, la fracción As se centrifugó durante 15 min a 350xg a 25°C, el pellet obtenido se descartó. A la segunda fracción ruminal se le adicionó 50ml de tampón PBB (Anexo 6.2) conteniendo 0.15% de Tween 80, se agitó durante 30 segundos, y se mantuvo toda la noche a 4°C. Las fracciones de As y Lq se centrifugaron durante 20 min a 10.400xg a 4°C, y se conservaron los pellets celulares.

Al día siguiente, la fracción remanente resuspendida se filtró por dos paños de queso. Al líquido filtrado se lo llamó fracción adherida (Ad) y la tercera fracción remanente ruminal se descartó. La fracción Ad se centrifugó durante 15 min a 500xg a 4°C. El

pellet se descartó y el sobrenadante se centrifugó durante 20 min a 10,000xg a 4°C con el fin de obtener un pellet de células microbianas

Los pellet celulares de las fracciones Lq, As y Ad se resuspendieron en 1ml de tampón T₁₀E₁ (Anexo 6.2) y fueron sujetos a una centrifugación isopícnica de Percoll.

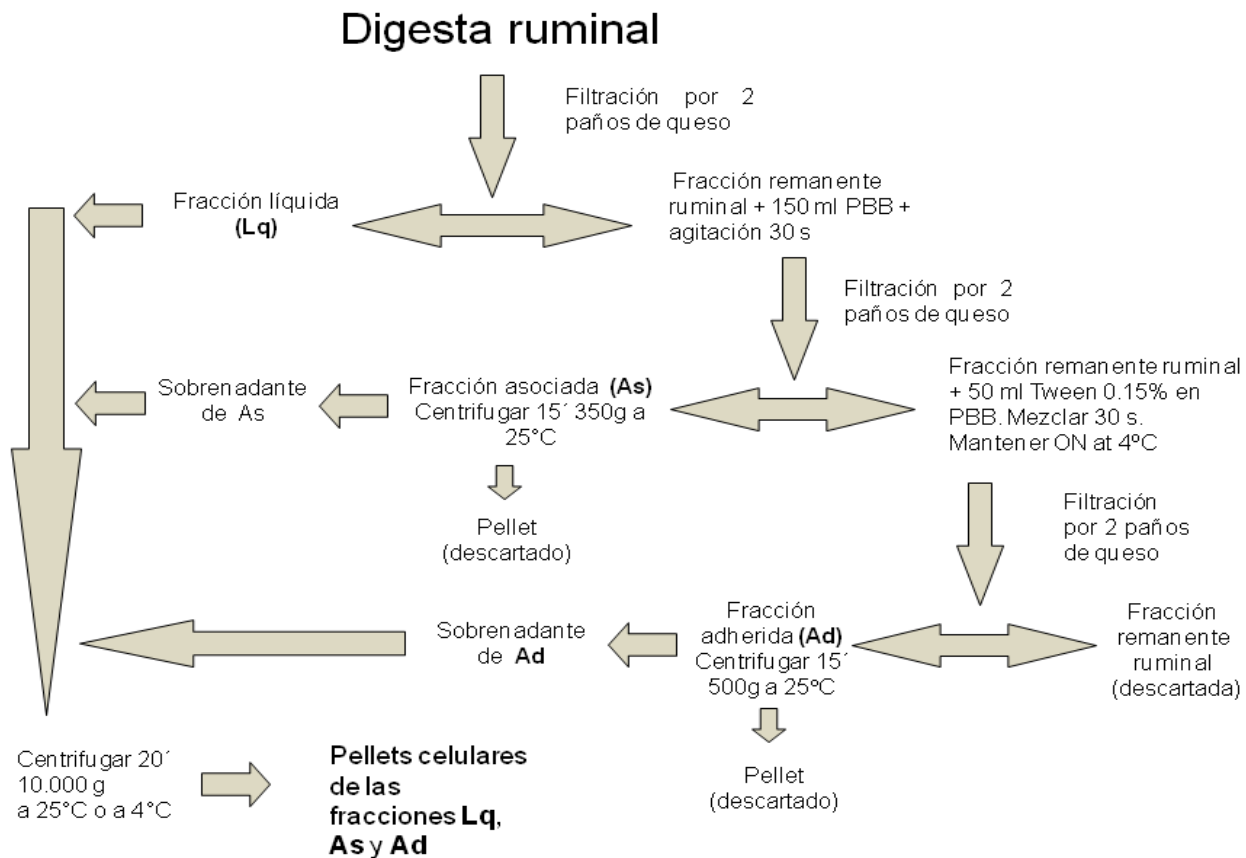


Figura 9: Esquema del protocolo seguido para el procesamiento de rumen vacuno. Adaptado de Laure y colaboradores (141).

3.1.2 Gradiente diferencial de Percoll

Con el fin de aislar las bacterias presentes en las fracciones Lq, As y Ad, cada fracción se sometió a una centrifugación isopícnica en gradiente de Percoll. La centrifugación isopícnica permite separar partículas en función de su densidad. De esta forma luego de la centrifugación es posible observar bandas o capas bien definidas, que corresponde a material con la misma densidad.

Con el fin de obtener una capa bacteriana definida en el gradiente de Percoll, se utilizaron relaciones 1:1 y 1:2 v/v de Percoll (Sigma-Aldrich, St. Louis, EEUU) de las fracciones Lq, As y Ad diluídas en tampón PBS 10% (Anexo 6.2) (204). Las preparaciones se centrifugaron durante 20 min a 14.000xg a 4°C. Las capas fueron cuidadosamente retiradas, y preparadas mediante la tinción de Gram (Gram Stain Kit, Biopack) para ser visualizadas en el microscopio (86). Las fracciones en las cuales se observó una mayor población bacteriana se seleccionaron para la posterior extracción y purificación del ADN. La o las fracciones seleccionadas para la extracción y purificación se centrifugaron a 10.400xg durante 15 min a 4°C. Los sobrenadantes se descartaron, y los pellet se mantuvieron a -80°C hasta la extracción de ADN genómico.

3.1.3 Extracción y purificación del ADN genómico bacteriano

Con el objetivo de obtener un ADN de alta calidad para su posterior clonado, se siguieron dos metodologías de extracción. La primera se basó en la extracción convencional de ADN (lisis química), en la segunda se incluyó un paso de lisis mecánica a la lisis química.

a) Extracción convencional de ADN genómico

La extracción del ADN genómico se realizó según el protocolo de Ausubel y colaboradores, con algunas modificaciones (9). Los pellet celulares obtenidos en el punto anterior fueron descongelados. Se realizó un lavado con 1,5ml de NaCl 1M, se centrifugaron durante 10 min a 800xg a 4°C y se descartó el sobrenadante. Se resuspendieron en 1,5ml de tampón T₁₀E₂₅ (Anexo 6.2) y se centrifugaron nuevamente

durante 10 min a 800xg a 4°C. Los pellets obtenidos se resuspendieron en 700µl de tampón T₁₀E₂₅ (Anexo 6.2) y se agitaron mecánicamente durante 1 minuto. Se les adicionó Lisozima (0.4mg/ml) y ARNasa (0.4mg/ml). Las suspensiones se mezclaron por inversión y se incubaron durante 30 min a 37°C. Finalizado este tiempo se agregó a las mezclas 125µl de una solución acuosa de Sarkosyl 10% con Proteinasa K (5mg/ml). Las suspensiones se homogeneizaron manualmente y se incubaron durante 1 hora a 37°C. Luego se realizaron dos extracciones con iguales volúmenes de una mezcla de fenol y cloroformo 1:1, centrifugando a 10.400xg durante 10min entre ellas. Luego las fases acuosas se transfirieron a tubos limpios y se precipitaron con 0.6 volúmenes de isopropanol y 1/10 volúmenes de acetato de sodio (AcNa) 3M pH 5.2 y se incubaron toda la noche a -20°C. El ADN se recuperó mediante centrifugación a 10.400xg durante 15 min a 4°C. Los pellet se lavaron dos veces con etanol 70%, se centrifugaron a 10.400xg durante 5 min a 4°C, se secaron al vacío durante 10 min, y se resuspendieron en 200µl de tampón T₁₀E₁ (Anexo 6.2).

b) Extracción modificada de ADN genómico con lisis mecánica

En este caso los pellets se suspendieron en 1ml de tampón de lisis (Anexo 6.2). A cada uno se le agregó 0,25gramos de bolitas de zirconia/sílica de 0.1mm (BioSpec Products). Cada mezcla se sometió a distintos tiempos de agitación mecánica (30 segundos y 1 minuto) en un homogeneizador. Los homogeneizados se incubaron a 70°C durante 15 min, agitando manualmente cada 5 min. Luego las suspensiones se centrifugaron a 4°C durante 5 min a 16.000xg. Los sobrenadantes se transfirieron a tubos limpios. Se les agregó Proteinasa K (0.3mg/ml) y se incubaron durante 1 hora a 37°C. Se adicionaron 160µl de CTAB 10% en NaCl 0.7M y las mezclas se incubaron durante 10 min a 65°C. Se realizaron dos extracciones consecutivas con igual volumen de fenol. Se centrifugó a 10.400xg durante 10 min a 4°C. La capa acuosa se retiró y se colocó en un tubo limpio. Luego se realizaron dos extracciones consecutivas con igual volumen de cloroformo. Se centrifugó a 10.400xg durante 10 min a 4°C. El ADN presente en la fase acuosa se precipitó con 0.6 volúmenes de isopropanol y 1/10 volúmenes de AcNa 3M pH 5,2, las mezclas se incubaron en hielo durante 30 min.

Finalizado este tiempo las mezclas se centrifugaron a 4°C durante 15 min a 13.000xg. Los pellet se lavaron con etanol 70%, se centrifugaron a 10.400xg durante 5 min a 4°C, se secaron a temperatura ambiente, y se resuspendieron en 200µl de agua ultrapura MilliQ. Se les adicionó RNAsa (0.4mg/ml), se incubaron a 37°C durante 15 min y se almacenaron a -20°C.

La calidad de los ADN genómicos extraídos por ambos métodos se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa 1% utilizando tampón TAE1X (Anexo 6.5).

3.1.4 Construcción de la biblioteca metagenómica

La biblioteca metagenómica se construyó utilizando como vector de clonado el fósido pCC1FOS y el Kit CopyControl™ HTP Fosmid Library Production (Epicentre Biotechnologies, Madison, WI, USA) según las recomendaciones del fabricante. El fósido pCC1FOS tiene dos orígenes de replicación, OriC que mantiene el fósido en copia simple, y OriV el que está sujeto a regulación mediada por el gen *trfA*. La presencia de la proteína TrfA induce el inicio de la replicación a partir del origen OriV, generando múltiples copias del fósido.

Por otro lado la cepa *E.coli* EPI300T1R utilizada en este sistema contiene el gen *trfA* bajo el control de un promotor inducible por arabinosa. De esta forma, en presencia de arabinosa, la proteína TrfA se expresa y se induce la producción del plásmido en alto número de copias. La biblioteca se construyó en cuatro etapas: 1) Reparación y selección de fragmentos de ADN genómico bacteriano de un tamaño entre 40-50Kb, 2) Ligación de los fragmentos de ADN en el vector pCC1FOS y empaquetamiento de los fósidos en las cápsides vacías del fago lambda, 3) Infección de *E.coli* EPI300T1R, 4) Colecta y almacenamiento de los clones transformantes. A continuación se describe cada etapa.

3.1.4.1 Reparación y selección de fragmentos de ADN genómico de entre 40-50 Kb

Con el fin de obtener ADN con extremos romos y fosforilados para su posterior clonaje, aproximadamente 20µg de ADN bacteriano extraído de rumen vacuno se sometieron a

una reacción de reparación y de fosforilación de los extremos de los fragmentos. Se utilizó la mezcla de enzimas comerciales End Repair Enzyme Mix (Epicentre) durante 45 min a 30°C. Luego las enzimas se inactivaron durante 20 min a 80°C. El producto de esta reacción se aplicó a un gel de agarosa de bajo punto de fusión (LMP) y se sometió durante 26 horas a 30V en un gel de 20Chl de largo, en tampón TAE 1X (Anexo 6.5). Como guía de selección de los fragmentos de entre 40 y 50 kb, se utilizó un marcador de peso molecular 1Kb DNA Ladder Plus (Invitrogen). El ADN genómico bacteriano del tamaño deseado se purificó utilizando el kit comercial Qiaquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

3.1.4.2 Ligación del ADN genómico al vector y empaquetamiento de los fósmidos en el fago lambda

Alrededor de 250ng de ADN reparado y fosforilado se utilizaron en una reacción de ligación de 10µl conteniendo 500ng del fósrido pCC1FOS, buffer de ligación Fast Link 10X, ATP 10mM y 2U de enzima ligasa Fast Link (Epicentre Biotechnologies, Madison, WI, USA). La reacción se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas. Luego la enzima se inactivó durante 20 min a 80°C. A continuación se agregaron 25µl de extracto de empaquetamiento (Kit de CopyControl™ HTP Fosmid Library Production de Epicentre) y la reacción se incubó durante 90 min a 30°C. Este extracto proviene de la combinación de dos cepas de *E.coli* complementarias y lisogénicas, las cuales al actuar de forma conjunta, son capaces de expresar la maquinaria necesaria para escindir y empaquetar con alta eficiencia ADN del fago λ (87). Finalizado este período, otros 25µl de extracto empaquetado se agregaron a la reacción y el sistema se incubó por otros 90 min a 30°C. Luego de la segunda incubación se agregaron 940µl de buffer de dilución del fago (PDB) (Anexo 6.2) (Epicentre Biotechnologies, Madison, WI, USA) y 25µl de cloroformo. La reacción se mezcló por inversión y se mantuvo a 4°C hasta su utilización.

3.1.4.3 Transformación de *E. coli* EPI300T1R por infección con el fago lambda

Se inició un preinóculo a partir de una colonia de la cepa de *E.coli* EPI300T1R en 5ml de medio LB (Anexo 6.1) (203) líquido suplementado con 10mM de $MgSO_4$ y se incubó durante toda la noche a 37°C. Se adicionó $MgSO_4$ al medio de cultivo, debido a que se ha demostrado que los cationes como el magnesio promueven la adsorción del fago al hospedero bacteriano (96).

Al día siguiente se inocularon 50ml de medio LB fresco suplementado con 10mM de $MgSO_4$ con 5ml del preinóculo. El cultivo se incubó nuevamente a 37°C hasta alcanzar una DO de 600nm entre 0.8-1.0. Para la infección, 100µl de este cultivo se mezclaron con 10µl de la reacción de empaquetamiento y se incubaron a 37°C durante 20 min. Se agregaron 400µl de medio LB a la reacción de infección, y el sistema se incubó a 37°C durante 20 min. Con el fin de poder manipular el número de colonias resultantes, las células infectadas se diluyeron previo al plaqueo en medio LB sólido suplementado con Chl 12,5µg/ml y se incubaron a 37°C durante toda la noche.

3.1.4.4 Colecta y almacenamiento de los clones transformantes

La colecta de los clones transformantes se realizó manualmente. Las colonias obtenidas se transfirieron a placas de 96 pocillos conteniendo 150µl de medio líquido LB suplementado con Chl 12,5µg/ml y se incubaron a 37°C toda la noche con agitación mecánica. Finalizado este tiempo, al cultivo se le adicionó 150µl de glicerol 50% (m/v). Las placas se sellaron con adhesivos plásticos estériles, cerradas con sus respectivas tapas y se almacenaron a -80°C.

3.2 Selección de clones con actividad lipolítica

Con el fin de seleccionar los clones con actividad lipolítica, se utilizaron como sustratos triacilglicéridos con distintas composiciones de ácidos grasos y largo de cadena. Se utilizaron el gliceril tributirato o tributirina, el cual está formado por tres ácidos butíricos (C4) unidos mediante enlaces éster al glicerol, el gliceril trioleato o trioleina, el cual está formado por tres ácidos oleicos (C18) unidos por enlaces éster al glicerol, y el gliceril tricaproato o tricaprilina, que está formado por tres moléculas de ácido caproico (C6),

unidos también por enlaces éster al glicerol. La utilización de estos sustratos nos permitió en primera instancia poder discriminar entre un clon con actividad lipasa y otro con actividad esterasa.

Primeramente, se realizó una detección funcional, en un medio de cultivo de selección en placa para actividad lipolítica (lipasa y/o esterasa) (Anexo 6.1). Al medio se le adicionó arabinosa 0,01% final y Chl 12,5µg/ml. Las placas se incubaron a 37°C, hasta la aparición de un halo de hidrólisis alrededor de la colonia, lo que indica un clon positivo en dicho sustrato. Luego los clones con actividad positiva en tributirina (C4), se evaluaron utilizando otros sustratos. En este caso fueron utilizados trioleína (C18) 1% v/v (Sigma) y tricaprilina (C6) 1% v/v (Sigma). A ambos medios se les adicionó arabinosa 0,01% final y Chl 12,5µg/ml y se incubaron bajo las mismas condiciones. Con el fin de confirmar que la actividad estaba adjudicada a la presencia del fósido, los clones que presentaron actividad en dichos sustratos, se retransformaron en células electrocompetentes (Anexo 6.6.1) de la cepa original *E.coli* EPI300T1R. Se realizó la extracción del ADN fosmídico utilizando el Spin Miniprep Kit (QIAGEN). Se utilizaron cubetas de 2mm y un pulso de 2,5Kv en un electroporador Modelo Micropulser (BIORAD). Se transformaron 100 µl células electrocompetentes con 200ng de ADN fosmídico mediante electroporación. Como control positivo se utilizó el plásmido pUC19 (concentración final 100pg/µl). Las colonias transformantes se seleccionaron en placas con medio LB Chl 12,5µg/ml y arabinosa 0,01% final. Las colonias que presentaron halo de hidrólisis alrededor de la colonia fueron seleccionadas para continuar con la identificación de los genes responsables de la función lipolítica.

3.3 Identificación de genes responsables de actividad lipolítica

Mutagénesis generalizada

Con el fin de identificar los genes responsables de la actividad lipasa y esterasa, los fósidos que presentaron la actividad de interés y que fueron confirmados, se sometieron a una mutagénesis generalizada *in vitro* utilizando el transposón Tn5<Km> (Epicentre Biotechnologies, Madison, USA).

La reacción de mutagénesis se llevó a cabo en un volumen final de 10µl. Se adicionaron 200ng de ADN fosmídico, el equivalente molar del transposón Tn5<Km>, 1µl de buffer y 0,5µl de transposasa. Las reacciones se incubaron dos horas a 37°C. Finalizado este tiempo se detuvo la reacción adicionando 1µl de SDS al 1% y se incubó durante 10 min a 70°C. Se obtuvieron células electrocompetentes EPI300T1R según Anexo 6.6. Se transformaron 100µl de células electrocompetentes con 1µl de cada reacción de transposición. Se utilizaron cubetas de 2mm y un pulso de 2,5kV en un electroporador Modelo Micropulser (BIORAD). Como control positivo se utilizó el plásmido pUC19 (concentración final 100pg/µl). Las transformantes conteniendo el fósido interrumpido por el transposón se seleccionaron en una primera instancia en medio LB sólido con el agregado de Km 50µg/ml. Las placas se incubaron toda la noche a 37°C. Las colonias obtenidas se repicaron a medio de selección de actividad lipolítica (LB conteniendo 1% de tributirina), suplementadas con Chl 12.5µg/ml e incubadas a 37°C. Se seleccionaron para continuar trabajando aquellos clones que presentaron una pérdida de la función lipasa/esterasa evidenciada por ausencia de halo de hidrólisis.

Con la finalidad de confirmar la presencia del transposón en los clones seleccionados se realizaron ensayos de restricción con las enzimas HindIII y BamHI y/o Sall y XhoI, debido a que el transposon Tn5, posee sitios de restricción para estas enzimas en cada uno de sus extremos. Se realizó extracción de ADN fosmídico de estas colonias transformantes utilizando el protocolo Spin Miniprep Kit (QIAGEN). En un volumen de reacción final de 10µl se digirieron 1µg de cada fósido, enzima BamHI 20u/µl (Promega), enzima XhoI 20u/µl (Promega) y buffer B10X (Promega). Se incubaron las reacciones de digestión durante toda la noche a 37°C. Con el fin de visualizar los clones que contenían o no el inserto, el ADN fue separado en un gel de agarosa, 1% en tampón TAE1X (Anexo 6.5).

Luego con el objetivo de identificar los genes responsables de la actividad lipolítica, se secuenciaron los clones mutantes a partir de los brazos del transposón (Macrogen, Inc, Tokio, Japón) y se identificaron los posibles marcos abiertos de lecturas (ORF). Para ello se utilizó la herramienta ORF Finder provista por el Centro Nacional de Información

Bioteconológica (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) ((174, 243). Los ORFs traducidos fse compararon con las secuencias conocidas depositadas en la base de datos "no redundantes" del NCBI, utilizando el programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) (6). Se realizaron alineamientos múltiples utilizando el programa MUSCLE (<http://www.drive5.com/muscle>.) con el fin de estudiar la homología con las secuencias de enzimas similares (63, 232).

3.4 Análisis filogenético de las secuencias seleccionadas

Con el fin de asignar familias y/o subfamilias de lipasas o esterases al gen o a los genes seleccionados, se realizaron búsquedas en estas secuencias de los motivos característicos conservados de cada familia, descritos por Arpygny y colaboradores (8). También se realizaron estudios de homología de secuencia con la base de datos ESTHER (<http://bioweb.ensam.inra.fr/esther>). Esta base de datos provee información sobre los genes y las secuencias proteicas de la superfamilia de las α/β hidrolasas, así como también datos bioquímicos, farmacológicos y estructurales (47, 104). Así como también, se realizaron estudios de homología con la base de datos del NCBI (188).

Se realizaron alineamientos locales de secuencias de todas las familias de lipasas y/o esterases (familia I a VIII) provenientes de organismos cultivables y no cultivables anotadas en el banco de datos de lipasas (109).

Finalmente con toda la información recabada se realizaron árboles filogenéticos, utilizando los algoritmos Neighbor Joining y Maximun Parsimony del programa Mega 5.05 (230).

3.5 Clonado del gen lipolítico lip10

3.5.1 Diseño de cebadores y amplificación del gen lip10

Con el fin de obtener el gen lipolítico Lip10 entero para su posterior clonado y expresión, se diseñó un par de cebadores específicos. Para poder clonar el gen en el vector pET14b, se adicionaron los sitios de corte para las enzimas NdeI y BamHI a los

cebadores. Se comprobó que en la secuencia del gen lipolítico lip10 no existen sitios de corte internos para estas enzimas de restricción. Para el diseño de los cebadores se utilizó la herramienta Oligo Analyser del programa Vector NTI (Vector NTI suite 6.0; www.informaxinc.com) seleccionándose cebadores que no formasen dímeros ni horquillas entre ellos (162). A continuación se muestran las secuencias de ambos cebadores. Los sitios NdeI y BamHI se indican en negrita:

PF (cebador de avance): 5' AAAA**ACATATG**ATCATGAAAAACAGAATTTCTTCG 3'

Tm: 58.2 °C

PR (cebador reverso): 5' ATTA**GGATCCA**ATCAGTTCTCCATACGG 3'

Tm: 58.8 °C

Para la amplificación del gen lipolítico Lip10 mediante la reacción en cadena de la polimerasa, en un volumen final de 50µl, se adicionaron los siguientes reactivos: 1µg de ADN molde (200ng/µl), dNTP 0.2mM, PF 500nM, PR 500nM, Buffer 10X y MgSO₄ 2mM, polimerasa de alta fidelidad Pfu (Fermentas). Se utilizó el siguiente programa: 5 min a 94°C, 30 segundos de desnaturalización a 95°C, 30 segundos de hibridación de cebadores a 50°C, 1 minuto 50 segundos de elongación a 72°C (30 ciclos) y finalmente 5 min a 72°C. Como control negativo se utilizó agua destilada en lugar del fósforo.

3.5.2 Predicción de hotspot o puntos calientes

Las proteínas heterólogas pueden ser expresadas en forma soluble o insoluble y se pueden localizar en el espacio extra o intracelular o en forma de agregaciones insolubles o cuerpos de inclusión.

Con el fin de estudiar la solubilidad de Lip10, se realizó la predicción de posibles hotspot o puntos calientes de agregación de proteínas utilizando el programa Aggrescan (<http://bioinf.uab.es/aggrescan/>) (42). Este servidor permite por medio de la utilización de un algoritmo rápido y sencillo, predecir y evaluar la presencia de puntos de agregación en las cadenas polipeptídicas.

3.5.3 Predicción del péptido señal

La mayoría de las proteínas direccionadas hacia el espacio extracelular o hacia localizaciones subcelulares portan motivos de secuencias específicas denominados péptidos señal. El mismo caracteriza el tipo de secreción o de direccionamiento que las proteínas experimentan. Con el fin de estudiar si los ORF identificados poseían señal de translocación hacia el espacio extracelular o hacia localizaciones subcelulares en donde desarrollarán su función, se utilizó el programa SignalP4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) (14, 176, 184).

3.6 Sobreexpresión de la proteína recombinante Lip10

3.6.1 Construcción del plásmido recombinante pETlip10

Para la sobreexpresión de la proteína Lip10 recombinante, se utilizó el vector de expresión pET14b de Novagen. Este vector permite obtener la proteína recombinante con el agregado de 6 histidinas en el extremo N-terminal, que permite su purificación por afinidad mediante la utilización de una columna de Ni-NTA agarosa (QIAGEN).

Con el fin de digerir el vector y el inserto para la reacción de ligación, se utilizaron dos reacciones independientes cada una en un volumen de 60µl. Se utilizó 1µg del vector pET14b obtenido mediante Spin Miniprep Kit (QIAGEN) o del producto de PCR, la enzima de restricción BamHI 20u/µl (Promega) y la enzima NdeI 10u/µl (Promega) y buffer D10X (Promega). Las reacciones se incubaron toda la noche a 37°C. Luego se inactivaron durante 30 min a 85°C. Los fragmentos se purificaron de un gel de agarosa 0,8% utilizando el QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN). Se eluyeron ambos fragmentos en 50µl de agua miliQ. Se confirmaron y cuantificaron los productos purificados mediante un gel de agarosa 1%, en tampón TAE1X (Anexo 6.5).

Para realizar la ligación del gen lip10 con el vector pET14b, se utilizó una relación vector : inserto de 1:10. Esta mezcla se concentró al vacío durante 20 min, hasta alcanzar un volumen de 11µl. Luego se adicionó buffer T4 ligasa 10X (Fermentas) y enzima T4 ligasa 400u/µl (Fermentas). La reacción de ligación se llevó a cabo toda la

noche a 4°C. Se utilizaron estos 15µl de ligación para transformar mediante choque térmico 100µl de células competentes de la cepa DH5α de *E.coli*, las cuales se obtuvieron por tratamiento químico con CaCl₂ 0.1M (Anexo 6.6.2). Como control positivo se utilizó 0.1ng de plásmido pBluescriptSK (5). Las colonias transformantes se seleccionaron en placas de LB Amp 50µg/ml. Se seleccionaron al azar 20 colonias transformantes. Se realizó extracción de plásmido de estas colonias transformantes utilizando el protocolo Spin Miniprep Kit (QIAGEN). Con el fin de confirmar la presencia se realizó un perfil de restricción utilizando las mismas enzimas que se utilizaron para la ligación, permitiendo escindir el gen lipolítico clonado lip10.

Para ello en un volumen de reacción final de 13,5µl se digirieron 0,5µg de ADN de cada plásmido, se utilizó la enzima BamHI 10u/µl (Promega), la enzima NdeI 10u/µl (Promega) y buffer D10X (Promega). Se incubaron las reacciones de digestión durante toda la noche a 37°C. Con el fin de visualizar los clones que contenían o no el inserto el ADN fue separado en un gel de agarosa 1%, en tampón TAE1x (Anexo 6.5).

3.6.2 Transformación del hésped de expresión

Para sobreexpresar la proteína recombinante Lip10 se utilizó la cepa BL21 de *E. coli* (DE3) (pLysS). Esta cepa contiene el lisógeno del fago λE3 la cual expresa el gen de la ARN polimerasa del fago T7 bajo el control del promotor lac UV5, inducible con IPTG. Además esta cepa presenta una deficiencia en una proteasa específica, lo que disminuye la degradación de la proteína recombinante expresada en la bacteria.

Se transformaron células competentes obtenidas mediante tratamiento químico con CaCl₂ 0.1 M (Anexo 6.6.2), utilizando tratamiento de choque térmico (Anexo 6.6.3). Los clones se seleccionaron en placas de medio LB Amp 50µg/ml y los clones con inserto fueron verificados en un gel de agarosa 1%, en tampón TAE1x (Anexo 6.5).

3.6.3 Crecimiento, inducción y solubilidad de lip10 en la cepa BL21 de *E.coli*

Con el fin de expresar la proteína recombinante se creció un preinóculo durante toda la noche a 37°C de células de la cepa BL21 de *E. coli* conteniendo el plásmido

pET14bLip10 en 5ml de medio LB Amp 50µg/ml y Chl 25µg/ml. Se incluyó como control negativo el vector pET14b sin inserto.

Se inocularon los 5ml del pre-inóculo en 1litro de medio 2XTY (Anexo 6.1) suplementado con los mismos antibióticos. Se incubó a 30°C y a 250rpm hasta alcanzar una DO de 600nm entre 0.5-0.7. Finalizado este tiempo, el cultivo se mantuvo en hielo por 15 min. La inducción de expresión se inició mediante el agregado de 0.5mM de IPTG y 20ml/l de etanol 95%. Los cultivos se incubaron con agitación a 250rpm a 30°C durante 4 horas y luego a 18°C durante 17 horas. Con el fin de observar el aumento en la inducción se tomaron alícuotas de 1ml a distintos tiempos de inducción, a tiempo 0 (sin inducir), a las dos horas de la inducción y a las cuatro horas de la inducción. En el caso de la incubación durante 17 horas se tomó una alícuota a tiempo 0 y otra alícuota a tiempo final. Estas alícuotas se centrifugaron 5 min a 15.500xg y los pellets celulares se resuspendieron en 100µl de buffer de corrida (Anexo 6.4). Finalizado el tiempo de incubación el cultivo se centrifugó durante 10 min a 9000xg.

Con el fin de determinar la expresión de la proteína se realizó un gel SDS-PAGE (Anexo 6.4) de la inducción de la expresión de pET14bLip10 y de pET14b sin inserto a los distintos tiempos de inducción. Se sembraron 20µl de cada muestra, así como también de Marcador de proteínas (Unstained Protein Molecular Weight Marker SM0431 (Fermentas)).

3.6.4 Purificación enzimática por cromatografía de afinidad

3.6.4.1 Obtención de la proteína recombinante Lip10 a partir del sobrenadante de medio de cultivo

Debido a que se identificó el péptido señal en la secuencia de Lip10, se estudió la expresión de la proteína Lip10 en el sobrenadante del medio de cultivo de *E.coli* BL21 pET14bLip10 inducida con IPTG. Las proteínas totales se precipitaron hasta saturación con 80% de sulfato de amonio. Para ello, al sobrenadante de 50ml de *E.coli* BL21 pET14bLip10 se le adicionó NH₄SO₄ 80% hasta disolución total con agitación constante

y se mantuvo en decantación toda la noche a 4°C. Finalizado este tiempo se centrifugó durante 10 min a 2.000xg y el pellet se resuspendió en 12ml de agua destilada. El sobrenadante se dializó utilizando una membrana de diálisis capaz de retener proteínas mayores a 12.000 Da (D9527-100FT, Sigma.Aldrich, St.Louis, USA) durante 48 horas, en tampón de diálisis (Anexo 6.2), utilizando una solución de tampón fresco cada 24 horas y se mantuvo a 4°C hasta su utilización. El sobrenadante dializado se concentró utilizando una columna VIVASPIN de 10KDa de corte (Millipore) a 7,500xg durante 10 min a 4°C y se almacenó a -20°C.

3.6.4.2 Preparación del extracto celular

El pellet celular se resuspendió en 15ml de buffer de unión (Anexo 6.3) conteniendo 150µl de PMSF 100mM por cada 5 gramos de células. Con el fin de lisar las células y liberar su contenido, la suspensión se sonicó en el sonicador Modelo 4710 Series Ultrasonic Homogenizer (Cole Palmer Instruments. Co.) a pulsos de 40% y a una potencia relativa de 4, durante 30 min con intervalos de descanso de 2 min en hielo. Al lisado celular (extracto total) se le agregó 150µl de TritónX100 10% y se realizaron dos centrifugaciones a 12.000xg durante 30 min a 4°C. El sobrenadante translúcido (fracción soluble del lisado) se centrifugó nuevamente bajo las mismas condiciones. El extracto total, la fracción soluble y la fracción insoluble se almacenaron a -20°C. Se estudió la solubilidad de las tres fracciones en geles SDS-PAGE, en tampón TAE1x (Anexo 6.4).

3.6.4.3 Purificación de la proteína recombinante Lip10

La resina de purificación se preparó utilizando 1ml de una suspensión al 50% de agarosa Ni-NTA (QIAGEN) en una columna de 10ml de capacidad. La resina se lavó con 5ml de buffer de unión (Anexo 6.3). Luego 4ml de la fracción soluble se colocaron en la resina de Ni-NTA e incubados a 4°C con agitación durante 1 hora. Finalizado este tiempo la resina se dejó decantar durante 30 min y se colectó el percolado. Como control negativo se utilizó cepa BL21 de *E.coli* con el vector pET14b sin inserto.

Se realizaron cuatro lavados con tampones conteniendo concentraciones crecientes de imidazol (20 mM, 50 mM, 75 mM y 100 mM) (Anexo 6.3). Con el fin de eluir la proteína de interés se utilizaron concentraciones aún mayores de imidazol de 100 a 250 mM, las cuales contenían glicerol 10% (Anexo 6.3). La proteína purificada se dializó utilizando una membrana de diálisis capaz de retener proteínas mayores a 12.000 Da (D9527-100FT, Sigma.Aldrich, St.Louis, USA) utilizando un buffer con la misma composición que el utilizado para realizar las eluciones pero sin imidazol (Anexo 6.3), a una temperatura de 18°C, con agitación durante toda la noche.

Con el objetivo de evaluar la pureza de la proteína purificada se analizaron alícuotas de todas las fracciones colectadas mediante un SDS-PAGE (Anexo 6.4). Se sembraron alícuotas de todas las fracciones colectadas. Las bandas proteicas se visualizaron mediante tinción con Coomassie (Anexo 6.4).

Se realizó la cuantificación proteica mediante el método del ácido bicinonínico (BCA), utilizando albúmina bovina (BSA) como patrón (Sigma-Aldrich, Inc, Saint Louis, Missouri, USA) (25). Se trabajó a partir de una concentración madre de proteína BSA de 1mg/ml, en un rango de detección entre 200-1,000µg/ml de proteína. Se determinó la absorbancia a 562nm. El valor de proteína total fue obtenido por interpolación a partir de la curva de la recta de BSA.

3.7 Caracterización bioquímica

3.7.1 Ensayo de actividad de Lip10 frente a diferentes sustratos

La actividad de Lip10 frente a diferentes sustratos se ensayó utilizando derivados de p-nitrofenilos (pNP) como p-nitrofenil acetato (C2), p-nitrofenil butirato (C4), p-nitrofenil decanoato (C10) y p-nitrofenil palmitato (C16) (Sigma, St. Louis, MO). Los sustratos se prepararon a una concentración madre de 20mM y disueltos en una solución de isopropanol/acetonitrilo (80:20; v/v). Las mezclas de reacción contenían HEPES 50 mM pH 8.0, Tritón x100 0.3%, pNP 1 mM y 50nM de la enzima purificada. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 250µl. La actividad enzimática se detectó en base a la hidrólisis del enlace éster entre el grupo acilo y el p-nitrofenil. De esta forma

se libera p-nitrofenol, el cual a pH alcalino o neutro es de color amarillo, y puede ser detectado por el aumento de la absorbancia a 410nm.

Como control negativo, la reacción se llevó a cabo bajo las mismas condiciones pero sin la presencia de la enzima, así como también se utilizó buffer de elución sin imidazol. Se determinó la actividad enzimática por espectrofotometría a una λ (lambda) de 410nm a temperatura ambiente en un lector de placas Varioskan Flash (Thermo Fisher Scientific).

Una unidad (U) de enzima se definió como la cantidad de enzima requerida para hidrolizar 1 μ mol de p-nitrofenol por minuto en las condiciones del ensayo. Como control positivo se utilizó una lipasa industrial (solución madre 1mg/ml) (L3126, Laboratorio de Grasas y Aceites, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay).

3.7.2 Determinación de la temperatura óptima de actividad de Lip10

La temperatura óptima de actividad de Lip10 se determinó midiendo la actividad a las temperaturas de 30°C, 40°C, 50°C y a 60°C. Como sustrato se utilizó el pNP butirato (C4) en las condiciones descritas previamente en 3.7.1. Las reacciones se monitorearon durante 30 min, midiendo valores cada 2 min, y con agitación de 250rpm de 10 segundos previos a cada medida realizada. Las reacciones se realizaron por triplicado. Como control negativo de las reacciones se utilizaron los mismos sistemas de reacción sin la presencia de la enzima.

3.7.3 Efecto del pH sobre la actividad de la enzima Lip10

El pH óptimo de la enzima purificada se determinó midiendo la actividad enzimática en soluciones tampón con diferentes valores de pH. Se utilizaron los tampones 100mM de MES 5.5, MES 6.0, HEPES 7.0, HEPES 7.5, HEPES 8.0, TRIS-HCl 8.5, TRIS-HCl 9.0, carbonato 9.5, carbonato 10.0 y carbonato 10.5. El sustrato utilizado fue pNP butirato (C4). Las reacciones se monitorearon durante 15 min a 40°C bajo las mismas

condiciones anteriormente descritas. Se realizaron tres repeticiones por pH. Como control negativo de las reacciones se utilizaron los mismos sistemas de reacción sin la presencia de la enzima.

3.7.4 Determinación de los parámetros cinéticos

Con el fin de determinar los parámetros cinéticos de la proteína purificada, se utilizó el modelo cinético descrito por Michaelis-Menten (118). Para ello se estudió la cinética enzimática de la reacción utilizando concentraciones crecientes de sustrato de 0.1mM a 2.0 mM, a valores de pH y temperatura óptimos. Como sustrato se utilizó el pNP butirato (C4) en las condiciones de reacción descritas previamente. Las reacciones fueron monitoreadas durante 30 min, midiendo valores cada 2 min, y con agitación por 10 segundos a 250rpm previo a cada medida realizada. De esta forma, al monitorear la liberación de p-nitrofenol (de color amarillo), en función del tiempo se obtiene la denominada curva de la cinética de reacción. Para construir el modelo se determinó la velocidad inicial de la reacción (V_0). La velocidad inicial de reacción es la variación de concentración de reactivos o productos en el tiempo, en condiciones iniciales.

Las reacciones se realizaron por triplicado. Como control negativo de las reacciones se utilizaron los mismos sistemas de reacción sin la presencia de la enzima.

RESULTADOS

- 4.1 Construcción de una biblioteca metagenómica a partir del contenido ruminal vacuno
- 4.2 Selección de clones con actividad lipolítica
- 4.3 Identificación de genes responsables de actividad lipolítica
Mutagénesis generalizada
- 4.4 Clonación del gen lipolítico Lip10
- 4.5 Análisis filogenético de las secuencias seleccionadas
- 4.6 Sobreexpresión de la proteína recombinante Lip10
- 4.7 Caracterización bioquímica

4.Resultados

4.1 Construcción de una biblioteca metagenómica a partir del contenido ruminal vacuno

4.1.1 Colecta y procesamiento de las muestras

Tanto la colecta como el procesamiento de las muestras se realizaron en el mismo día con el fin de evitar posibles alteraciones en la composición del ecosistema, como ser una proliferación excesiva de algunos grupos de microorganismos o afectar la integridad de las poblaciones anaerobias.

A partir del procesamiento de la muestra de digesta ruminal se obtuvieron tres fracciones, Lq (fracción líquida), As (fracción asociada) y Ad (fracción adherida).

Estas fracciones se sometieron a una centrifugación isopícnica en gradiente de Percoll (Figura 10).

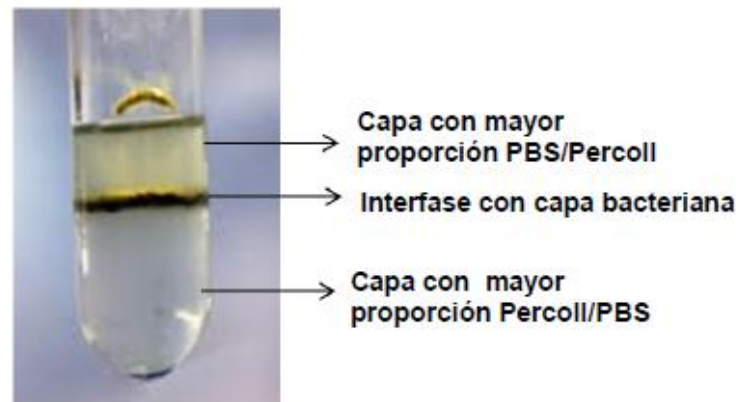


Figura 10: Resultado de la centrifugación isopícnica en gradiente de Percoll. En la misma se observan una capa superior la cual contiene mayor proporción PBS/Percoll, luego la interfase con capa bacteriana y en la parte inferior la fase que contiene mayor proporción Percoll/PBS

Las observaciones al microscopio de las tinciones Gram mostraron que la fracción Lq (fracción líquida) (Figura 11.B) fue la que presentó una población más abundante, en

comparación con las fracciones Ad y As (Figura 11 A y C). En base a estos resultados se decidió utilizar la población bacteriana presente en la fracción líquida para la construcción de la biblioteca metagenómica (igualmente se decidió extraer el ADNg proveniente de las tres fracciones).

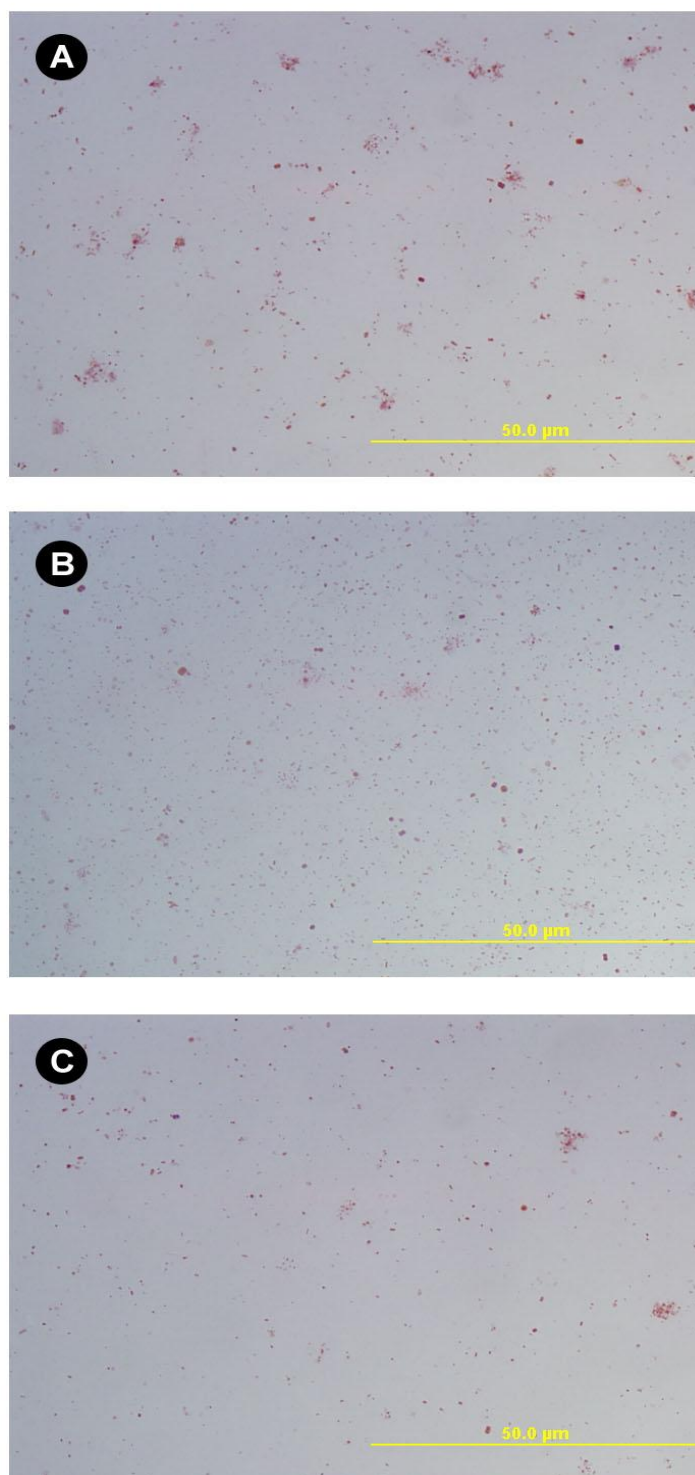


Figura 11: Microscopía de las fracciones obtenidas luego del procesamiento de la muestra de rumen vacuno. Las tres fracciones se sometieron a tinciones de Gram para evaluar la abundancia de microorganismos. (A) fracción Ad, (B) fracción Lq y (C) fracción As.

4.1.2 Extracción y purificación del ADN genómico bacteriano

Para obtener el ADN total presente en las distintas fracciones bacterianas aisladas con la calidad y tamaño esperado, se decidió comparar dos técnicas de extracción de ADN. Una técnica de extracción por lisis química y otra técnica en la que además de la lisis química, se incluyó un paso lisis mecánica con esferas de zirconia. La calidad del ADN extraído fue evaluada en un gel de agarosa 1%, en tampón TAE1x (Anexo 6.5) (Figura 12).

Para la extracción convencional, se observó en la mayoría de las muestras un patrón de bandas tenues y menores a 20Kb (Figura 12 carriles del 2 al 7), lo cual indica que el ADN extraído estaría degradado.

Por otro lado, el ADN extraído con la segunda metodología fue semejante para las tres fracciones y de alto peso molecular (Figura 12, carriles 8 a 12).

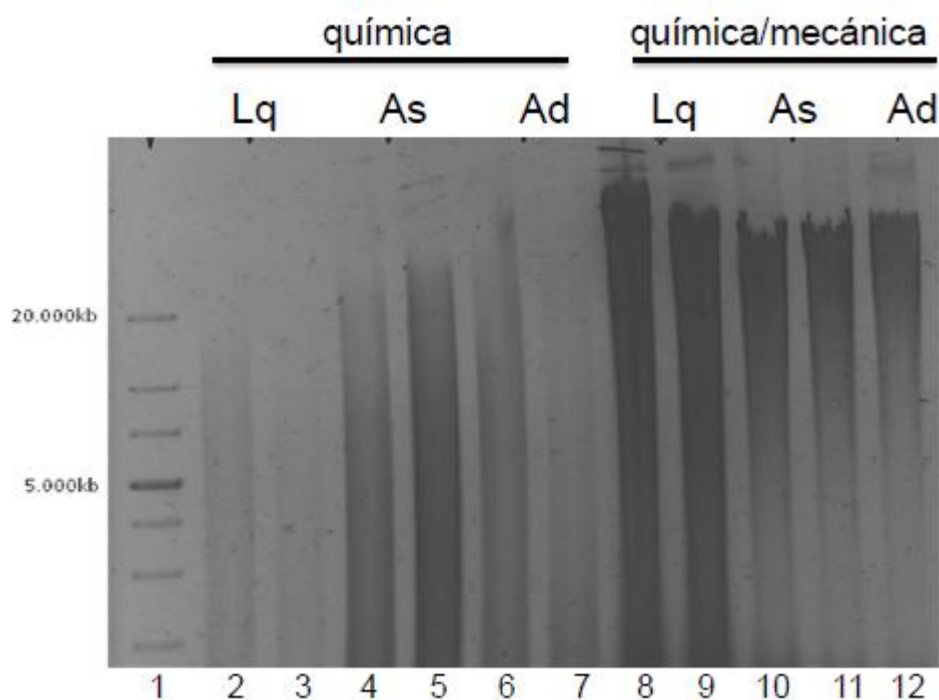


Figura 12: Gel de agarosa 1% con las distintas fracciones (Lq, As y Ad) extraídas con lisis química y con lisis química/mecánica (esferas de zirconia). De izquierda a derecha, carril 1 ; MPM 1 Kb DNA ladder plus (Fermentas), carriles 2 y 3 ;fracciones Lq, carriles 4 y 5 ;fracciones As, carriles 6 y 7 ;fracciones Ad, carriles 8 y 9 ;fracciones Lq, carriles 10 y 11; fracción As y carril 12 fracción Ad.

A partir de estos resultados se decidió utilizar la segunda metodología de extracción ya que produce ADNg de alto peso molecular adecuado para su clonado. Con la finalidad de optimizar la calidad el ADN obtenido se realizaron pruebas a distintos tiempos de agitación mecánica con esferas de zirconia (30 segundos y 1 minuto). En el gel de electroforesis en agarosa 0.6% de la figura 13 se muestran los patrones de ADN extraído y fragmentado a distintos tiempos para cada fracción (Figura 13).

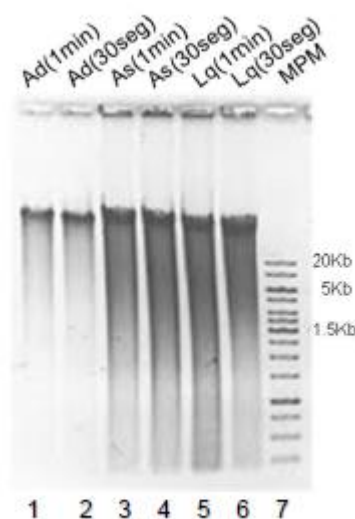


Figura 13: Selección de fragmentos para la construcción de la biblioteca metagenómica. Electroforesis en gel de agarosa 0.6% en buffer TAE 1X del ADN extraído y fragmentado de las fracciones Ad, As y Lq. Se indica entre paréntesis el tiempo de tratamiento mecánico realizado. De izquierda a derecha, carriles 1 y 2; fracción Ad, carriles 3 y 4; fracciones As, carriles 5 y 6; fracciones Lq y carril 7; MPM 1 Kb DNA Ladder plus (Fermentas).

No se observaron diferencias significativas entre los dos tiempos de agitación mecánica por lo que se decidió utilizar al ADN extraído utilizando cualquiera de estas dos condiciones.

4.1.3 Ligación, empaquetado y transformación

El ADN de un tamaño entre 35-40Kb se purificó de gel y utilizó en reacciones de ligaciones con el fósido pCC1FOS. Las reacciones de ligación se transformaron en la

cepa EIP300T1R de *E.coli*, la cual permite el mantenimiento e inducción de los genes clonados en el fósido.

4.2 Selección de clones con actividad lipolítica

A partir de la transformación de *E. coli* EPI300T1R por infección con las partículas del fago lambda conteniendo el ADN fosmídico se obtuvieron aproximadamente 27.500 clones. Considerando un tamaño medio de inserto de 35Kb. El total de ADN de esta genoteca es de aproximadamente 1.2 Gb. Dichos clones se ordenaron en grupos de 12 por pocillo, en placas de 96 pocillos, conteniendo medio LB Chl25µg/ml. De esta forma, se redujo el espacio de almacenamiento necesario para mantener la biblioteca, así como también, el volumen de material necesario para realizar cada selección de actividad.

En base a que tanto las lipasas como las esterases son capaces de hidrolizar TAG de ácidos grasos de cadena corta, se utilizó el gliceril tributirato o tributirina como sustrato para la selección de clones con actividad. Se realizó una identificación de los grupos con actividad lipasa y de esterasa en medio sólido conteniendo como sustrato tributirina al 1%. La actividad enzimática se evidenció por la formación de un halo de hidrólisis alrededor de la colonia. Mediante esta metodología se identificaron 18 grupos con la capacidad de hidrolizar tributirina.

Con el fin de identificar el clon responsable de dicha actividad, cada grupo positivo se realsó en el mismo medio de selección, hasta la obtención de un único clon puro con actividad lipolítica. Se identificaron 8 clones positivos en tributirina 1%, los cuales se nombraron como Lip4, Lip5, Lip6, Lip7, Lip8, Lip9, Lip10, y Lip12 (Tabla 3).

Debido a la capacidad de hidrolizar tributirina podemos decir que los fósidos presentes en estos clones tienen actividad lipasa y esterasa. Los mismos se sembraron en medios conteniendo otros sustratos como la trioleína (C18) y tricaprilina (C8). Ningún clon de los seleccionados fue capaz de hidrolizar la trioleína. Estos resultados sugieren que los 8 clones identificados presentaban actividad esterasa (Tabla 3).

Tabla 3: Identificación de clones con actividad lipolítica.

Sustrato	Número de clones funcionales
Tributirina	8
Tricaprilina	0
Trioleína	0

En la Figura 14 se muestran tres clones con actividad lipolítica positiva en tributirina, evidenciado por la aparición de un halo de hidrólisis alrededor de la colonia a partir de las 24 horas de inoculación. Como control negativo se utilizó un clon de la cepa EPI300T1R de *E. coli* transformada conteniendo el fósido sin el inserto.

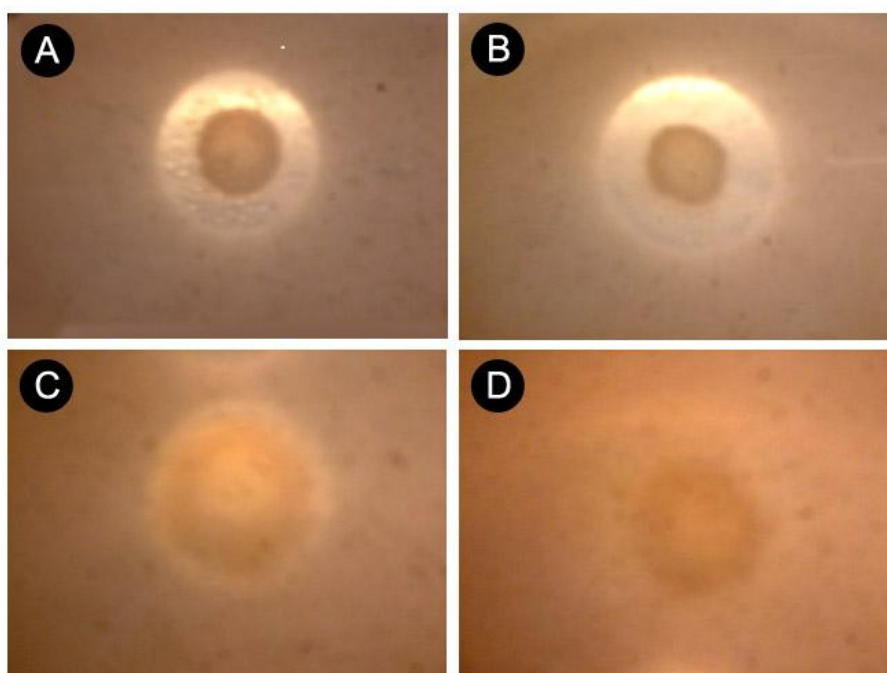


Figura 14: Clones con actividad lipolítica en medio tributirina 1%, 5 días luego de la inoculación. (A) clon Lip4, (B) clon Lip5, (C) clon Lip10 y (D) control negativo.

Con el fin de confirmar en fenotipo lipolítico, los 8 clones fueron retransformados en la cepa EPI300T1R de *E. coli*, por electroporación. Las colonias transformantes fueron

seleccionadas en placas con medio LB Chl 25µg/ml y arabinosa 0,01% final. Se confirmó el fenotipo de los clones Lip4, Lip5, Lip6, Lip7, Lip10 y Lip12.

4.3 Identificación de clones con actividad lipolítica

4.3.1 Mutagénesis generalizada

Con el fin de identificar los genes responsables de la actividad lipolítica, los 6 clones confirmados (Lip4, Lip5, Lip6, Lip7, Lip10 y Lip12) que presentaron actividad en tributirina se sometieron a una mutagénesis generalizada *in vitro* por inserción de un transposón.

El transposón puede insertarse tanto en el gen que codifica para la actividad lipolítica, así como en regiones regulatorias. En caso de que la actividad lipolítica estuviese codificada por un único gen, su interrupción, por medio de la inserción, provocaría la pérdida de la función. La pérdida de la actividad se evidenció por la ausencia de un halo de hidrólisis alrededor de la colonia (Figura 15).



Figura 15: Identificación de clones que perdieron la actividad lipolítica en medio tributirina 1% obtenidos por mutagénesis generalizada *in vitro* utilizando el transposón Tn5 <Km>. Las flechas indican dos mutantes inactivos.

Con esta metodología se obtuvieron cinco mutantes provenientes de los clones Lip4, Lip5, Lip6, Lip10 y Lip12. No se obtuvieron colonias mutantes provenientes del clon Lip7, por lo cual se descartó. Con la finalidad de confirmar la presencia del transposón se realizaron perfiles de restricción utilizando enzimas que permitieran escindirlo (tamaño esperado 1.221pb). A partir de los 5 mutantes provenientes de los clones seleccionados se realizaron ensayos de restricción con las enzimas HindIII y BamHI y/o Sall y XhoI, debido a que el transposon Tn5, posee sitios de restricción para estas enzimas en cada uno de sus extremos. El perfil de restricción de los mutantes mostró una banda de aproximadamente 1.200pb, correspondiente al transposón escindido y un perfil propio de cada fósido que nos permitió diferenciarlos. Se seleccionaron mutantes provenientes de los clones lip4, lip5, lip6, lip10 y lip12 que mostraron diferentes perfiles de restricción entre ellos, para ser secuenciados.

4.3.2 Secuenciación

Las secuencias flanqueantes al sitio de inserción de los transposones en los cinco fósidos mutantes se secuenciaron (MacroGen Inc. Seoul, Korea) utilizando los cebadores KAN-2 FP-1 (5'-ACCTACAACAAAGCTCTCATCAACC-3') y KAN-2 RP-1 (5'-GCAATGTAACATCAGAGATTTTGAG-3') provistos en el Kit CopyControl™ HTP Fosmid Library Production (Epicentre Biotechnologies, Madison, WI, USA).

Se identificaron los posibles marcos abiertos de lecturas (ORF) para cada uno de los clones. Para ello se utilizó la herramienta ORF Finder provista por el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Los ORFs identificados se compararon con las secuencias conocidas depositadas en la base de datos no redundantes (nr) "non-redundant database" utilizando el programa BLASTp (6).

Las secuencias de los clones mutantes lip4 y lip12 no resultaron ser de buena calidad, y fueron descartadas, debido a posibles dobles inserciones del transposón.

Las secuencias de los clones Lip5, Lip6 y Lip10 mostraron alta similitud con proteínas de las familias de esterasas (Tabla 4). Lip5 mostró la mayor homología (75%) con una carboxilesterasa tipo B, proveniente de una bacteria no cultivable, perteneciente a la familia de lipasas/esterasas DUF 2424 (pfam 10340). Por otro lado, la secuencia del

clon Lip6, mostró homología con una carboxilesterasa termoestable proveniente de una bacteria no cultivable.

Tanto la secuencia del clon Lip 5 como la del clon Lip6, presentaron la tríada catalítica característica de las familias lipolíticas descritas por Arpigny y Jaeger (8).

Tabla 4: Resultados del análisis por blastp de los clones mutantes Lip5, Lip6 y Lip10 secuenciados.

Se muestran los resultados de los hits con mayor homología

Ident.	N ° acceso	Tríada catalítica	Descripción	Máximo de cobertura	e-value	Familia (DUF/pfam)	Máxima identidad
Lip5 (ORF5)	AFQ23779.1	SDH	Carboxilesterasa tipo B (bacteria no cultivable)	83%	0	DUF2424 /pfam 10340	75%
Lip6 (ORF6)	AFQ23771.1	SDH	carboxilesterasa termoestable (bacteria no cultivable)	94%	3e-111	pfam07859	62%
Lip10 (ORF3)	ABI17943.1	DSH	Esterasas Est5S (bacteria no cultivable)	95%	0	DUF3089 /pfam11297	92%

La secuencia del clon Lip10 mostró una máxima identidad (92%) con una potencial esterasa denominada Est5 proveniente de un organismo de rumen vacuno no cultivable (128). Además, Lip10 pertenece a la superfamilia DUF3089, que agrupa hidrolasas de función desconocida. También, la proteína mostró el motivo conservado GX SXG presente en la mayoría de las hidrolasas de origen bacteriano identificadas.

El resultado de la secuenciación de Lip10 no permitió obtener el ORF completo. Con el fin de obtener la secuencia aminoacídica completa y teniendo en cuenta la alta homología con la esterasa Est5S, se decidió utilizar esta información para lograr amplificar el gen entero de Lip10, y su posterior clonado.

4.4 Clonación del gen lipolítico lip10

A partir del diseño de los cebadores para la amplificación del gen Lip10 (que incluía parte de la secuencia de la esterasa Est5S) se logró amplificar un fragmento del tamaño deseado (aprox. 1300pb). Como se observa en la Figura 16, se obtuvo una única banda del tamaño esperado.

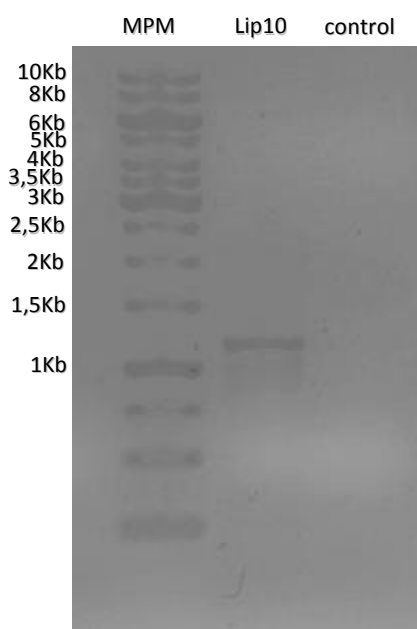


Figura 16: Gel agarosa 1% con el producto de la amplificación del gen lip10. De izquierda a derecha, carril 1; MPM 1 Kb DNA ladder plus (Fermentas), carril 2 ; Lip10, carril 3 ; control sin ADN.

El producto amplificado se purificó desde el gel, y se digirió con las enzimas BamHI y NdeI. Por otro lado, el vector pET14b también se digirió con las mismas enzimas de restricción y purificó de gel. Las reacciones de ligación de Lip10 con el plásmido pET14b se transformaron en células de *E.coli* DH5α y los transformantes se seleccionaron en placas de medio LB Amp 50μg/ml.

4.4.1 Motivos conservados en Lip10

El gen *Lip10* está formado por 1.317 pb y codifica una proteína de 439 aminoácidos. En base a los estudios de homología con la esterasas Est5S, la secuencia aminoacídica de la proteína Lip10, parecería presentar una tríada catalítica alterada formada por los residuos (Asp) D-S-H (Figura 17). Se identificaron once residuos de aspartato conservados en las posiciones 59, 91, 113, 159, 165, 226, 241, 271, 294, 279 y 304. También se observaron dos histidinas conservadas en las posiciones 188 y 341, y una serina conservada en la posición 189. La histidina en la posición 188 y la serina catalítica en la posición 189, se observaron formando parte del pentapéptido conservado GHSQG. Cabe destacar que la presencia de residuos de aspartato precediendo a la Ser189 no es común en las tríadas catalíticas de estas enzimas

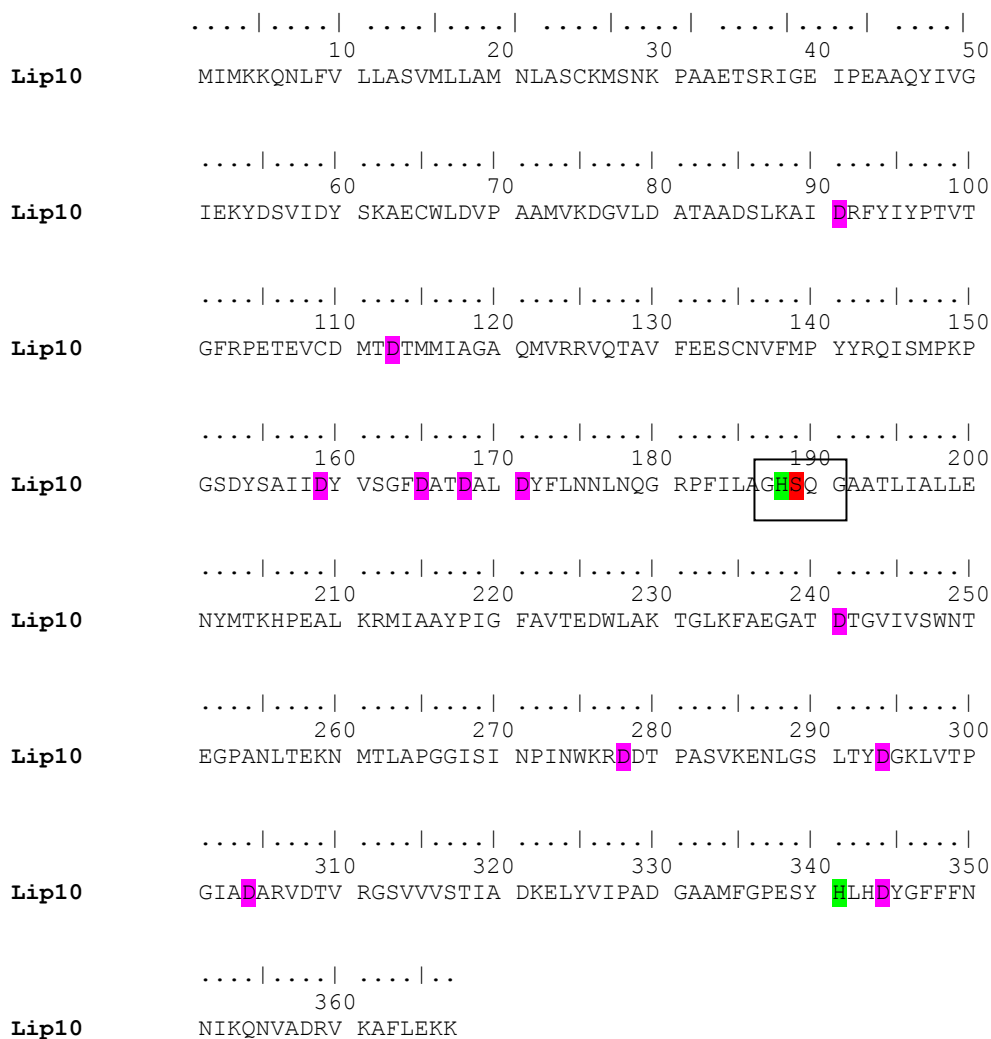


Figura 17: Secuencia aminoacídica de la proteína Lip10. El pentapéptido conservado formado por los residuos GHSQG se encuentra recuadrado. En color rojo se muestra la serina catalítica en la posición 189 (Ser189) formando parte del pentapéptido conservado, en color violeta se muestran los residuos de aspartato conservados y en color verde se muestran los residuos de histidina conservados.

Con el fin de estudiar la similitud con las secuencias que presentaron mayor homología utilizando el programa blastp, se realizaron alineamientos múltiples utilizando el programa MUSCLE (232) del ORF traducido de Lip10 (Figura 18).

```

Est5S      : DS-VIIYGGQANMLDVAALVKDGTLDGTAADSLKAVVVFYIYPTV---TGFRP-ETEVCEMTTMMISG : 119
gi|4018371 : QT-KLDYSKDECNLEK-----AEATKPVVFYIYPTV---TGFRD-PVQICEITDSEIVAG : 106
gi|4018371 : QT-KLDYSKTENWVER-----AEAKKPVVFYIYPTV---TGFRD-PVQICEVTDSEMVAG : 113
gi|4018371 : QT-KLDYSKAENWVER-----TEATKPVVFYIYPTV---TGFRD-PVQICEVTDSEMVAG : 104
gi|5723387 : ---ATDSNPNDMLALF-----PQAVMEVIFLYLPAVYHKQASTD--PDICBVNNOMMRFQ : 83
gi|3790116 : ---PTDYSQSEHMLNVF-----AEITKAPVVFYLYPSAWAKVNADD--PIVCEIDNPVMLSQ : 92
gi|4018371 : QPEIIDSQDKVNLALF-----EITKDVDAIYIYSASYVESSFDDGASNYVFIIDNPIMIF : 327
gi|4018371 : QPETIIDSQKANLALF-----EITKDVDAIYIYSASYVESSFDDGASNYVFIIDNPIMIF : 325
Est23      : ---PIDYSQKANYRIF-----EITKDVETFFIYFGEY--VGFNEGDPDYAFIDNEEMVQG : 56
gi|3108260 : ---PTDYAVAAANLALF-----DTPDKPVVFYLYPAAWHKESAE--PNICTVDNATIRET : 87
gi|3743159 : LP-PSYANPNLNLALF-----TDGKEVEVVFYLYPAAVWA-KAHQD-EPIFFSIDNEMMHSG : 82
EstGK1_    : ---PLDYSNKANWCKIF-----EVTKEDETFYVYPAEYILGSMAPGAPDYADMNAEMLEG : 58
lip10      : DS-VIIYSKAECLDVAAMVKDGVLDATAADSLKATRFYIYPTV---TGFRP-ETEVCEMTTMMIAG : 119

```

```

Est5S      : AKMVRQIQTVGFDESCNVFMPYRCSMPK-----PGSDYRAIIDY---VSKFDATE---ALDYELNNLN : 178
gi|4018371 : AKMVRQIQTVGFDESCNVFMPYRCSMPK-----PGTDYSSVTNY---LSGFDATE---ALDYELNNLN : 165
gi|4018371 : AQMVRVRQTVGFDESCNIYMPYRCSMPK-----PGTDYRFVTNY---LSGFDATE---ALDYELTHLN : 172
gi|4018371 : AKFVRQVQTVGFDESCNIYMPYRCSMPK-----PGTDYRFVTNY---LSGFDATE---ALDYELTHLN : 163
gi|5723387 : AQMAYKLQATAFETVGNIAFYRFGDAAACLSLTEEDRYNL-----LSGAPEETAMAAFDYIKHFN : 146
gi|3790116 : SKLAYDRQATAFETSANIFAPYRFGDAGS-----TLQMSVDEQQDPAKGIPLTSMAAFDYIDHYN : 155
gi|4018371 : ANGEYETNATLFEESCNVFAFYRFGAGMRY-----ANEIAKKTGNIDAPAGLSYTIKASLDYFENCN : 392
gi|4018371 : ANGEYETNATLFEESCNVFAFYRFGAGMRY-----ANEIAKKTGNIDAPAGLSYTIKASLDYFENCN : 390
Est23      : VACIYMTQANLPEDATNLEFMPYRFGVGLRY-----AEVYVYATGSIDAPAGIPYETITGALDYFHEYN : 121
gi|3108260 : APEMLRQQASVFPVAVYAPYRFGADAAVCLGSHDEEYAL-----LNGVFKTEVFAAFDYIHEHEN : 150
gi|3743159 : AKMAFLLQASAFESVGNIAFYRFLDAAYVLLPPEERHSA-----LETVPVTAAVAFDYIHHYS : 145
EstGK1_    : AEGEYLLHATAYADSTNVFMPYRFGVGLRH-----AGEVVKRDGIFDASAGMPYGEIVAAALDYFHEYN : 123
lip10      : AQMVRVRQTVGFDESCNVFMPYRCSMPK-----PGSDYSAIIDY---VSGFDATE---ALDYELNNLN : 178

```

```

Est5S      : GRPFILAGHSQGSASVLIALLENYMTKHPEALKRMVAAYPIGFAYVTFDLAK-TGLRFAEGATDGGVVS : 247
gi|4018371 : GRPFILAGHSQGSASTLINLLENYMTKHPEALKRMVAAYPIGFAYVTFDLAR-TGLRFAEGATDGGVVS : 234
gi|4018371 : GRPFILAGHSQGSSTLLNLLLENYMTKHPEHLRSMVAAYPIGFAYVTFDLER-TGLRFAEGATDGGVVS : 241
gi|4018371 : GRPFILAGHSQGSSTLLNLLLENYMTKHPEHLRSMVAAYPIGFAYVTFDLER-TGLRFAEGATDGGVVS : 232
gi|5723387 : NGRPFILAGHSQGSSEILLYLLSYMGKHPDVYKQIAAAYAGYSVTEQYLAKNPHLRFAENATDGGVVS : 216
gi|3790116 : NGRPFILAGHSQGSNMVMIYILQYMKHEPDVYKRMVAAYVLGYSITDYLAEENTLRFATGSGDGGVVS : 225
gi|4018371 : NGRPFILAGHSQGSAMVRYVLKNYFSEHLDYVQRMVAAYPIGFATKDDLEAYPHLRFAETGSGDGGVVS : 462
gi|4018371 : NGRPFILAGHSQGSAMVRYVLKNYFSEHLDYVQRMVAAYPIGFATKDDLEAYPHLRFAETGSGDGGVVS : 460
Est23      : GRPFILAGHSQGSALAKLVKMYFKEHPDYKRMVAAYVIGYAVTFDLAANPHLRFAETGSGDGGVVS : 191
gi|3108260 : NGRPFILAGHSQGSNMVLLYLLDEYMEKNPEVYARMVAAYVIGYSVTEQYLAQNPHLRFAEADTGGVVS : 220
gi|3743159 : NGRPFILAGHSQGSVLLLLSSYMKDHPVEAARMVAAYCIGCSVTEQFLQENPHLRFAQGSDDGGVVS : 215
EstGK1_    : GRPFILAGHSQGSALVKMVLKMYFAEHDPDYKRMVAAYPIGYAVTFDEFTKYPHLRFAETGSGDGGVVS : 193
lip10      : GRPFILAGHSQGAATLIALLENYMTKHPEALKRMVAAYPIGFAYVTFDLAK-TGLRFAEGATDGGVVS : 247

```

```

Est5S      : WNTGPTNLK--ENNMTAPGGISINPINKRDDTPASVKENLGSL-----TYDGKLVTPGI-A : 303
gi|4018371 : WNTGGAANKD--AKNVVAPGGISINPINKRDDTYAPVSDNLGSL-----DITGKLVTPGI-A : 290
gi|4018371 : WNTGEGVGNKD--AKNATAPDGLSINPINKRDDTYASAKDNLGSL-----DEMTGRVIVPGI-V : 298
gi|4018371 : WNTGEGVGNKD--AKNATAPDGLSINPINKRDDTYAPVKDNLGSL-----DETTGKVIIVPGI-A : 289
gi|5723387 : YNTQAAEIE---GKNLVSEGLVINPISTTRDDVPASASENLGSLPGADGYIPINPDTLKKIMGL-A : 282
gi|3790116 : YNTQAPTIE---GTDAYVLPHTAHVINPISTTLDETVPASENLGSLQLNSDGSVVKNDGTPVQVMNF-A : 291
gi|4018371 : YNTGPKNVENARNVPLPGAISINPINKLDETYASASENKGLV-----QNKETGAREFVDLGV : 524
gi|4018371 : YNTGPKNVENARNVPLPGAISINPINKLDETYASASENKGLV-----QNKETGAREFVDLGV : 522
Est23      : WNTGKRNVEENKTVAYLKPNAISINPINKLDETYASASENKGLV-----PNMETQRYEIADIGA : 253
gi|3108260 : YNTEAPGVT---ADNPVLPGAVINPISTRTDETLAPAEQSLGSA-----SREDPSVKSLSF-A : 276
gi|3743159 : YNTEGPSIE---GPNFVLPGALVINPISTTRGECHPADENCGLM-----LGKDGKPVTLPSF-A : 273
EstGK1_    : WNTGPPRNREVNADTCVCPGMSINPINKLDDTYPASNLGSLY-----MDEKTGEVKMGDVG-A : 255
lip10      : WNTGEPANLT--EKNMTAPGGISINPINKRDDTPASVKENLGSL-----TYDGKLVTPGI-A : 303

```

```

Est5S      : DARVDTVRGSVVWSSIAEKELYAIPADGAVMFGPESYELHDYGFENNFKCNVADRVKAFLEK---- : 366
gi|4018371 : DARVDTVRGSVIITADAATYTI-PADGAPLFGPESYELHDYGFENNFKCNVADRVKAFLEK---- : 352
gi|4018371 : DARVDTVRGSVVWTTAAAKPFAISEKEAVPLFGPECYHRNDYGFENNFKCNVADRIRAFVEK---- : 361
gi|4018371 : DARVDTVRGSVVWTTAAAKPFAISEKEAVPLFGPECYHRNDYGFENNFKCNVADRIRAFVEK---- : 352
gi|5723387 : DARVDSKGVLCSSVDAEAWF----SGNPVLGKGVHSYDYSPFYNNLRCAADRARAFLDNNG-- : 343
gi|3790116 : DACVDKTKGLICTVDVDTYA---PGSAVFGRGVBHSYDPPFYFNIRANAEEFVANYLKKNK-- : 352
gi|4018371 : DACINLARGVIVTKTAPVT-----DGKEFFGPASBENDYSFFYNNLRQENVAKRIAAKNNN--- : 582
gi|4018371 : DACINLARGVIVNTTAPVT-----EGKEFFGPASBENDYSFFYNNLRQENVAKRIAAKNNN--- : 580
Est23      : DACVWPGRGIVTKAEMEPLPEGLEELFTRVFGDGRHETDVALYNNIKENVAKRIAAKASR--- : 317
gi|3108260 : DARIDKVRGOLICDNQDTDALA---PGNAVFPFEGVYEGDYAPFYNNLRNAGQRIEAYLARR--- : 336
gi|3743159 : DACVSKRGVGVVCTTVSQALPTL---ASSALFPKGVHSYDYSLYFNICQNAENRAKLFLQR--- : 333
EstGK1_    : DACVSPDRGVVWTHAKGEPMTAEKAAYEYFFGPDGRHGEDYALFYCNIRANVAKRIAAKATKLGL : 322
lip10      : DARVDTVRGSVVWSTIADKELYVIPADGAAMFGPESYELHDYGFENNFKCNVADRVKAFLEK--- : 367

```

Figura 18: Resultado de los alineamientos realizados con el ORF traducido de Lip10 y sus homólogos más cercanos (ABI 17943 Est5S uncultured bacterium, ADE 28719 EstGK1 uncultured bacterium, YP_003958445 hypothetical protein *Eubacterium limosum* FIST612, YP_005062358 hypothetical protein *Sphaerochaeta plemorpha* str. Grapes, YP_005269460 hypothetical protein, AWOC17910 *Acetobacterium Woodii* DSM 1030, AFQ 23773 esterase uncultured bacterium, AFQ 23774 esterase uncultured bacterium, AFQ 23777 esterase uncultured bacterium, AFQ 23782 esterase uncultured bacterium, AFQ 23784 esterase uncultured bacterium, YP_182096 hypothetical protein DET 1386 *Dehalococcoides ethenogenes* 195 y Lip10). Se utilizó la herramienta Muscle del programa Mega5.05. Los residuos que constituyen el pentapéptido GHSQG conservado se encuentran sombreados en amarillo. Otros motivos similares se encuentran sombreados en color negro.

Con el fin de estudiar la filogenia de Lip10 se realizaron dos árboles filogenéticos, utilizando el algoritmo Neighbor Joining y el algoritmo Maximun Parsimony del programa Mega5.05 (Figura 19a y Figura 19b).

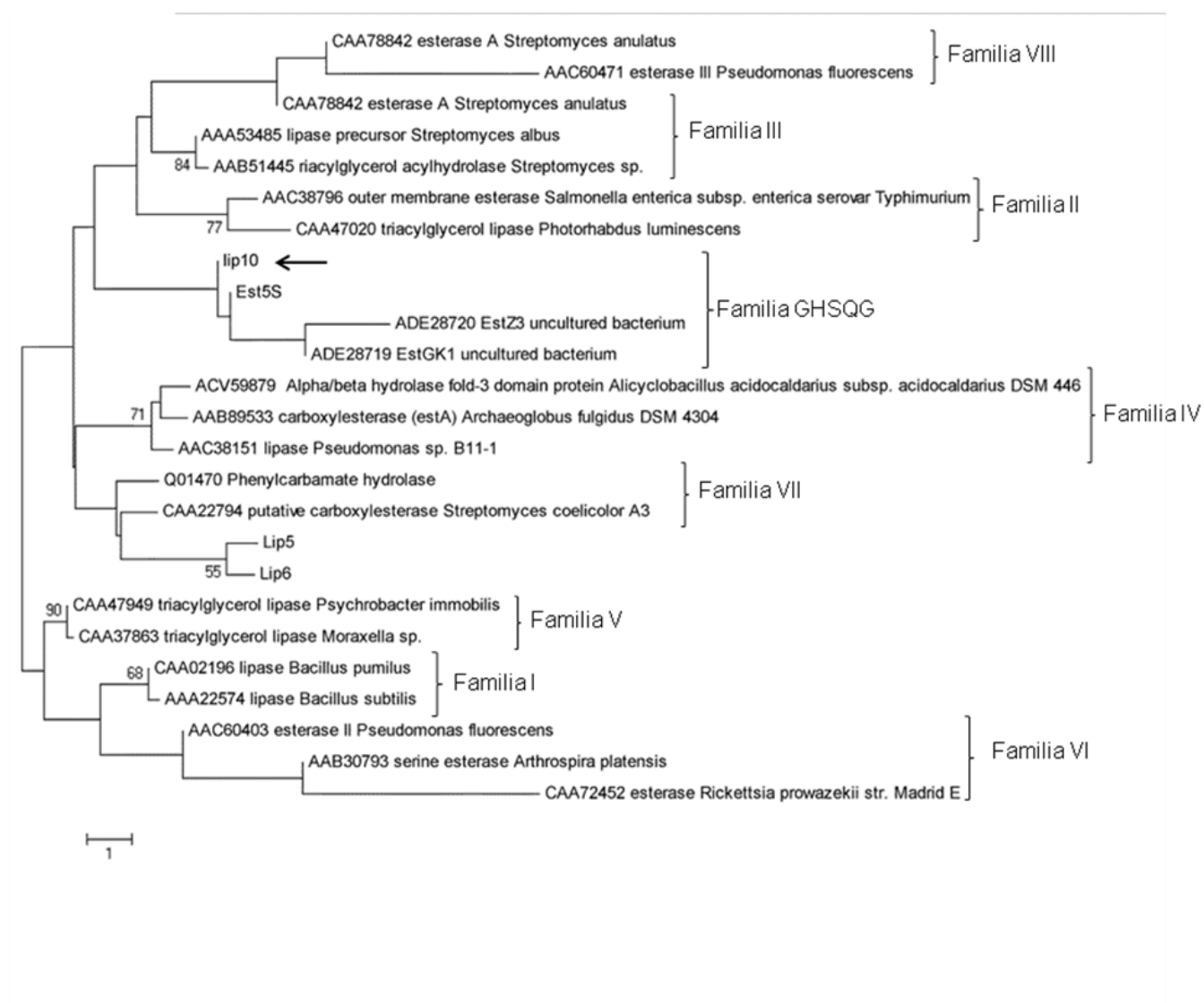


Figura 19a: Estudio de filogenia de Lip10, su homólogo más cercano EST5S, Lip 5 , Lip6 y representantes de todas las familias de enzimas lipolíticas. Las secuencias de las proteínas se obtuvieron a partir del banco de datos GenBank, basadas en su clasificación de lipasas en familias propuesta por Arpigny y Jaeger, y por Lee y colaboradores (113, 144). El árbol filogenético se construyó utilizando el algoritmo Neighbor Joining del programa Mega5.05. Con una flecha negra se indica la proteína Lip10. Se utilizó un bootstrap de 1000 réplicas.

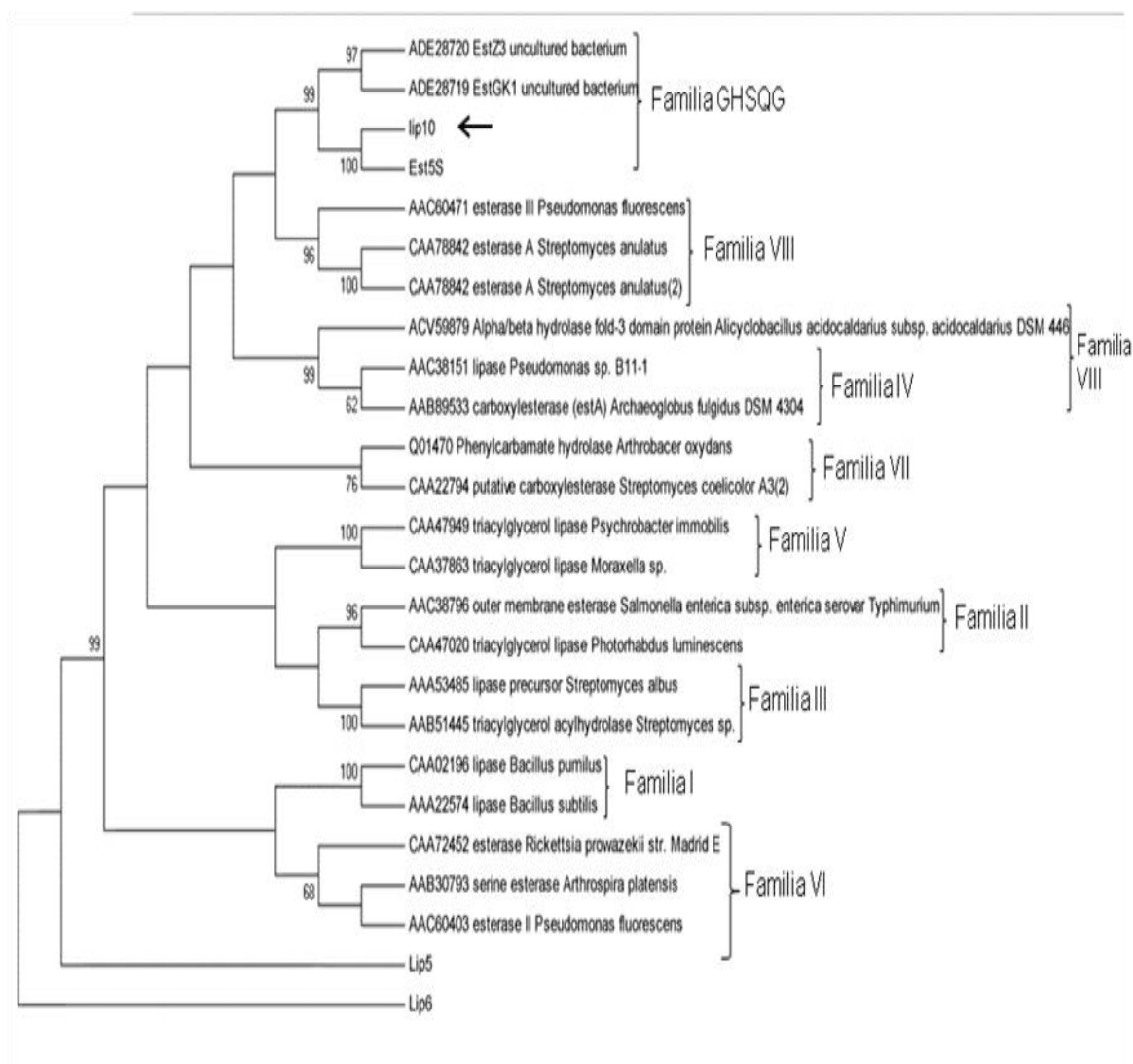


Figura 19b: Estudio de filogenia de Lip10, su homólogo más cercano EST5S, Lip 5, Lip6 y las representantes de todas las familias de enzimas lipolíticas. Las secuencias de las proteínas se obtuvieron a partir del banco de datos GenBank, basadas en su clasificación de lipasas en familias propuesta por Arpigny y Jaeger, y por Lee y colaboradores (113, 144). El árbol filogenético se construyó utilizando el algoritmo Maximun Parsmonia del programa Mega5.05. Con una flecha negra se la proteína indica Lip10. Se utilizó un bootsrap de 1000 réplicas.

Como se pudo observar en ambos estudios de filogenia Lip10 parecería no formar parte de las familias de enzimas lipolíticas existentes según la clasificación de Arpigny y Jaeger, y de Lee y colaboradores. Por otro lado, se puede observar que Lip10 se agrupa junto con la esterasa Est5S, EstGK1 y EstZ3 (Figura 19a y Figura 19b). No se

pudo asignar Lip 5 y Lip6 a algunas de las familias de enzimas lipolíticas descritas, por lo cual sería interesante continuar trabajando con dichos clones.

4.4.2 Predicción del péptido señal

Con el fin de estudiar si efectivamente los clones identificados, poseían una señal de translocación hacia el espacio extracelular, se realizó la predicción de péptido señal utilizando el programa SignalP4.0. De todos los clones estudiados, solamente se pudo predecir la presencia de un péptido señal en el clon Lip10 (Figura 20).

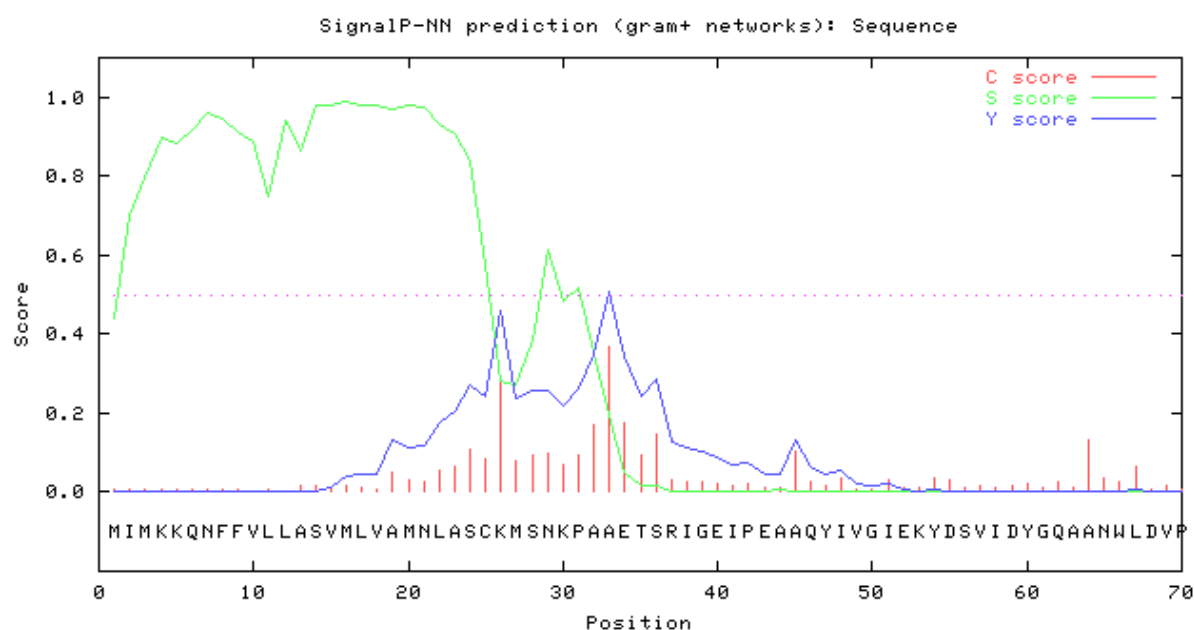


Figura 20: Resultados de la predicción del péptido señal de la proteína Lip10, utilizando el programa SignalP4.0.

A partir de la gráfica del SignalP4.0, se obtuvieron los valores C, S e Y. Así como también, se reportaron dos valores adicionales, denominados la media S y el valor D. El valor C corresponde al sitio de escisión de la peptidasa, el valor S indica si el aminoácido correspondiente es parte de un péptido señal y el valor Y, es una combinación del valor C y del valor S. A continuación se muestra una tabla con los valores de C, S, Y, media de S y el valor D (Tabla 5).

Tabla 5: Resultados de los parámetros obtenidos de la predicción del péptido señal para Lip10.

Medida	Posición	Valor
C máximo	33	0.457
Y máximo	33	0.538
S máximo	9	0.925
Media de S	1-32	0.779
D	1-32	0.632

Según los resultados observados para el caso de Lip10, el péptido señal estaría comprendido entre los primeros 20 aminoácidos. El programa también predijo el posible lugar de corte de la peptidasa, el cual fue entre los aminoácidos 33 y 34. Por lo cual sugeriría que Lip10 sería secretada hacia el espacio extracelular, lo cual coincide con la observación de un halo de hidrólisis alrededor de la colonia en placa.

4.5 Análisis filogenético de las secuencias seleccionadas

Como se observó anteriormente en la Tabla 3 y en la Figura 17, la proteína Lip10 presenta el pentapeptido conservado, formado por residuos GHSQG. Por otro lado, en base a estudios de homologías utilizando el programa blastp la secuencia de Lip10 se comparó con las secuencias conocidas depositadas en la base de datos "non-redundant database" del NCBI (6). Como se observa en la Tabla 2, el ORF traducido de Lip10 muestra mayor similitud con la secuencia de una esterasa denominada Est5S, la cual proviene de un organismo no cultivable. La esterasa Est5S también presentó el pentapéptido conservado formado por los residuos GHSQG. Sin embargo, los residuos que componen la típica tríada catalítica S-D/G-H, no se encontraron en ese orden. A partir de estos resultados Est5S se identificó como miembro de una nueva familia denominada familia GHSQG de enzimas esterolíticas (128). Lip10 también presentó

homología con esterasas de organismos cultivables como ser las de *Dehalococcoides ethenogenes*, *Acetobacterium woodii*, y *Eubacterium limosum* como se muestra en la Tabla 6.

Además, la proteína Lip10 junto con sus homólogos más cercanos se agrupan en la misma familia de proteínas DUF, la cual incluye enzimas de función desconocidas, posiblemente hidrolasas.

Tabla 6: Porcentajes de similitud de la secuencia de Lip10 con sus homólogos más cercanos

N° de Acceso	Descripción	Phylum	Porcentaje de similitud
ABI17943.1	Est5S	Desconocido	92%
AFQ23784.1	Esterasa	Desconocido	73%
AFQ23782.1	Esterasa	Desconocido	65%
AFQ23777.1	Esterasa	Desconocido	64%
YP_182096.1	Proteína hipotética DET1386	<i>Dehalococcoides ethenogenes</i>	41%
YP_005269460.1	Proteína hipotética Awo_c17910	<i>Acetobacterium woodii</i>	35%
AFQ23773.1	Esterasa	Desconocido	40%
AFQ23774.1	Esterasa	Desconocido	40%
ADE28720.1	EstZ3	Desconocido	41%
YP_003958445.1	Proteína hipotética /KIST612	<i>Eubacterium limosum</i>	39%
YP_005062358.1	Proteína hipotética	<i>Sphaerochaeta pleomorpha</i> str. <i>Grapes</i>	39%
ADE28719.1	EstGK1	Desconocido	39%

4.6 Sobreexpresión de la proteína recombinante Lip10

4.6.1 Construcción del plásmido recombinante pETlip10

A partir de una colonia de la cepa de *E.coli* DH5 α portando el gen Lip10 clonado en el vector pET14b, se realizó una extracción de ADN plasmídico. Esta preparación se utilizó para transformar células de *E.coli* BL21 (DE3) pLySs. Las colonias transformantes se seleccionaron en placas de LB Amp50 μ g/ml y Chl 25 μ g/ml. Se colectaron 20 clones transformantes y con el fin de seleccionar las colonias que tenían el inserto se realizaron digestiones con las enzimas BamHI y NdeI. Los perfiles de restricción se analizaron en un gel de agarosa 1% (Figura 21).

Como se observa en la Figura 21, los clones 5, 6, 7, 11, 13, 14 y 16 contienen un inserto del tamaño esperado. Se decidió continuar trabajando con tres de estos clones con el fin de observar diferencias en su expresión y seleccionar el de mayor expresión.

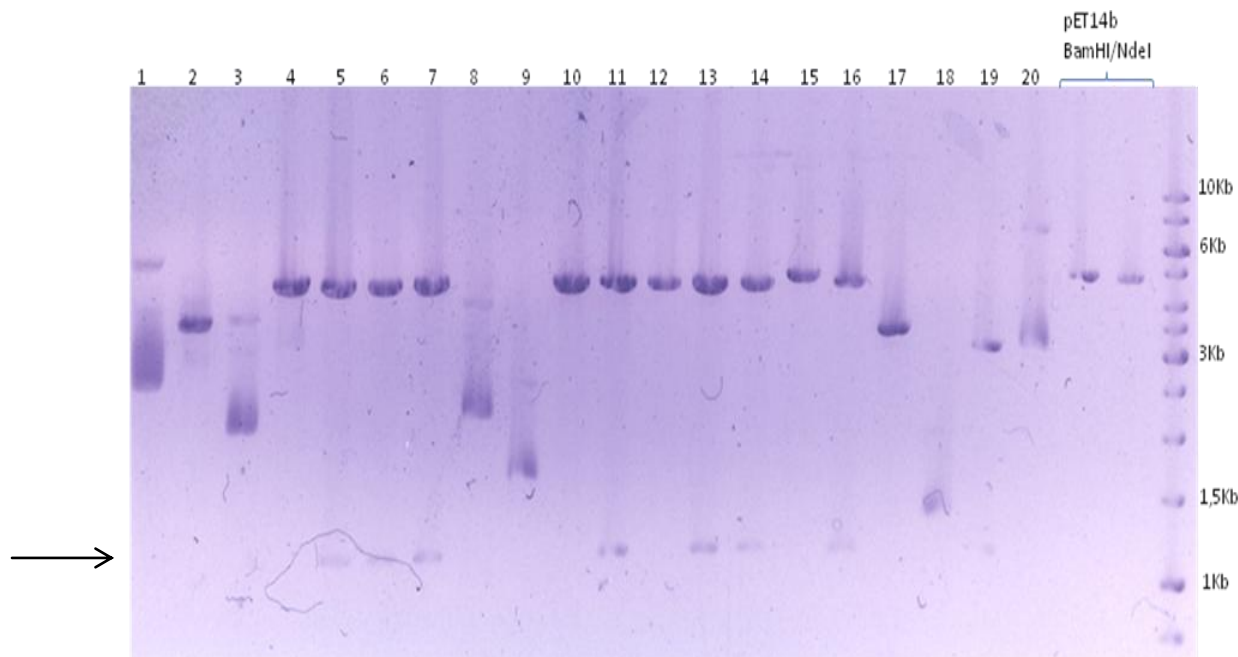


Figura 21: Gel agarosa 1% de los perfiles de restricción realizados con las enzimas NdeI y BamHI, de 20 clones transformantes. Con la flecha se indican los fragmentos de tamaños esperados.

4.6.2 Verificación de la expresión y actividad enzimática

Con el fin de verificar la expresión y actividad enzimática de los tres clones seleccionados en la cepa BL21 de *E.coli* (DE3) (pLysS), se realizaron ensayos en placas de tributirina-rodamina B con IPTA 0,5mM. Se trabajó a partir de cultivos durante toda la noche de los clones crecidos en medio LB líquido suplementado con los antibióticos correspondientes. La actividad lipolítica se detectó por la observación de un halo fluorescente de color anaranjado cuando la colonia se expuso a luz UV a 350nm, a las 16 horas de la inoculación. Se utilizó una concentración final de colorante rodamina B de 0,001%. Como control negativo se utilizó la misma cepa portando el plásmido sin inserto. Como se observa en la Figura 23, los tres clones utilizados (clones 5, 6 y 7) produjeron un halo de hidrólisis alrededor de la colonia, lo que demuestra que la enzima se expresa y tiene actividad en la cepa utilizada. En el caso del control negativo no se observó halo de hidrólisis (Figura 22).

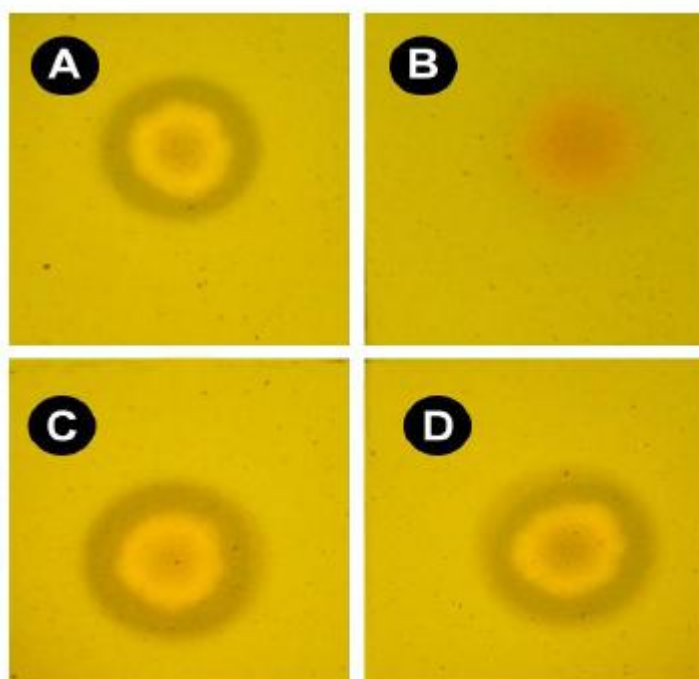


Figura 22: Placa de medio de selección para actividad lipolítica, utilizando tributirina-rodamina B. (A) clon 5 en la cepa BL21 de *E.coli* (DE3) (pLysS), (B) control negativo en la cepa BL21 de *E.coli* (DE3) (pLysS), (C) clon 6 en la cepa BL21 de *E.coli* (DE3) (pLysS) y (D) clon 7 en la cepa BL21 de *E.coli* (DE3) (pLysS)

4.6.3 Inducción de 6xHislip10 en la cepa BL21 de *E. coli*

4.6.3.1 Predicción de *hotspot* o puntos calientes de Lip10

Previo al estudio de la inducción de la expresión de la proteína 6xHisLip10, y con el fin de estudiar la presencia de la proteína en la fracción insoluble, se realizó la predicción de *hotspot* de Lip10.

Por medio de la utilización del programa Aggrescan se predijeron 16 *hotspot* o puntos calientes de agregación de la proteína Lip10 (Figura 23).

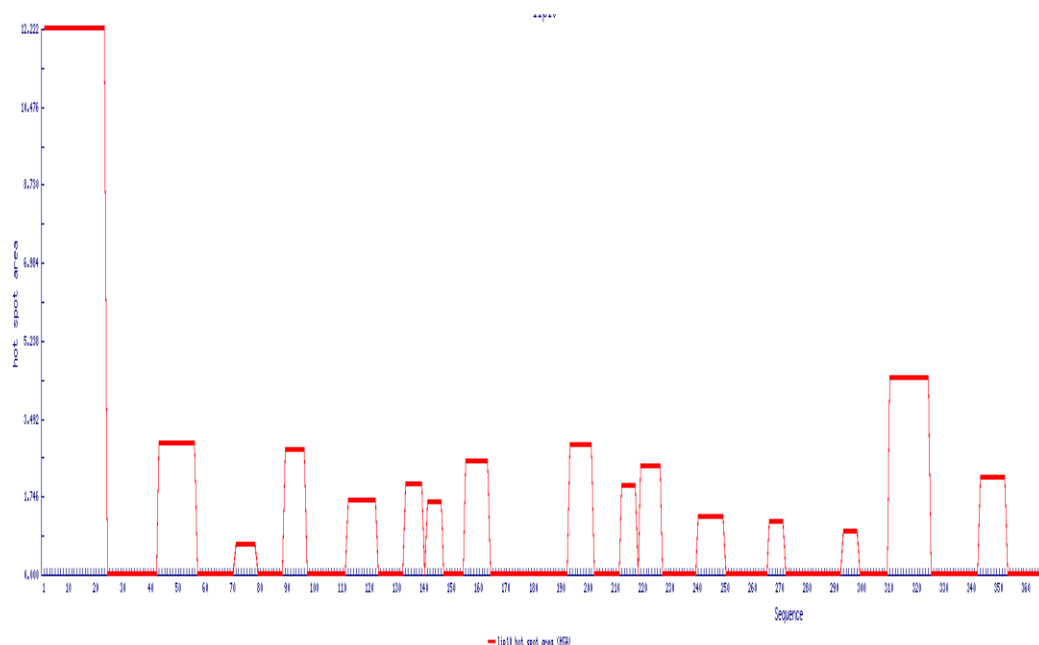


Figura 23: Área normalizada de los *hotspot* de la 6xHislip10. Las áreas bajo las curvas rojas representan las zonas de agregación a lo largo de la secuencia de la proteína. Se utilizó el programa Aggrescan (42).

La presencia de los *hotspot* sugirió que la proteína podría formar cuerpos de inclusión.

4.6.3.2 Estudio de la solubilidad de Lip10

Debido a que se detectó la presencia de hotspot o puntos calientes, los cuales indican regiones de la secuencia aminoacídica propensos a la agregación proteica, se decidió estudiar la solubilidad de Lip10. Con el fin de estudiar la presencia de la proteína en la fracción insoluble se realizó un gel SDS-PAGE. Como se muestra en la Figura 24, se observó una banda de tamaño esperado tanto en el extracto total (carril 5) previo a ser centrifugado, como en el extracto insoluble (carril 6). Estos resultados sugirieron que parte de la proteína quedó en la fracción insoluble, posiblemente como cuerpos de inclusión.

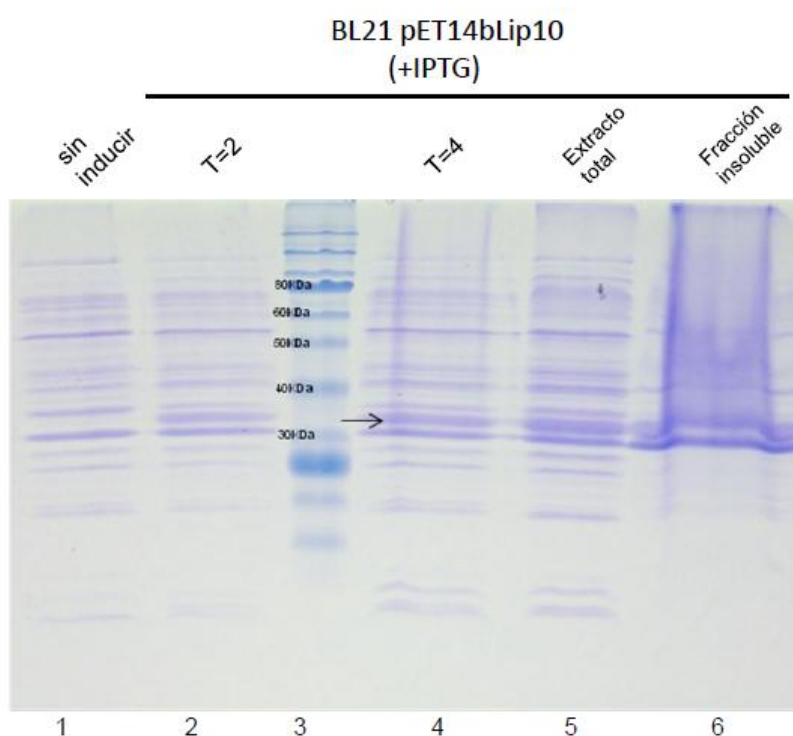


Figura 24: Estudio de la solubilidad de Lip10. Gel SDS-PAGE. De izquierda a derecha, carril 1 : proteínas totales de BL21 transformada con pET14bLip10 sin inducir ; carril 2 : proteínas totales de BL21 transformada con pETLip10 a tiempo de inducción 2 horas; carril 3: Marcador de proteínas Unstained Protein Molecular Weight Marker SM0431 (Fermentas) ; carril 4: proteínas totales de BL21 transformada con pETLip10 a tiempo de inducción 4 horas; carril 5: extracto total de BL21 transformado con pET14bLip10 a tiempo de inducción 4 horas sin centrifugar;

carril 6: fracción insoluble de BL21 de *E.coli* transformada con pET14bLip10. La flecha indica la banda de intensidad de peso molecular aproximado entre 35 y 40KDa. Se sembraron 20µl de cada muestra y de Marcador molecular de proteínas.

Con el fin de expresar la proteína recombinante 6xHislip10 se utilizaron dos condiciones. Una primera condición a 18°C durante 17 horas y una segunda condición a 30°C durante 4 horas. Se tomaron alícuotas de cada una de las condiciones que se analizaron por SDS-PAGE.

- a) Inducción de la expresión de BL21 de *E.coli* transformada con pETLip10 a 30°C durante 4 horas

En la Figura 25 se observa la expresión de Lip10 a los distintos tiempos, en comparación con el control del plásmido sin inserto. Se observa la aparición de una banda de significativa intensidad de peso molecular aproximado entre 35 y 40 KDa.

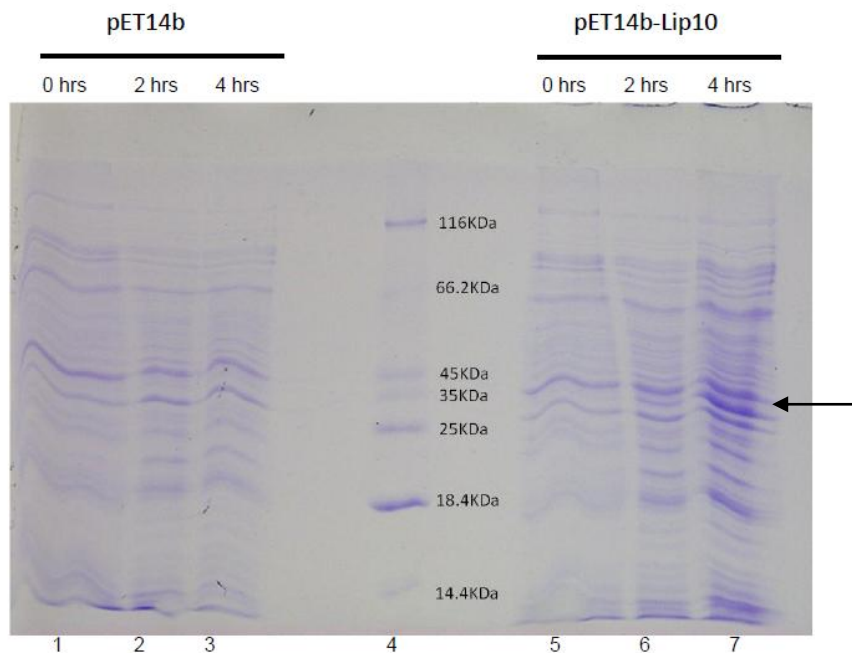


Figura 25: Gel SDS-PAGE de la inducción de la expresión de Lip10 a 30°C durante 4 horas. De izquierda a derecha, carriles 1, 2, y 3 ; proteínas totales de BL21 de *E.coli* transformada con pET14b sin inserto a los distintos tiempo de inducción (T=0, T=2 y T=4 horas), carril 4; Marcador de proteínas Unstained Protein Molecular Weight Marker (Thermo Scientific), carriles 5, 6 y 7; proteínas totales de BL21 de *E.coli* transformada con pETLip10 a los distintos tiempo de inducción (T=0, T=2 y T=4 horas) con IPTG 0.5mM. La flecha indica la banda de intensidad de peso molecular aproximado entre 35 y 40KDa. Se sembraron 20µl de cada muestra y de Marcador molecular de proteínas.

b) Inducción de la expresión de BL21 de *E.coli* transformada con pETLip10 a 18°C durante 17 horas.

En la Figura 26 se observa la expresión de 6xHisLip10 a los distintos tiempos, en este caso a tiempo 0 y a tiempo final. Se observa una banda significativa de peso molecular cercana a 35 KDa.

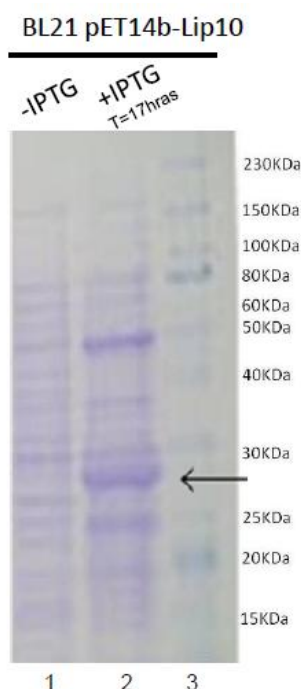


Figura 26: Gel SDS-PAGE de la inducción de la expresión de Lip10 a 18°C durante 17 horas. De izquierda a derecha, carril 1 ; pETLip10 sin inducir (tiempo 0), carril 2 ;pETLip10 luego de

las 17 horas de inducción con IPTG, carril 3 ; marcador de proteínas Prestained Protein Ladder P7710S (BioLabs). La flecha indica la banda de intensidad de peso molecular aproximado entre 35 y 40KDa.

En ambas condiciones se observó la banda del tamaño esperado. Sin embargo, en la condición en la cual se incubó a 18°C durante 17 horas, se observó una banda con mayor intensidad, lo que sugirió una mayor cantidad relativa de 6xHislip10. Debido a estos resultados se decidió trabajar utilizando las condiciones de inducción durante 17 horas a 18°C.

4.6.4 Purificación de la proteína recombinante Lip10

Se decidió estudiar su expresión tanto en el sobrenadante del medio de cultivo precipitado y dializado, como en el extracto soluble, luego de la inducción a 18°C durante 17 horas. En ambos casos, se utilizó una matriz de purificación utilizando 1ml de una suspensión al 50% de agarosa Ni-NTA (QIAGEN). Para ambos casos se utilizó la misma estrategia de purificación.

Para verificar la purificación de la proteína se sembraron alícuotas de los extractos totales y solubles de pETlip10, así como también una alícuota de la proteína purificada eluída con imidazol 250mM en un gel SDS-PAGE. En todos los casos se sembraron 10µl, excepto en el caso del marcador de proteínas que se sembraron 2.5µl. En la Figura 27, se observaron bandas del tamaño esperado tanto en el extracto total como en el extracto soluble, en comparación con el control negativo. Además, se observó una única banda del tamaño esperado luego de la purificación (carril 4). Estos resultados indicaron la expresión y purificación de la proteína de interés. Luego de la purificación se obtuvieron 0,174µg/ml de 6xHislip10.

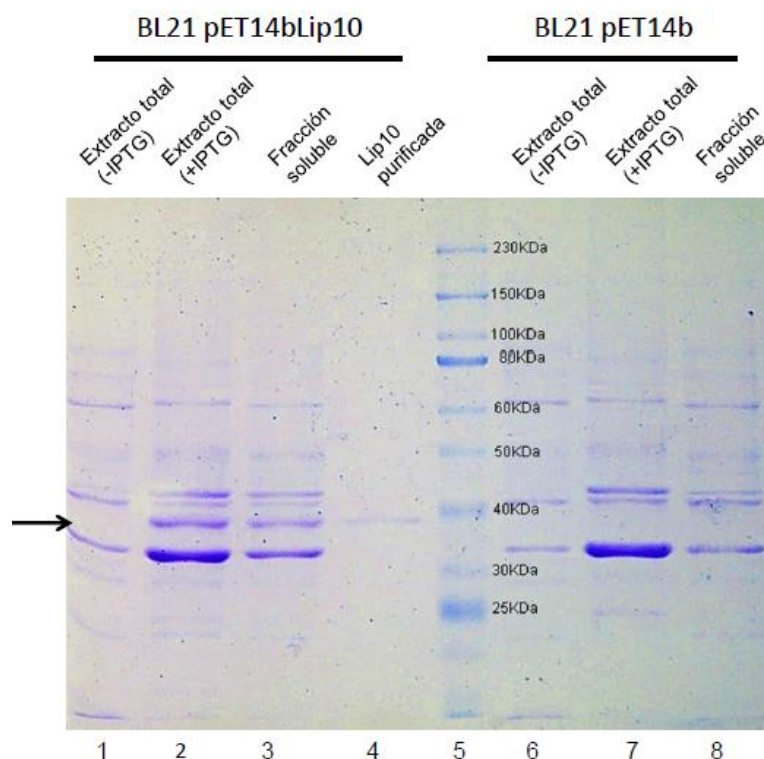


Figura 27: Gel SDS-PAGE de la purificación Lip10. De izquierda a derecha, carril 1 ; extracto total de BL21 de *E.coli* transformada con pET14bLip10 sin inducir, carril 2 ; extracto total de BL21 de *E.coli* transformada con pET14bLip10 inducido, carril 3; fracción soluble de BL21 de *E.coli* transformada con pET14bLip10 inducida, carril 4 ; Lip10 purificada de la fracción soluble de BL21 de *E.coli* transformada con pET14bLip10 inducido, carril 5 ; marcador de proteínas Prestained Protein Ladder P7710S (BioLabs), carril 6 ; BL21 de *E.coli* transformada con pET14b sin inserto, carril 7 ; extracto total de BL21 de *E.coli* transformada con pET14b sin inserto, carril 8 ; fracción soluble de BL21 de *E.coli* transformada con pET14b sin inserto. La flecha indica la banda de intensidad de peso molecular aproximado entre 35 y 40KDa.

4.7 Caracterización bioquímica de Lip10

4.7.1 Ensayo de actividad de Lip10 con diferentes sustratos

La especificidad de sustrato fue testeada utilizando derivados de p-nitrofenoles tales como p-nitrofenil acetato (C2), p-nitrofenil butirato (C4), p-nitrofenil decanoato (C10) y p-nitrofenil palmitato (C16). La enzima Lip10 fue capaz de hidrolizar p-nitrofenil acetato (C2), p-nitrofenil butirato (C4) y p-nitrofenil decanoato (C10). No se detectó actividad frente a p-nitrofenil palmitato (C16). La mayor actividad se detectó al utilizar como sustrato p-nitrofenil butirato (C4) (Figura 28). También, se realizaron ensayos de actividad utilizando como sustratos TAG. La enzima Lip10 también fue capaz de hidrolizar la tributirina (C4). Sin embargo, no fue capaz de hidrolizar trioleína (C18), ni tricaprilina (C8).

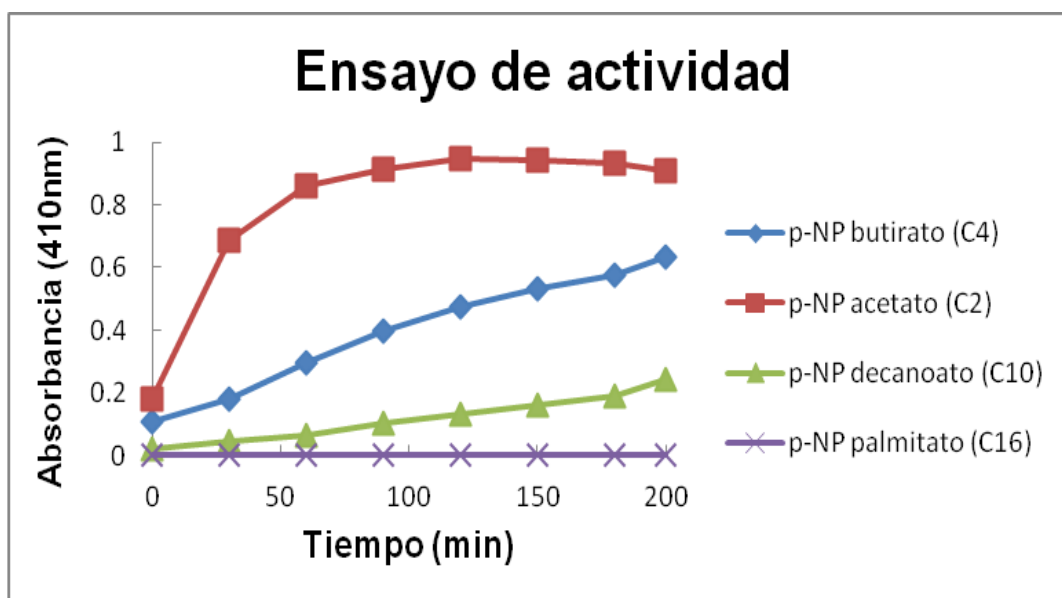


Figura 28: Actividad de Lip10 frente a diferentes sustratos.

Las reacciones se llevaron a cabo en 100mM de tampón HEPES pH 8.0, 0.3% Tritón 100X, 10nM de Lip10. Como sustrato se utilizaron: pNP acetato (C2), pNP butirato (C4), pNP decanoato (C10) y pNP palmitato (C16) durante 200 min a 40°C.

4.7.2 Efecto del pH sobre la actividad de Lip10

El pH óptimo de actividad se determinó utilizando tampones en un rango de pH entre 5.5 y 9.0. En la Figura 29 se muestran las curvas resultantes luego de graficar los promedios de las absorbancias al liberarse el p-nitrofenol al utilizar tampones a distintos pH. La enzima Lip10 presentó mayor actividad en un rango de pH entre 8.0 y 8.5.

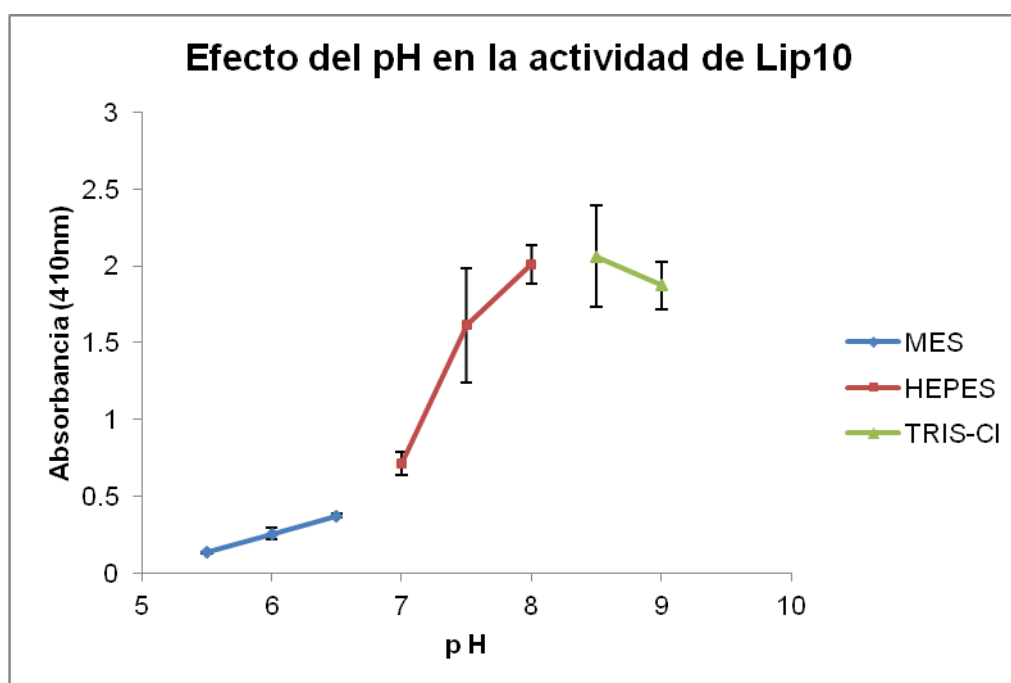


Figura 29: Determinación del pH óptimo de Lip10. Las reacciones se realizaron en 100mM de cada tampón, 0.3%Tritón 100X, 50nM de Lip10, pNP butirato (C4) como sustrato, durante 15 min a 40°C. Las reacciones fueron realizadas por triplicado. Las barras de error corresponden a triplicados de ensayo en la misma placa

4.7.3 Efecto de la temperatura sobre la actividad de lip10

El efecto de la temperatura en la actividad enzimática de Lip10, se estudió en un rango de temperatura entre 20°C y 70°C. La enzima Lip10 presentó una mayor actividad entre 35°C y 40°C (Figura 30).

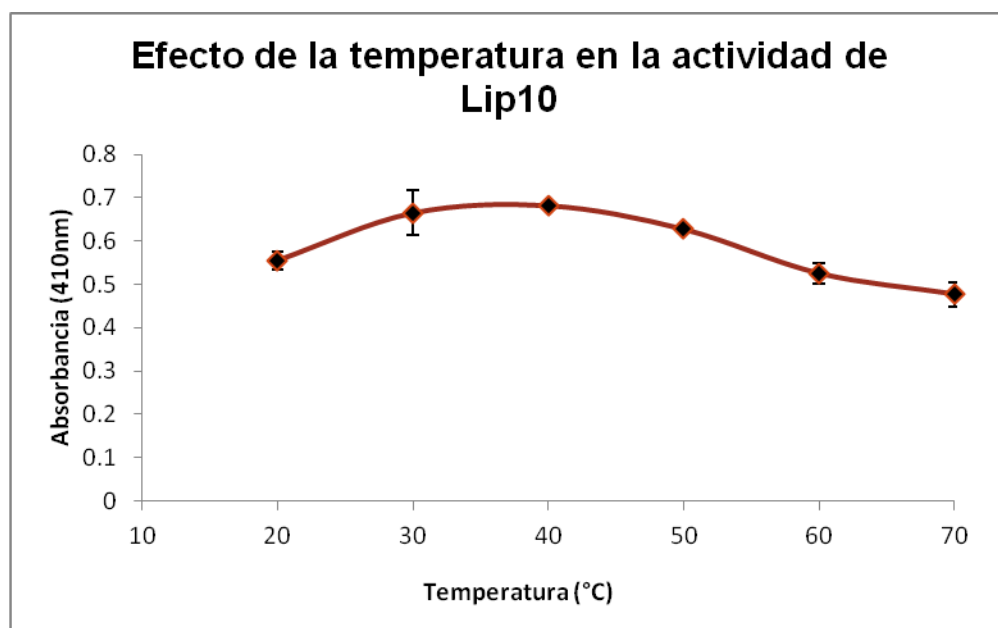


Figura 30: Determinación de temperatura óptima de Lip10. Las reacciones se realizaron en 100mM de tampón HEPES pH 7.0, 0.3% Tritón 100X, 50nM de Lip10 y como sustrato pNP butirato (C4) durante 15 min. Las reacciones fueron realizadas por triplicado en la misma placa.

4.7.4 Determinación de parámetros cinéticos

Con el fin de determinar los parámetros cinéticos de la proteína purificada Lip10, se utilizó el modelo cinético descrito por Michaelis y Menten (118). Se estudió la cinética enzimática de la reacción utilizando concentraciones crecientes de sustrato de 0.1mM a 2.0mM. Como sustrato se utilizó el pNP butirato (C4).

Como resultado de la representación gráfica de la ecuación de Michaelis-Menten (V_0 versus $[S]_0$), se obtuvo la curva que se muestra en la Figura 31.

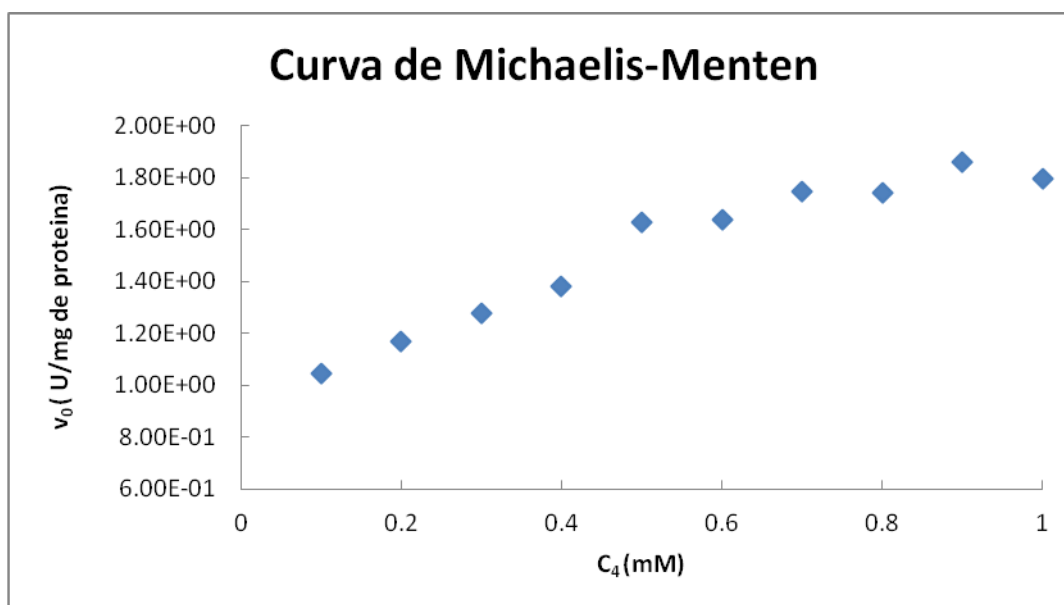


Figura 31: Curva de Michaelis-Menten de la proteína purificada Lip10. Las reacciones se llevaron a cabo en 100mM de tampón HEPES pH 8.0, 0.3%Tritón 100X, 50nM de 6xHisLip10. Como sustrato se utilizó concentraciones de pNP butirato (C_4) de 0.1mM a 1.0mM. Las reacciones se monitorearon durante 30 min a 40°C, con intervalos de medición cada 2 min.

En el modelo de Michaelis-Menten, la $V_{m\acute{a}x}$ corresponde al valor máximo al que tiende la curva experimental y K_m corresponde a la concentración de sustrato a la cual la velocidad inicial de la reacción es la mitad de la $V_{m\acute{a}x}$. También permite obtener el valor de la constante de afinidad K_{cat}/K_m , donde la K_{cat} se define como la constante de catálisis o como el número de recambio de la enzima. La constante de catálisis se define como el número de ciclos catalíticos que la enzima puede realizar por unidad de tiempo y se calcula como $V_{m\acute{a}x}/(\text{enzima})$ total.

Para determinar gráficamente los valores de K_m y $V_{m\acute{a}x}$ se utilizó la representación de la doble recíproca o representación de Lineweaver-Burk ($1/v_0$ versus $1/[S]_0$), la cual es una línea recta, y facilita la obtención numérica de los parámetros cinéticos (Figura 32).

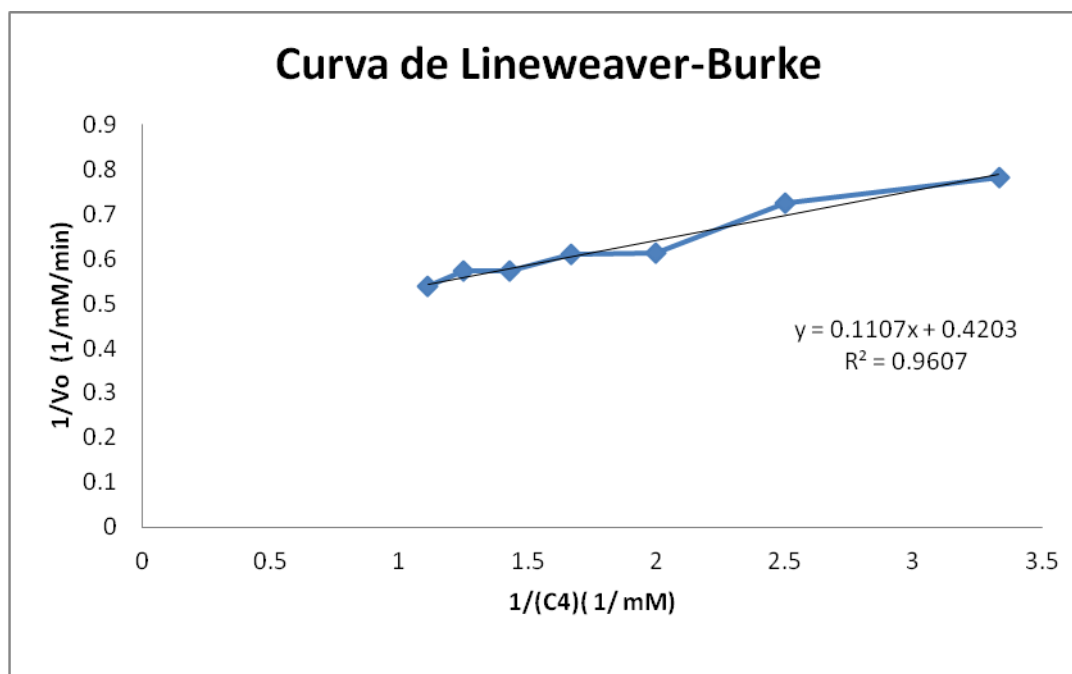


Figura 32: Curva de Lineweaver-Burk de la proteína purificada Lip10.

A partir de la curva de Lineweaver-Burk fue posible obtener los parámetros K_m y $V_{m\acute{a}x}$. En esta recta la pendiente corresponde a $K_m/V_{m\acute{a}x}$, la abscisa en el origen (cuando $1/V_o$ es 0) es $-1/K_m$ y la ordenada en el origen ($1/[S]_0$ es 0) es $1/V_{m\acute{a}x}$.

A partir de la pendiente de la curva de Linearweaver-Burke se obtuvo el valor de K_m , el cual resultó ser de 0.23 mM y la $V_{m\acute{a}x}$ de 2.37 U/mg de proteína. El valor de $V_{m\acute{a}x}$ se expresó en U/mg de proteína, con el fin de poder comparar los valores de Lip10 con los valores de otras esterasas descritas. La K_{cat} resultó ser de 13,67 s⁻¹ y la relación K_{cat}/K_m 59,43 s⁻¹ mM⁻¹.

Con el fin de validar los resultados de los parámetros cinéticos obtenidos, de forma complementaria también se obtuvieron los mismos parámetros cinéticos a partir de la curva de Eadie-Hofstee (Figura 33).

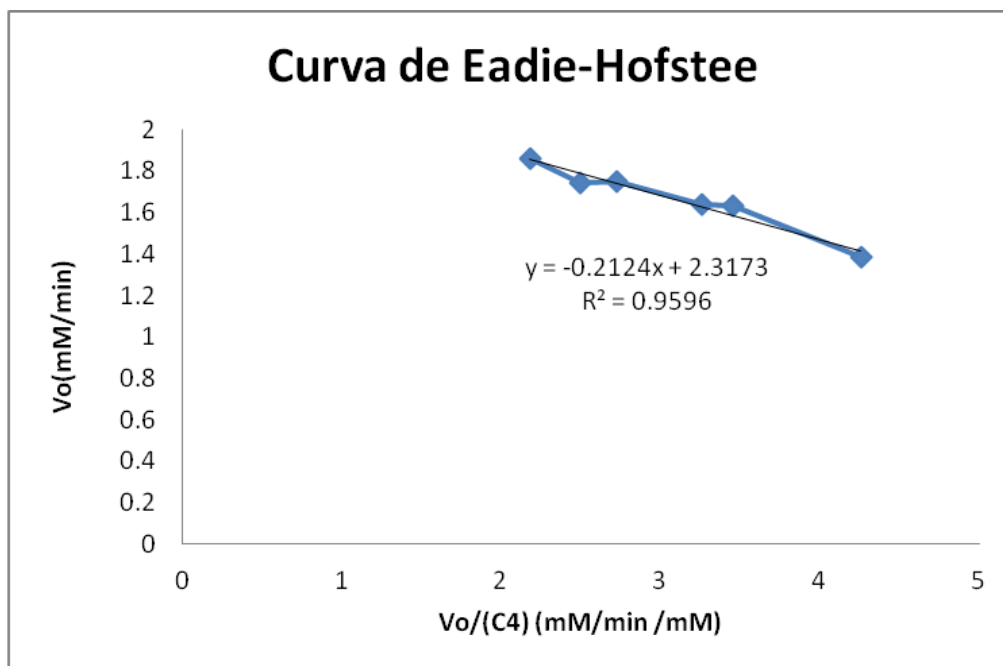


Figura 33: Curva de Eadie-Hofstee de la proteína purificada Lip10.

La representación de esta curva en comparación con la curva de Lineweaver-Burk presenta la ventaja de no acarrear el error intrínseco de la doble recíproca y permite observar en la curva rápidamente los parámetros cinéticos. La pendiente de la curva de Eadie-Hofstee corresponde a K_m y la ordenada en el origen es $V_{m\acute{a}x}$.

Los valores obtenidos de K_m , $V_{m\acute{a}x}$, K_{cat} y de la constante de afinidad para el pNP butirato (C4), a partir de la curva de Eadie-Hofstee fueron K_m 0.21mM, $V_{m\acute{a}x}$ de 2.32 U/mg de proteína, K_{cat} 13.27 s^{-1} y la relación K_{cat}/K_m 63,19 $s^{-1} mM^{-1}$. Los valores de los parámetros cinéticos obtenidos a partir de ambas curvas fueron muy similares, lo cual valida la metodología utilizada.

A continuación se muestra una tabla con los valores de temperatura óptima y pH óptimo de Lip10 y de algunos de sus homólogos más cercanos, así como también de los parámetros cinéticos.

Tabla 7: Algunas propiedades y parámetros cinéticos (K_m , $V_{m\acute{a}x}$ y K_{cat}/K_m) de Lip10 , sus homólogos más cercanos y otras esterasas reportadas.

Enzima	Sust.	pH óptimo	T óptima (°C)	K _m (mM)	V _{máx} (U/mg de proteína)	K _{cat} (s ⁻¹)	K _{cat} /K _m (s ⁻¹ mM ⁻¹)
Lip10	p-NP butirato (C4)	8.0-8.5	35-40	0,22	2,37	13,47	59,43
Est5S	p-NP butirato (C4)	7.0	40	No reportada	No reportada	No reportada	No reportada
EstGK1	p-NP butirato (C4)	7.0	30	0,90	577	356	385
EstZ3	p-NP butirato (C4)	7.0	30	0,70	548	347	531

Como se observa en la Tabla 7, Lip10 presentó un rango de pH óptimo más alcalino con respecto a sus homólogos más cercanos. El rango de temperatura óptima de Lip10 resultó ser similar a los valores reportados para dichas esterasas. El valor de K_m de Lip10 resultó estar dentro del rango de valores reportados. Lip10 presentó un valor de K_m menor que el de las esterasas EstGK1 y de EstZ3, al utilizar el pNP butirato (C4), lo que indicó una mayor afinidad por dicho sustrato. Así mismo, Se observó un valor de $V_{m\acute{a}x}$, de K_{cat} y de la relación K_{cat}/K_m muy inferior a los reportados para EstGK1 y de EstZ3. Esto indicaría que la eficiencia catalítica de Lip10 para convertir producto es menor que las reportadas para EstGK1 y EstZ3.

DISCUSION Y **CONCLUSIONES**

- 5.1 Estrategia experimental
utilizada para la
construcción de la biblioteca
metagenómica
- 5.2 Detección funcional para
actividad lipolítica
- 5.3 Enzimas encontradas
- 5.4 Caracterización filogenética
de Lip10
- 5.5 Caracterización bioquímica
de Lip10

5. Discusión y conclusiones

5.1 Estrategia experimental utilizada para la construcción de la biblioteca metagenómica

A partir del procesamiento de la muestra de rumen, se obtuvieron tres fracciones Lq, Ad y As. En base a estudios de microscopía de los tres percolados se decidió trabajar con la fracción Lq (fracción libre no asociada a las fibras) (Figura 11, panel B). Esta fracción contenía una menor contaminación de microorganismos aparentemente procariotas en comparación con las otras fracciones, lo cual concuerda con datos reportados (30).

La purificación del ADN genómico extraído de la fracción Lq, se realizó utilizando dos metodologías. Una basada en una extracción de ADN convencional o lisis química y otra en la que además de la lisis química se utilizó una lisis mecánica con esferas de zirconia. La segunda metodología resultó más adecuada. Estos resultados nos permitieron la selección de fragmentos del entorno de 40 Kb para la construcción de la biblioteca metagenómica. Como vector de clonado se utilizó el vector pCC1FOS. Este vector cuenta con un origen de replicación inducible por arabinosa, lo cual resultó ser beneficioso, debido a que en presencia de arabinosa, se incrementa el número de copias del fósido, lo que provoca un aumento en la expresión de los genes clonados y facilita la identificación del fenotipo buscado.

5.2 Detección funcional para actividad lipolítica

Con el fin de identificar clones con actividad lipolítica, se decidió utilizar el enfoque de metagenómica funcional. La búsqueda funcional en contraste con la búsqueda por homología de secuencias, permite seleccionar enzimas en base a su actividad lo cual ha permitido la identificación de una gran cantidad de genes que codifican nuevas proteínas, las cuales presentan baja similitud con las proteínas conocidas, y por lo tanto presentan nuevas características estructurales y propiedades (64, 68, 71, 76, 102,

106). Por lo tanto, esta estrategia no solo provee nuevas enzimas para nuevas aplicaciones biotecnológicas, sino también permite asignar funciones a proteínas designadas como hipotéticas o con funciones desconocidas (194). Con el fin detectar actividad lipolítica (lipasa y/o esterasa), se realizó la detección funcional de una biblioteca metagenómica de rumen vacuno utilizando tributirina (C4), tricaprilina (C8) y trioleína (C16) como sustratos. Se detectaron 8 clones con actividad en tributirina. No se detectó ningún clon con actividad en tricaprilina ni en trioleína. Estos resultados sugirieron que los clones tenían actividad esterasa y no actividad lipasa. Esto fue debido a que los clones hidrolizaron ésteres de glicerol con ácido grasos de cadena corta como la tributirina (C4) y no hidrolizaron ésteres de glicerol con ácidos grasos de cadena larga (trioleína) (C16). Además, se observó que incluso en comparación entre ésteres de glicerol fue capaz de hidrolizar ésteres de glicerol con ácido grasos de cadena corta como la tributirina.

En un trabajo realizado, en el cual se pretendía identificar clones con actividad lipasa, se realizó una aproximación basada en la detección funcional de una biblioteca utilizando como sustrato tributirina, y luego con el fin de estudiar si algunos de los clones que mostraron actividad tenían actividad de lipasa verdadera, se ensayaron en placas de agar trioleína y en placas de agar trioleína-rodamina B (68, 132). Dos clones presentaron actividad en trioleína, pero solo uno de ellos mostró actividad en trioleína-rodamina. El gen responsable de esta actividad se identificó como una lipasa. Estos resultados sugieren que la utilización del colorante junto con el sustrato parecería ser una técnica más precisa y de mayor sensibilidad.

La tributirina es el sustrato más utilizado en la detección funcional para actividad lipolítica (debido a que las enzimas lipolíticas son capaces de hidrolizar esteres de glicerol de distintos largo de cadena). La tributirina se dispersa rápidamente en agua por lo cual, en presencia de productores de baja actividad lipolítica, su utilización podría ser confusa y dar falsos positivos (202). Debido a ello, es que los clones que muestran actividad en tributirina, deben ser ensayados en otros sustratos para indicar si tienen actividad lipasa o esterasa.

Estos resultado sugieren que la utilización de la trioleína-rodamina B en una detección funcional, donde se pretende detectar enzimas con actividad lipasas, presenta la ventaja que es una técnica más rápida y más precisa en comparación a la utilización de tributirina como sustrato, o en comparación con trioleína sin el colorante.

Se han publicado varios trabajos en los cuales se han identificado enzimas lipolíticas utilizando la aproximación de metagenómica funcional. En uno de estos estudios se obtuvieron ocho clones con actividad lipolítica a partir de una biblioteca metagenómica de suelo, de tamaño promedio de inserto de 35Kb y con un total de 33.700 clones, lo cual arroja la detección de 1 clon cada 147 Mb de ADN estudiado o 1 clon positivo cada 4213 clones analizados (145). En otro trabajo, se obtuvieron 6 clones, a partir de una biblioteca metagenómica de planicies de mareas, de un tamaño de inserto de 35Kb, en un total de 386.000 clones. Lo cual significó la detección de 1 clon cada 2.25Gb de ADN estudiado o 1 clon cada 64.333 clones analizados (144).

En este proyecto de maestría, a partir de la detección funcional utilizada para la detección de actividad lipolítica en rumen vacuno, un total de 12 clones positivos fueron identificados con un tamaño de inserto entre 35 y 40 Kb, en un total de 27.500 clones analizados. Esto corresponde a aproximadamente 1.2Gb, por lo cual fue detectado 1 clon positivo cada 87.5Mb de ADN analizado o 1 clon positivo cada 2500 clones. A partir de estos resultados, se puede observar que la estrategia de detección utilizada fue la adecuada, ya que se obtuvo un número mayor de clones con actividad lipolítica por Mb de ADN analizado. Sin embargo, se han reportado una gran cantidad de trabajos en los cuales se han detectado una mayor cantidad de clones con actividad lipolítica por cada Mb de ADN analizado, a partir de otros ambientes como ser de muestras de suelo, lo cual indicaría que podría ser una mejor fuente de estudio para detectar dicha actividad (224). Por ejemplo en un trabajo se identificaron enzimas lipolíticas a partir de bibliotecas metagenómicas de suelo de fango, utilizando la estrategia funcional se obtuvieron 1 clon positivo cada 42 Mb (129).

5.3 Enzimas encontradas

Para cada uno de los clones identificados se realizó una búsqueda de similitud en el banco de datos de secuencias conocidas del NCBI. A partir de los estudios de homología, el clon Lip10 resultó ser el más interesante en comparación con los clones Lip5 y lip6. Lip10 presentó una alta similitud (92%) con una esterasa denominada Est5S y en menor grado con dos esterasas denominadas EstGK1, EstZ3 (13, 128). La esterasa Est5S proviene de un organismo no cultivable de rumen vacuno. Los resultados del blastp de Est5S con la base de datos del NCBI, no revelaron una alta homología con las familias de esterasas y lipasas descritas. Por otro lado, Est5S es miembro de la familia DUF3089 (pfam 11288). La familia DUF3089, está descrita como una familia de proteínas de función desconocida. Sin embargo, parecería tener un dominio α/β hidrolasa, el cual tendría asociado una función enzimática. Además, la familia DUF 3089 es miembro del clan AB hidrolasas (CL0028), el cual está formado por 66 miembros. Por otro lado, Est5S presentó el pentapéptido conservado GHSQG presente en la mayoría de hidrolasas, lipasas, esterasas, serin proteasas, y β -lactamasas de origen bacteriano. Sin embargo, la tríada catalítica S-D/E-H, la cual está altamente conservada en la mayoría de las familias de enzimas lipolíticas, no estaba presente. Además, con el fin de confirmar el rol catalítico, se realizaron estudios de mutagénesis dirigida de todos los residuos candidatos presentes en la secuencia. Los resultados sugirieron que los residuos catalíticos se encontraban en las posiciones D166-S190-H341. A partir de estos resultados, los autores postularon a Est5S como miembro de una nueva familia de enzimas esterolíticas, denominada familia GHSQG (128).

Lip10, también presentó homología con dos esterasas denominadas EstGK1 y EstZ3, las cuales se identificaron a partir de una biblioteca metagenómica de rumen de oveja (13). Ambas esterasas mostraron una alta homología con la esterasa Est5S y en menor grado con otras proteínas no descritas como enzimas lipolíticas. En dicho trabajo, los autores realizaron estudios de filogenia utilizando miembros de cada una de las familias de enzimas lipolíticas descritas por Arpigny y Jaeger, y Lee y colaboradores, que incluyeron a EstZ3, EstGK1, Est5S y a los 13 homólogos más cercanos. Los resultados

filogenéticos no permitieron agrupar a EstZ3, EstGK1, Est5S y a los homólogos más cercanos en las familias de enzimas lipolíticas descritas. Por otro lado, los estudios de alineamientos realizados en esas proteínas, revelaron las posiciones de los residuos que forman la tríada catalítica en el orden Ser-His-Asp. La esterasa EstGK1, presentó la serina catalítica formando parte de pentapéptido formado por los residuos GHSQG y EstGK1 presentó una variación del pentapéptido conservado en las familias de enzimas lipolíticas formado por SHSQG. Con el fin de confirmar el rol catalítico de los residuos se realizaron mutagénesis puntuales en los residuos conservados. Los resultados mostraron, que los residuos catalíticos se encontraban en las posiciones S134-H293-D296. En base a estos resultados, los autores postularon a EstZ3 y a EsGK1 como miembros de una nueva familia de enzimas lipolíticas (13).

También, resultó interesante el hecho de que las esterasas EstGK1, EstZ3, y Est5S fueron postuladas como miembro de una nueva familia de enzimas lipolíticas denominadas familia GHSQG, y que presentaron distintas tríadas catalíticas alteradas. Esto podría significar que dentro de una misma familia, el orden de los aminoácidos que componen la triada catalítica podría alterarse y no afectar la función.

5.3.1 Sobreexpresión de la proteína recombinante Lip10

Con el fin de estudiar la localización extra o intracelular de Lip10 se realizó la predicción de hotspot y de péptido señal. El análisis de la secuencia reveló la presencia de 16 hotspot y se identificó un péptido señal entre los primeros 20 aminoácidos. Estos resultados sugieren que la proteína tendría una señal de translocación hacia el espacio extracelular y sería secretada, y que además tendría una alta probabilidad de formar cuerpos de inclusión o agregados proteicos insolubles. Estos podrían haberse formado debido a la insolubilidad de la proteína a las concentraciones a la cual está siendo producida, por un incorrecto plegamiento en el ambiente en el cual se encuentra o por la inhabilidad de formar puentes disulfuro. La solubilización de la proteína se puede realizar mediante la utilización de agentes desnaturizantes como el hidrocloreto de guanidina o la urea y tioles, como el mercaptoetanol o el glutatión (245).

Se realizaron ensayos de inducción de la expresión de Lip10 a distintos tiempos y temperaturas de inducción. Se observó una mayor cantidad relativa de proteína a bajas temperaturas durante mayores tiempos de inducción. Esto pudo deberse, a que al bajar la temperatura, se reduce la tasa de traducción de proteínas, y en algunos casos puede reducir las respuestas metabólicas indeseables para la síntesis de otras proteínas, y como consecuencia mejorar el rendimiento y/o la solubilidad de la proteína de interés (140) .

Se realizaron purificaciones de la proteína recombinante inducida a baja temperatura, tanto en el sobrenadante del cultivo, como en el extracto celular. No se detectó actividad lipolítica en el sobrenadante de cultivo, incluso luego de la precipitación de las proteínas con NH_4SO_4 al 80%. Lo cual no concuerda con el hecho de haber observado la presencia de péptido señal. Estos resultados sugirieron que la proteína pudo haber quedado retenida en el citoplasma o en el periplasma, por lo cual no fue exportada hacia el espacio extracelular. Lo cual pudo deberse al incorrecto reconocimiento del péptido señal por parte del huésped utilizado, ya que el péptido señal, pudo provenir de un microorganismo no emparentado, lo cual dificulta el mecanismo de reconocimiento y secreción. Con el fin de superar ésta dificultad en el estudio de la expresión de la proteína, se podría utilizar un vector de expresión para proteínas de *E. coli*, el cual contenga un péptido señal para *E.coli*, lo cual mejoraría el procesamiento de la proteína, al reconocerla como propia.

Se observó inducción de la expresión de la proteína Lip10 tanto en la fracción soluble como en la fracción insoluble, lo cual concuerda con la predicción de *hotspot* en dicha fracción. Se realizaron ensayos de actividad en la fracción soluble. Se obtuvo una expresión de la proteína recombinante baja. Sin embargo, debido a que la cantidad de enzima obtenida en esta fracción fue suficiente para realizar los ensayos de actividad, no se trabajó con la fracción insoluble. En estos casos donde la expresión de la proteína recombinante es baja, la misma puede ser obtenida como proteína de fusión. Una gran variedad de polipéptidos han sido empleados para la obtención de proteínas recombinantes, tales como la proteína A, glutatión S transferasa (GST), proteína de unión a maltosa, así como péptidos que pueden ser reconocidos por anticuerpos

específicos, biotinilados en la células huésped o unirse específicamente a metales inmovilizados (94, 196).

5.4 Caracterización filogenética de Lip10

Se realizaron estudios de filogenia, utilizando varios representantes de cada una de las familias de proteínas lipolíticas según la clasificación de Arpigny y Jaeger, así como también a las esterasas Est5S, EstGK1 y EstZ3, ya que presentaron alta homología con Lip10. No se logró agrupar a Lip10 dentro de las familias conocidas de enzimas lipolíticas. Además, Lip10 junto con Est5S, EstGK1 y EstZ3, formarían parte de un mismo agrupamiento (Figura 19a y Figura 19b). Según la clasificación de Arpigny y Jaeger, Lip10 al no presentar similitud con las familias ya existentes podría ser miembro junto con Est5S, EstGK1 y EstZ3 de una nueva familia de enzimas lipolíticas (8).

Lip10 presentó 12 residuos de aspartato conservados, dos residuos de histidina y uno de serina. Estos últimos dos formando parte del pentapéptido conservado GHSQG. Los estudios de mutagénesis realizados en la esterasa Est5S, revelaron las posiciones de los residuos catalíticos de aspartato, histidina y serina. Debido a la alta homología de Lip10 con Est5S, se sugiere que Lip10 podría tener los mismos residuos catalíticos, y junto con las esterasas EstZ3 y EstGK1, formar parte de una nueva familia de proteínas (13, 128). Sin embargo, con el fin de confirmarlos se propone realizar mutagénesis sobre todos los residuos de aspartato, el de serina, y los dos de histidina. Además, teniendo en cuenta que Lip10 junto con Est5S, EstGK1 y EstZ3 podrían ser miembros de una nueva familia de proteínas, denominada familia GHSQG, y que en ninguno de los trabajos realizados por dichos autores se estudió el rol catalítico de la histidina que forma parte del pentapéptido, resultaría interesante estudiar el posible rol catalítico del residuo de histidina (H188) en Lip10.

5.5 Caracterización bioquímica de Lip10

Con el fin de caracterizar a Lip10 bioquímicamente se realizaron ensayos de actividad de sustrato frente a derivados de p-nitrofenoles y frente a TAG. La enzima Lip10 fue

capaz de hidrolizar p-nitrofenil acetato (C2), p-nitrofenil butirato (C4), p-nitrofenil decanoato (C10). Sin embargo, no se observó actividad al utilizarse p-nitrofenil palmitato (C16). Estos resultados sugieren que Lip10 hidroliza p-nitrofenoles de cadena ≤ 10 átomos de carbono, específicamente presentó una mayor actividad al utilizarse por p-nitrofenil butirato (C4) como sustrato entre los 30 y 200 minutos de reacción. Sin embargo, con el fin de asegurar que presenta una mayor actividad con dicho sustrato tendría que realizarse el ensayo en condiciones iniciales de reacción.

Al utilizarse TAG como sustrato, solo fue capaz de hidrolizar la tributirina (C4), en comparación con trioleína (C18) y tricaprilina (C8), frente a los cuales no se observó actividad. A partir de la observación de que Lip10 prefiere hidrolizar sustratos ≤ 10 átomos de carbono, se sugiere que Lip10 tiene actividad esterasa y no lipasa. Por lo cual en base a este resultado se descartó la posibilidad de la aplicación de Lip10 en el proceso de obtención de biodiesel. Sin embargo, la alta actividad de Lip10 observada frente a los ácidos grasos de cadena corta, como ser el ácido butanoico (C4), es de gran interés industrial debido a sus características como potente aromatizante. Por lo cual este resultado sugiere en primera instancia que Lip10 podría participar por ejemplo en la síntesis orgánica de ésteres de cadena corta volátiles los cuales aportan aromas o sabores deseables (27).

También, se determinaron los rangos de pH óptimo y de temperatura óptima de actividad de Lip10 al utilizarse p-nitrofenil butirato (C4) como sustrato. Presentó una mayor actividad en un rango de pH entre 8.0 y 8.5 al utilizarse como sustrato pNP butirato (C4), en comparación con Est5S, EstGK1 y EstZ3 que fueron reportadas como enzimas con máxima actividad a pH 7.0, utilizando el mismo sustrato. Esta característica en el caso de Lip10 concuerda con el hecho de que la mayoría de las esterasas conocidas presentan mayor actividad en pH alcalino (89). Además, Lip10, presenta menor actividad a pH ácido, a diferencia de EstGK1 y EstZ3, las cuales presentaron una insignificante pérdida de actividad tanto en medio ácido como en alcalino. Esta característica observada en EstGK1 y EstZ3, resultó ser muy interesante

debido a que se conocen muy pocos ejemplos de enzimas lipolíticas que tienen actividad en un rango más amplio de pH (64, 89).

Lip10 presentó una temperatura óptima en un rango entre 30°C y 40°C, la cual resultó ser mayor en comparación con las esterasas Est5S, EstGK1 (30°C) y EstZ3 (30°C) (Tabla 7).

Por otro lado, los estudios cinéticos indicaron que Lip10 presentó una K_m de 0.23 mM, una $V_{m\acute{a}x}$ de 2.35 U/mg de proteína, K_{cat} de 13.47 S⁻¹ y K_{cat}/K_m de 61,31 S⁻¹ mM⁻¹ (Tabla 7).

El valor de K_{cat}/K_m utilizando como sustrato pNP butirato (C4), resultó dentro del rango de valores de esterasas reportadas de otras bibliotecas metagenómicas, como ser a partir de suelo Antártico (K_{cat}/K_m 7.65 S⁻¹ mM⁻¹), de sedimentos de llanuras mareales (K_{cat}/K_m 18.2 s⁻¹ mM⁻¹), de ambientes marinos (K_{cat}/K_m 26.7 S⁻¹ mM⁻¹) (98, 144, 145, 191). Sin embargo, en comparación con las esterasas EstGK1 y EstZ3, los valores de Lip10 resultaron ser muy inferiores. En base a estos resultados, se plantea la posibilidad de repetir la purificación de Lip10, ya que la estrategia utilizada pudo haber afectado la medida de K_m .

5.6 Perspectivas

Por medio de la realización de este proyecto, se ha logrado la identificación y caracterización de una nueva esterasa, a partir de la construcción de una biblioteca metagenómica de rumen vacuno. Además, la aproximación de metagenómica funcional como una novedosa herramienta, ha demostrado el potencial de este tipo de metodología con el fin de identificar nuevos genes y biocatalizadores.

Las enzimas lipolíticas, como las lipasas y las esterases, tienen muchas aplicaciones biotecnológicas en la producción de detergentes, alimentos y saborizantes, fármacos, ésteres, agroquímicos, cosméticos y perfumería, y más recientemente hacia la producción de biocombustibles (95). Sin embargo, la creciente necesidad de enzimas resistentes a las condiciones de algunos de esos procesos industriales, hace indispensable la búsqueda de nuevas enzimas que sean capaces de actuar en un amplio rango de condiciones. En base a ello, las enzimas lipolíticas han sido de gran interés, debido a su gran versatilidad frente a diferentes condiciones.

Actualmente, existe una gran demanda por parte de la industria farmacéutica, hacia enzimas como las esterases, las cuales median la resolución quiral de compuestos racémicos orgánicos (21, 36). Específicamente, la transformación enzimática racémica de (R-S)-ketoprofen etil éster a (S)-ketoprofen es de gran importancia debido a que el (S)-ketoprofen tiene una potente actividad como una droga antiinflamatoria no esteroidea (36, 126, 127). Por lo cual resultaría interesante estudiar la actividad de Lip10 sobre este sustrato.

Por otro lado, las enzimas lipolíticas catalizan la reacción de transesterificación para producir biodiesel, a partir de por ejemplo aceites vegetales, en presencia de un solvente orgánico. La utilización de solventes orgánicos incrementa la solubilidad de dichos sustratos hidrofóbicos durante la reacción (13, 27, 76, 123). Por lo cual resultaría interesante estudiar la actividad de Lip10 frente a solventes orgánicos como la acetona, acetonitrilo, etanol, butanol y metanol. Por ejemplo, se han observado

algunos efectos inhibitorios en la actividad enzimática en presencia de metanol (119, 175).

La actividad de las esterasas frecuentemente está afectada por muchos factores como ser metales divalentes y surfactantes no aniónicos como ser Tween y Tritón (37, 135, 157). En el año 2009, Kim y colaboradores, identificaron una esterasa que incrementaba su actividad en presencia de CaCl_2 y en menor grado en presencia de MgCl_2 y MnCl_2 . Sin embargo, su actividad lipolítica disminuía en presencia de CuSO_4 y ZnSO_4 (125). Por lo cual se pretende estudiar el efecto de algunos iones metálicos como ser MnCl_2 , MgCl_2 , CaCl_2 , CuCl_2 , ZnSO_4 , FeSO_4 , CoSO_4 y NiSO_4 en la actividad de Lip10. También quelantes como el EDTA son utilizadas con el fin de estudiar el posible rol catalítico de determinados cationes.

En un trabajo en el cual se adicionó EDTA 2mM y 2mM de CaCl_2 , MgCl_2 o MnCl_2 no se observó un efecto significativo en la actividad de la esterasa Est25, así como tampoco un efecto en la enantioselectividad hacia el (R-S)-ketoprofeno etil ester.

Estos resultados demostraron que la esterasa Est25, no requería ningún catión como cofactor, lo cual se ha reportado como una característica típica de las enzimas lipasas y esterasas (21, 129, 228). En este mismo trabajo, también se estudió el efecto de los surfactantes Tween 20, 40, 60, 80 y Tritón X-15, X-45, X-100, X-165 y X-305. Se observó un aumento de la actividad de Est25, sin provocar cambios en la enantioselectividad. Lo cual pudo haber ocurrido debido a la formación de una emulsión entre el ester del ketoprofeno y los surfactantes, lo que provocó un aumento de contacto en el área interfacial (aceite-agua), y se reflejó en un aumento de la actividad esterasa (157).

Debido a que las enzimas lipolíticas son serin hidrolasas, su actividad generalmente es inhibida por compuestos como el PMSF (38). La inhibición de la actividad enzimática de Lip10 por PMSF sugeriría la presencia de un residuo de serina en el centro activo de la enzima. Este resultado de ser positivo, junto con ensayos que estudien los posibles roles catalíticos de residuos presentes en la secuencia de Lip10, validarían la hipótesis de que la serina que se presume que tiene un rol catalítico, realmente lo sea.

Finalmente, para poder confirmar el posible rol catalítico de los residuos que forman el pentapéptido y de otros residuos que no forman parte del mismo, pero que en base a la bibliografía se cree que podrían ser catalíticos se plantea realizar mutaciones puntuales. De obtener resultados satisfactorios, estos permitirían afirmar que Lip10 verdaderamente pertenece a una nueva familia de proteínas lipolíticas, así como también, posibilitaría estudiar el efecto de ésta alteración en las propiedades bioquímicas, así como también en la especificidad de sustrato.

También, con el fin de tener información más certera sobre los residuos catalíticos se propone realizar estudios sobre la predicción de la estructura cristalográfica de Lip10. Utilizando esta metodología se han decifrado los residuos que forman parte de la triada catalítica de muchas enzimas lipolíticas (16, 155).

ANEXOS

6.1 Medios de cultivo

6.2 Tampones generales

6.3 Soluciones utilizadas para
la purificación de la
proteína recombinante
Lip10

6.4 Soluciones utilizadas en
electroforesis en geles de
poliacrilamida
desnaturalizante (SDS-PAGE)

6.5 Soluciones utilizadas en
electroforesis en geles de
agarosa

6.6 Protocolos

6.7 Tabla de cepas

6.8 Tabla de vectores

6.9 Mapa de vectores

6. Anexos

6.1 Medios de cultivo

- LB

Triptona	10g/l
Extracto de levadura	5g/l
NaCl	10g/l
Agua desionizada	c.s.p 1000ml

- Medio para detección de actividad lipolítica

Peptona	5g/l
Extracto de levadura	3g/l
Goma arábica	10g/l
Sustrato (tributirina, tricaprilina o trioleóna) 1% v/v	
Agua desionizada	c.s.p 1000ml

- 2XTY

Triptona	16g/l
Extracto de levadura	10g/l
NaCl	5g/l
Agua desionizada	c.s.p 1000ml
Ajustar a pH 7.0	

- TB

Bacto triptona	12g/l
Extracto de levadura	24g/l
Glicerol	4ml/l
KH ₂ PO ₄ (2,31g) y K ₂ HPO ₄ (12,54g)	100ml/l
Agua desionizada	c.s.p 1000ml

6.2 Tampones generales

- PBB (buffer básico de potasio)
Fosfato de potasio 0.1M; pH 6.5
- PBS (buffer fosfato salino) al 10%.
NaCl 8g/l; KCl 2g/l; Na₂HPO₄ 1,44g/l ; KH₂PO₄ 0,24g/l ; pH 7.4
- T10E25
Tris 10 mM; EDTA 25 mM; pH 8.0
- T10E1
Tris 10 mM; EDTA 1mM; pH 8.0
- Tampón de Lisis
NaCl 700 mM; Tris-HCl 50 mM ; EDTA 100 mM; SDS 4%; pH 8.0
- Tampón de diálisis
NaCl 150mM; NaH₂PO₄ 50mM; pH 8.0
- Tampón PDB
Tris-HCl 10mM pH 8,3; NaCl 100mM; MgCl₂ 10mM

6.3 Soluciones utilizadas para la purificación de la proteína recombinante 6xHisLip10

- Tampón His Tag 2x
NaH₂PO₄ 100mM; NaCl 600mM;pH 8.0

- Tampón de unión
Imidazol 50mM; NaCl 300mM; NaH₂PO₄ 50mM; pH 8.0
- Tampón de lavado
Imidazol 20mM; NaCl 300mM; NaH₂PO₄ 50mM; pH 8.0
- Tampón de lavado más glicerol
Imidazol 20mM; NaCl 300mM; NaH₂PO₄ 50mM; Glicerol 10%; pH 8.0
- Tampón de elución
Imidazol 250mM; NaCl 300mM; NaH₂PO₄ 50mM; pH 8.0
- Tampón de elución más glicerol
Imidazol 250mM; NaCl 300mM; NaH₂PO₄ 50mM; Glicerol 10%; pH 8.0

6.4 Soluciones utilizadas en electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturizante (SDS-PAGE)

- Solución separadora (12%)

Tampón separador	2.5ml
Acrilamida 30%	3.4ml
TEMED 10%	0.05ml
Persulfato de amonio 10%	0.5ml
Agua desionizada	4.2ml
- Tampón separador (pH 8.8)

Tris base	72.6g
SDS	1.6g
Agua desionizada	c.s.p 400ml
- Solución concentradora

Tampón concentrador	1.25ml
---------------------	--------

Acrilamida 30%	0.8ml
TEMED	0.05ml
Persulfato de amonio 10%	0.3ml
Agua desionizada	2.95ml

- Tampón concentrador (pH 6.8)

Tris base	24g
SDS	1.6g
Agua desionizada	c.s.p 400ml

- Tampón de carga 2x (pH 8.3)

Tris 120mM; Glicerol 20%; Azul de bromofenol 0.01%; SDS 4%; pH 6.8

- Tampón de corrida 10x

Tris base	302.75g
Glicina	721g
SDS	50g
Agua desionizada	c.s.p 5000ml

- Solución de tinción

Metanol 45%

Acido acético glacial 5%

Azul brillante de Coomassie (R250) 0.1% (w/v)

- Solución para desteñido

Metanol 50%

Acido acético glacial 10%

Adicionarle a la muestra tampón de carga 2x, β -mercaptoetanol al 0.1% (1:1) y hervir a 95°C durante 10 min.

6.5 Soluciones utilizadas en electroforesis en geles de agarosa

- Tampón de Electroforesis TAE 1X (pH 8)

Tris base 4,84g/l

Acido acético glacial 1,14 ml

EDTA 2 ml de 0,5M

6.6 Protocolos

6.6.1 Preparación de células electrocompetentes

Se partió de un preinóculo incubado durante toda la noche de la cepa a hacer competente en 5 ml de medio LB a 37°C. A las 24 horas se inocularon 200ml de medio de cultivo TB (Anexos 6.1) con una dilución 1/100 del preinóculo y se incubaron a 37°C a 180rpm hasta alcanzar una DO a 600nm de 0.5. Alcanzada esta DO se colocó el cultivo 30 min en hielo. El inóculo se fraccionó en 4 tubos y se centrifugaron durante 5 min a 4000rpm a 4°C. Los pellets celulares fueron resuspendidos en 5 ml de agua miliQ estéril fría con agitación en baño de agua hielo y se unificaron los volúmenes a dos tubos. Se realizó una segunda centrifugación bajo las mismas condiciones y se descartó el sobrenadante. El pellet celular obtenido se resuspendió en el mínimo volumen de glicerol estéril al 10%, y se realizó una última centrifugación a 7000rpm durante 7 min a 4°C. Las células se almacenaron fraccionadas en alícuotas de a 100µl a -80°C.

6.6.2 Preparación de células de quimiocompetentes

El protocolo seguido para la preparación de células competentes fue adaptado del descrito por Ausubel y colaboradores (9). Se partió de una colonia de la cepa a hacer competente a partir de un cultivo fresco crecido en medio sólido LB, la cual se sembró en 5ml de LB líquido, incubado toda la noche con agitación a 180rpm a 37°C. Se inocularon 50ml de medio de cultivo LB con una dilución 1/100 del inóculo y se incubó con agitación a 180rpm a 37°C hasta alcanzar una DO a 600nm de 0.6. Se cosecharon las células en tubos estériles fríos mediante centrifugación de 5 min a 2300xg a 4°C. Se

resuspendió el pellet en 20ml de CaCl_2 0.1M frío y las células se mantuvieron en hielo durante 20 min. Luego se centrifugó en frío 5min a 2300xg, descartándose el sobrenadante, y las células se resuspendieron en 0.5ml de CaCl_2 0.1M frío, dando pequeños golpes alternando con períodos de hielo. Las células competentes así obtenidas se almacenaron a -80°C en glicerol 25% (v/v) para su posterior uso, fraccionadas en alícuotas de 100 μl .

6.6.3 Transformación mediante choque térmico

La inserción de ADN foráneo a las células se realizó mediante el método de choque térmico, descrito por Sambrock y colaboradores (204). Para ello a 100 μl de células competentes se le agregaron 0.2 μg de ADN plasmídico conteniendo el gen Lip10.

Las mezclas se incubaron a 42°C durante 90 segundos en baño de agua y luego rápidamente en hielo durante 2 min. Se agregó 1ml de medio líquido LB a cada tubo y se incubaron durante 1 hora con agitación a 180rpm a 37°C . Las colonias se seleccionaron en placas de LB, y se incubaron durante toda la noche a 37°C .

6.7 Tabla de cepas

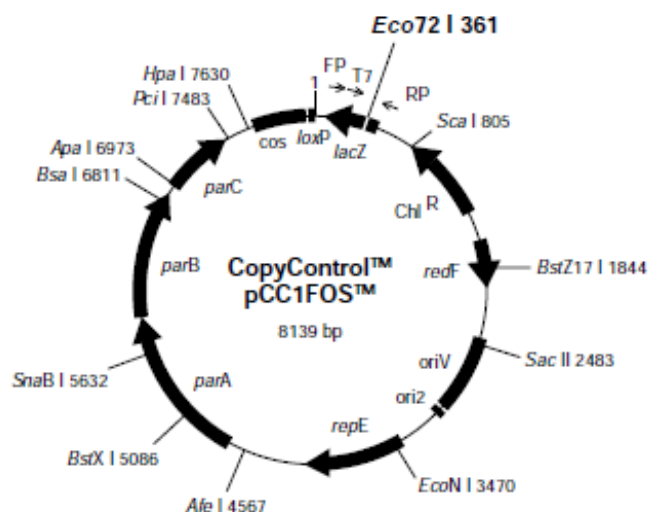
Estirpe de <i>Escherichia coli</i>	Fenotipo/Genotipo	Referencias
EPI300T1RTR1	[F- <i>mcrA</i> $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ (Str ^R) ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ lacX74 <i>recA1endA1 araD139</i> $\Delta(ara,leu)$ 7697 <i>gal/U galK</i> λ - <i>rpsL mupG trfA tonA dhfr</i>] F- <i>mcrA</i> $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ ϕ 80lacZ Δ M15	Epicentre
DH5 α	<i>supE44</i> Δ lacU169(ϕ 80lacZ Δ M15) <i>hsdR17 recA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	(249)
BL21 (DE3) pLysS	F- <i>ompT hsdS(rB mB) gal dChl</i> λ (DE3) pLysS (Chl ^R) (λ (DE3): <i>lacI, lacUV5-T7 gene 1, ind1, sam7, nin5</i>)	Promega

6.8 Tabla de vectores

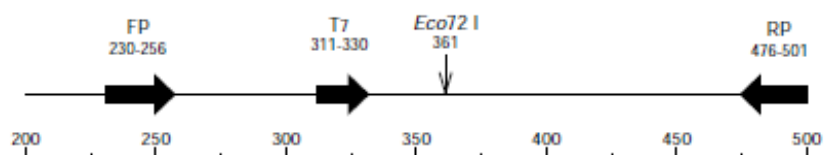
Vectores	Fenotipo/Genotipo	Referencias
pCCFOS1	<i>LacZ</i> , Sitios <i>Cos</i> , <i>OriV</i> , <i>Ori2</i> , Chl ^R	Epicentre
pBluescriptSK (pBSK)	Amp ^R	(5) Stratagene
pET14b	Vector de clonación, promotor T7, secuencia codificante His.Tag, MCS, Terminador T7, Amp ^R	Promega
pET14b-lip10	pET14b conteniendo el gen Lip10	En este trabajo

6.9 Mapas de vectores

6.9.1 Mapa del vector pCC1FOS

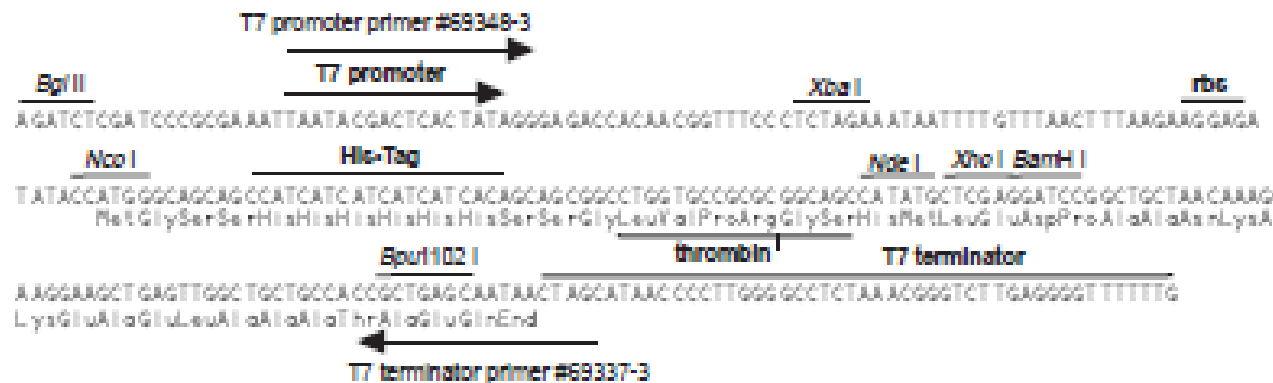
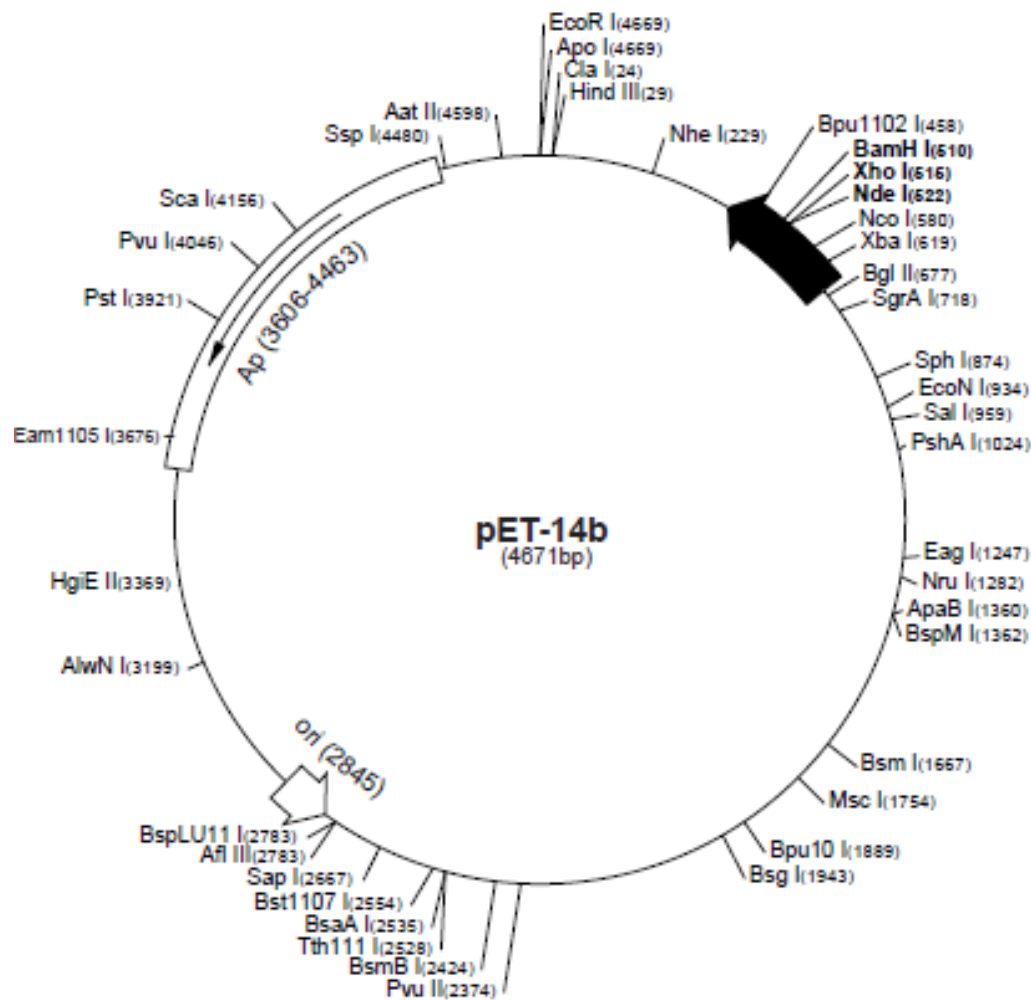


Note: Not all restriction enzymes that cut only once are indicated above.
See Appendix E (pg. 16) for complete restriction information.
Primers are not drawn to scale.



FP – pCC1™/pEpiFOS™ Forward Sequencing Primer	5' GGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGG 3'
RP – pCC1™/pEpiFOS™ Reverse Sequencing Primer	5' CTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGC 3'
T7 – T7 Promoter Primer	5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'

6.9.2 Mapa del vector pET14b



7. Bibliografía

1. ASTM Standard specification for diesel fuel oil, biodiesel blend (B6 to B20). In: Annual Book of ASTM Standards, ASTM International, West Conshohocken, Method D7467-08a; 2008b., 2007/10/16 ed.
2. **Ahn Jung Hoon, Pan Jae Gu , y R. J. Shick.** 1999. Identification of the tliDEF ABC Transporter Specific for Lipase in *Pseudomonas fluorescens* SIK W1. J Bacteriology **181**:1847-1852.
3. **Al-Zuhair, S.** 2007. Production of biodiesel: possibilities and challenges. Biofuels, Bioproducts and Biorefining **1**:57-66.
4. **Ali, M. S., C. Yun, A. Chor, R. Rahman, M. Basri, y A. Salleh.** 2012. Purification and Characterisation of an F16L Mutant of a Thermostable Lipase. The Protein Journal **31**:229-237.
5. **Alting-Mees, M., y J. Short.** 1989. pBluescript II: gene mapping vectors. Nucleic Acids Research **17**:9494.
6. **Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, y D. J. Lipman.** 1990. Basic local alignment search tool. J Mol Biol **215**:403-410.
7. **Amann, R. I., W. Ludwig, y K. H. Schleifer.** 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiol Rev **59**:143-169.
8. **Arpigny, J. L., y K. E. Jaeger.** 1999. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. Biochem J **343 Pt 1**:177-183.
9. **Ausubel, F. M.** 1987. Current Protocols in Molecular Biology: 1987-1988. John Wiley & Sons.
10. **Azócar, L., G. Ciudad, H. Heipieper, y R. Navia.** 2010. Biotechnological processes for biodiesel production using alternative oils. Applied Microbiology and Biotechnology **88**:621-636.
11. **Azocar, L., G. Ciudad, H. J. Heipieper, R. Munoz, y R. Navia.** 2011. Lipase-catalyzed process in an anhydrous medium with enzyme reutilization to produce biodiesel with low acid value. J Biosci Bioeng **112**:583-589.
12. **Barbaro, S. E., J. T. Trevors, y W. E. Inniss.** 2001. Effects of low temperature, cold shock, and various carbon sources on esterase and lipase activities and exopolysaccharide production by a psychrotrophic *Acinetobacter* sp. Can J Microbiol **47**:194-205.
13. **Bayer, S., A. Kunert, M. Ballschmiter, y T. Greiner-Stoeffele.** 2010. Indication for a new lipolytic enzyme family: isolation and

- characterization of two esterases from a metagenomic library. *J Mol Microbiol Biotechnol* **18**:181-187.
14. **Bendtsen, J. D., H. Nielsen, G. von Heijne, y S. Brunak.** 2004. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol* **340**:783-795.
 15. **Bisen, P. S., B. S. Sanodiya, G. S. Thakur, R. K. Baghel, y G. B. Prasad.** 2010. Biodiesel production with special emphasis on lipase-catalyzed transesterification. *Biotechnol Lett* **32**:1019-1030.
 16. **Biver, S., y M. Vandenbol.** 2013. Characterization of three new carboxylic ester hydrolases isolated by functional screening of a forest soil metagenomic library. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **40**:191-200.
 17. **Bondioli, P., A. Gasparoli, L. Della Bella, S. Tagliabue, y G. Toso.** 2003. Biodiesel stability under commercial storage conditions over one year. *European Journal of Lipid Science and Technology* **105**:735-741.
 18. **Boocock, D., S. Konar, y H. Sidi.** 1996. Phase diagrams for oil/methanol/ether mixtures. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **73**:1247-1251.
 19. **Boocock, D. G. B., S. K. Konar, V. Mao, y H. Sidi.** 1996. Fast one-phase oil-rich processes for the preparation of vegetable oil methyl esters. *Biomass and Bioenergy* **11**:43-50.
 20. **Bornscheuer, U. T.** 2002. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiol Rev* **26**:73-81.
 21. **Bornscheuer, U. T., C. Bessler, R. Srinivas, y S. Hari Krishna.** 2002. Optimizing lipases and related enzymes for efficient application. *Trends in biotechnology* **20**:433-437.
 22. **Bornscheuer, U. T., y R. J. Kazlauskas.** 2006. Choosing Reaction Media: Water and Organic Solvents, p. 25-42, *Hydrolases in Organic Synthesis*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
 23. **Bornscheuer, U. T., y R. J. Kazlauskas.** 2006. Designing Enantioselective Reactions, p. 5-24, *Hydrolases in Organic Synthesis*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
 24. **BP** 2012 posting date. BP Statistical Review of World Energy June 2012. www.bp.com. [Online.]
 25. **Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**:248-254.

26. **Brady, S. F., C. J. Chao, y J. Clardy.** 2002. New natural product families from an environmental DNA gene cluster. *J Am Chem Soc* **124**:9968-9969.
27. **Brault, G., F. Shareck, Y. Hurtubise, F. Lépine, y N. Doucet.** 2012. Isolation and Characterization of EstC, a New Cold-Active Esterase from *Streptomyces coelicolor*. *PLoS ONE* **7**.
28. **Brennan, L., y P. Owende.** 2010. Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **14**:557-577.
29. **Brennan, Y., W. N. Callen, L. Christoffersen, P. Dupree, F. Goubet, S. Healey, M. Hernandez, M. Keller, K. Li, N. Palackal, A. Sittenfeld, G. Tamayo, S. Wells, G. P. Hazlewood, E. J. Mathur, J. M. Short, D. E. Robertson, y B. A. Steer.** 2004. Unusual microbial xylanases from insect guts. *Appl Environ Microbiol* **70**:3609-3617.
30. **Brulc, J. M., D. A. Antonopoulos, M. E. Miller, M. K. Wilson, A. C. Yannarell, E. A. Dinsdale, R. E. Edwards, E. D. Frank, J. B. Emerson, P. Wacklin, P. M. Coutinho, B. Henrissat, K. E. Nelson, y B. A. White.** 2009. Gene-centric metagenomics of the fiber-adherent bovine rumen microbiome reveals forage specific glycoside hydrolases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**:1948-1953.
31. **Cardenas, F., E. Alvarez, M. S. de Castro-Alvarez, J. M. Sanchez-Montero, M. Valmaseda, S. W. Elson, y J. V. Sinisterra.** 2001. Screening and catalytic activity in organic synthesis of novel fungal and yeast lipases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **14**:111-123.
32. **Cardenas, F., M. S. de Castro, J. M. Sanchez-Montero, J. V. Sinisterra, M. Valmaseda, S. W. Elson, y E. Alvarez.** 2001. Novel microbial lipases: catalytic activity in reactions in organic media. *Enzyme and Microbial Technology* **28**:145-154.
33. **Chandrasekharaiah, M., A. Thulasi, M. Bagath, D. Kumar, S. Santosh, C. Palanivel, V. Jose, y K. Sampath.** 2012. Identification of cellulase gene from the metagenome of fecal samples and functional characterization of a novel bifunctional cellulolytic enzyme. *Appl Biochem Biotechnol* **167**:132-141.
34. **Chisti, Y.** 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol Adv* **25**:294-306.
35. **Chiu, C.-W., L. G. Schumacher, y G. J. Suppes.** 2004. Impact of cold flow improvers on soybean biodiesel blend. *Biomass and Bioenergy* **27**:485-491.

36. **Choi, G.-S., J.-Y. Kim, J.-H. Kim, Y.-W. Ryu, y G.-J. Kim.** 2003. Construction and characterization of a recombinant esterase with high activity and enantioselectivity to (S)-ketoprofen ethyl ester. *Protein Expression and Purification* **29**:85-93.
37. **Choi, Y. J., C. B. Miguez, y B. H. Lee.** 2004. Characterization and Heterologous Gene Expression of a Novel Esterase from *Lactobacillus casei* CL96. *Applied and Environmental Microbiology* **70**:3213-3221.
38. **Chu, X., H. He, C. Guo, y B. Sun.** 2008. Identification of two novel esterases from a marine metagenomic library derived from South China Sea. *Applied Microbiology and Biotechnology* **80**:615-625.
39. **Chu, X., H. He, C. Guo, y B. Sun.** 2008. Identification of two novel esterases from a marine metagenomic library derived from South China Sea. *Applied Microbiology and Biotechnology* **80**:615-625.
40. **Chul-Hyung Kang, Ki-Hoon Oh, Mi-Hwa, Tae-Kwang, Bong H Kim, y J.-H. Yoon.** 2011. A novel family VII esterase with industrial potential from compost metagenomic library. *Microb Cell Fact* **10**:41.
41. **Cohen, G. N., V. Barbe, D. Flament, M. Galperin, R. Heilig, O. Lecompte, O. Poch, D. Prieur, J. Quéréllou, R. Ripp, J.-C. Thierry, J. Van der Oost, J. Weissenbach, Y. Zivanovic, y P. Forterre.** 2003. An integrated analysis of the genome of the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus abyssi*. *Molecular Microbiology* **47**:1495-1512.
42. **Conchillo-Solé, O., N. de Groot, F. Avilés, J. Vendrell, X. Daura, y S. Ventura.** 2007. AGGRESKAN: a server for the prediction and evaluation of. *BMC bioinformatics* **8**:65.
43. **Côté, A., y F. Shareck.** 2010. Expression and characterization of a novel heterologous moderately thermostable lipase derived from metagenomics in *Streptomyces lividans*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **37**:883-891.
44. **Cottrell, M. T., J. A. Moore, y D. L. Kirchman.** 1999. Chitinases from uncultured marine microorganisms. *Appl Environ Microbiol* **65**:2553-2557.
45. **Cottrell, M. T., L. Yu, y D. L. Kirchman.** 2005. Sequence and expression analyses of Cytophaga-like hydrolases in a Western arctic metagenomic library and the Sargasso Sea. *Appl Environ Microbiol* **71**:8506-8513.
46. **Courtois, S., C. M. Cappellano, M. Ball, F. X. Francou, P. Normand, G. Helynck, A. Martinez, S. J. Kolvek, J. Hopke, M. S. Osburne, P. R. August, R. Nalin, M. Guerineau, P. Jeannin, P. Simonet, y J. L. Pernodet.** 2003. Recombinant environmental libraries provide access

- to microbial diversity for drug discovery from natural products. *Appl Environ Microbiol* **69**:49-55.
47. **Cousin X, Hotelier T, Giles K, Lievin P, Toutant JP, y C. A.** 1997. The alpha/beta fold family of proteins database and the cholinesterase gene server ESTHER. *Nucleic Acids Res* **25**:143-146.
 48. **Couto, G. H., A. Glogauer, H. Faoro, L. S. Chubatsu, E. M. Souza, y F. O. Pedrosa.** 2010. Isolation of a novel lipase from a metagenomic library derived from mangrove sediment from the south Brazilian coast. *Genet Mol Res* **9**:514-523.
 49. **Cowan, D., Q. Meyer, W. Stafford, S. Muyanga, R. Cameron, y P. Wittwer.** 2005. Metagenomic gene discovery: past, present and future. *Trends Biotechnol* **23**:321-329.
 50. **Cruz, H., C. Perez, E. Wellington, C. Castro, y L. Servin-Gonzalez.** 1994. Sequence of the *Streptomyces albus* G lipase-encoding gene reveals the presence of a prokaryotic lipase family. *Gene* **144**:141-142.
 51. **Daniel, R.** 2005. The metagenomics of soil. *Nat Rev Microbiol* **3**:470-478.
 52. **Deenanath, E. D., S. Iyuke, y K. Rumbold.** 2012. The bioethanol industry in sub-Saharan Africa: history, challenges, and prospects. *J Biomed Biotechnol* **2012**:416491.
 53. **Demain, A. L.** 2006. From natural products discovery to commercialization: a success story. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **33**:486-495.
 54. **Demirbas, A.** 2007. Progress and recent trends in biofuels. *Progress in Energy and Combustion Science* **33**:1-18.
 55. **DeOliveira, E., R. L. Quirino, P. A. Z. Suarez, y A. G. S. Prado.** 2006. Heats of combustion of biofuels obtained by pyrolysis and by transesterification and of biofuel/diesel blends. *Thermochimica Acta* **450**:87-90.
 56. **Diaz-Torres, M. L., R. McNab, D. A. Spratt, A. Villedieu, N. Hunt, M. Wilson, y P. Mullany.** 2003. Novel tetracycline resistance determinant from the oral metagenome. *Antimicrob Agents Chemother* **47**:1430-1432.
 57. **Division., E. S. R. L. G. M.** 2012, posting date. Educational Graphics on Global Climate Change and the Greenhouse Effect. <http://www.esrl.noaa.gov>. NOAA. [Online.]
 58. **Donohue, T. J., y R. J. Cogdell.** 2006. Microorganisms and clean energy. *Nat Rev Microbiol* **4**:800.

59. **Du, W., D. Liu, L. Li, y L. Dai.** 2007. Mechanism exploration during lipase-mediated methanolysis of renewable oils for biodiesel production in a tert-butanol system. *Biotechnol Prog* **23**:1087-1090.
60. **Duan, C. J., L. Xian, G. C. Zhao, Y. Feng, H. Pang, X. L. Bai, J. L. Tang, Q. S. Ma, y J. X. Feng.** 2009. Isolation and partial characterization of novel genes encoding acidic cellulases from metagenomes of buffalo rumens. *J Appl Microbiol* **107**:245-256.
61. **E. S. R. L. , y M. Division.** 2012, posting date. Trends in Atmospheric Carbon Dioxide. [Online.]
62. **Ebrahimpour, A., R. N. Z. R. A. Rahman, M. Basri, y A. B. Salleh.** 2011. High level expression and characterization of a novel thermostable, organic solvent tolerant, 1,3-regioselective lipase from *Geobacillus sp.* strain ARM. *Bioresource Technology* **102**:6972-6981.
63. **Edgar, R. C.** 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* **32**:1792-1797.
64. **Elend, C., C. Schmeisser, C. Leggewie, P. Babiak, J. D. Carballeira, H. L. Steele, J. L. Reymond, K. E. Jaeger, y W. R. Streit.** 2006. Isolation and biochemical characterization of two novel metagenome-derived esterases. *Appl Environ Microbiol* **72**:3637-3645.
65. **Entcheva, P., W. Liebl, A. Johann, T. Hartsch, y W. R. Streit.** 2001. Direct cloning from enrichment cultures, a reliable strategy for isolation of complete operons and genes from microbial consortia. *Appl Environ Microbiol* **67**:89-99.
66. **EPA** 2012, posting date. Greenhouse Gas Emissions <http://www.epa.gov>. [Online.]
67. **Fangrui, M., y H. Milford.** 1999. Biodiesel production: a review. *El Sevier* **70**:1-15.
68. **Faoro, H., A. Glogauer, E. M. Souza, L. U. Rigo, L. M. Cruz, R. A. Monteiro, y F. O. Pedrosa.** 2011. Identification of a new lipase family in the Brazilian Atlantic Forest soil metagenome. *Environmental Microbiology Reports* **3**:750-755.
69. **Fekkes, P., y A. J. Driessen.** 1999. Protein targeting to the bacterial cytoplasmic membrane. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**:161-173.
70. **Ferrer, M., A. Beloqui, K. N. Timmis, y P. N. Golyshin.** 2009. Metagenomics for Mining New Genetic Resources of Microbial Communities. *J Mol Microbiol Biotechnol* **16**:109-123.
71. **Ferrer, M., O. V. Golyshina, T. N. Chernikova, A. N. Khachane, V. A. Martins Dos Santos, M. M. Yakimov, K. N. Timmis, y P. N. Golyshin.**

2005. Microbial enzymes mined from the Urania deep-sea hypersaline anoxic basin. *Chem Biol* **12**:895-904.
72. **Ferrer, M., O. V. Golyshina, T. N. Chernikova, A. N. Khachane, D. Reyes-Duarte, V. A. P. M. D. Santos, C. Strompl, K. Elborough, G. Jarvis, A. Neef, M. M. Yakimov, K. N. Timmis, y P. N. Golyshin.** 2005. Novel hydrolase diversity retrieved from a metagenome library of bovine rumen microflora. *Environ Microbiol* **7**:1996-2010.
 73. **Ferrer, M., F. Martínez-Abarca, y P. N. Golyshin.** 2005. Mining genomes and 'metagenomes' for novel catalysts. *Curr Opin Biotechnol* **16**:588-593.
 74. **Freedman, B., R. Butterfield, y E. Pryde.** 1986. Transesterification kinetics of soybean oil 1. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **63**:1375-1380.
 75. **Freedman, B., E. Pryde, y T. Mounts.** 1984. Variables affecting the yields of fatty esters from transesterified vegetable oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **61**:1638-1643.
 76. **Fu, C., Y. Hu, F. Xie, H. Guo, E. Ashforth, S. Polyak, B. Zhu, y L. Zhang.** 2011. Molecular cloning and characterization of a new cold-active esterase from a deep-sea metagenomic library. *Applied Microbiology and Biotechnology* **90**:961-970.
 77. **Fukuda, H., A. Kondo, y H. Noda.** 2001. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *J Biosci Bioeng* **92**:405-416.
 78. **Gabor, E. M., W. B. Alkema, y D. B. Janssen.** 2004. Quantifying the accessibility of the metagenome by random expression cloning techniques. *Environ Microbiol* **6**:879-886.
 79. **Gabor, E. M., E. J. de Vries, y D. B. Janssen.** 2004. Construction, characterization, and use of small-insert gene banks of DNA isolated from soil and enrichment cultures for the recovery of novel amidases. *Environ Microbiol* **6**:948-958.
 80. **Ghosh, P. K., R. K. Saxena, R. Gupta, R. P. Yadav, y S. Davidson.** 1996. Microbial lipases: production and applications. *Sci Prog* **79 (Pt 2)**:119-157.
 81. **Gilbert, E. J., A. Cornish, y C. W. Jones.** 1991. Purification and properties of extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa* EF2. *J Gen Microbiol* **137**:2223-2229.
 82. **Gilbert, E. J., J. W. Drozd, y C. W. Jones.** 1991. Physiological regulation and optimization of lipase activity in *Pseudomonas aeruginosa* EF2. *J Gen Microbiol* **137**:2215-2221.

83. **Gillespie, D. E., S. F. Brady, A. D. Bettermann, N. P. Cianciotto, M. R. Liles, M. R. Rondon, J. Clardy, R. M. Goodman, y J. Handelsman.** 2002. Isolation of antibiotics turbomycin A and B from a metagenomic library of soil microbial DNA. *Appl Environ Microbiol* **68**:4301-4306.
84. **Ginolhac, A., C. Jarrin, B. Gillet, P. Robe, P. Pujic, K. Tophile, H. Bertrand, T. M. Vogel, G. Perriere, P. Simonet, y R. Nalin.** 2004. Phylogenetic analysis of polyketide synthase I domains from soil metagenomic libraries allows selection of promising clones. *Appl Environ Microbiol* **70**:5522-5527.
85. **Green, E. M.** 2011. Fermentative production of butanol—the industrial perspective. *Curr Opin Biotechnol* **22**:337-343.
86. **Gregersen, T.** 1978. Rapid method for distinction of Gram-negative from Gram-positive bacteria. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* **5**:123-127.
87. **Gunther, E. J., N. E. Murray, y P. M. Glazer.** 1993. High efficiency, restriction-deficient *in vitro* packaging extracts for bacteriophage lambda DNA using a new *E.coli* lysogen. *Nucleic Acids Res* **21**:3903-3904.
88. **Gupta, R., Q. Beg, y P. Lorenz.** 2002. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* **59**:15-32.
89. **Gupta, R., N. Gupta, y P. Rathi.** 2004. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Applied Microbiology and Biotechnology* **64**:763-781.
90. **Hama, S., y A. Kondo.** 2012. Enzymatic biodiesel production: An overview of potential feedstocks and process development. *Bioresour Technol.*
91. **Hancsók, J., M. Bubálik, Á. Beck, y J. Baladincz.** 2008. Development of multifunctional additives based on vegetable oils for high quality diesel and biodiesel. *Chemical Engineering Research and Design* **86**:793-799.
92. **Handelsman, J.** 2004. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**:669-685.
93. **Handelsman, J., M. R. Rondon, S. F. Brady, J. Clardy, y R. M. Goodman.** 1998. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chem Biol* **5**:R245-249.
94. **Harper, S., y D. Speicher.** 2011. Purification of Proteins Fused to Glutathione S-Transferase, p. 259-280. *In* D. Walls y S. T. Loughran (ed.), *Protein Chromatography*, vol. 681. Humana Press.

95. **Hasan, F., A. A. Shah, y A. Hameed.** 2006. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology* **39**:235-251.
96. **Havelaar AH, y H. WM.** 1984. A method for the enumeration of male-specific bacteriophages in sewage. *J Appl Bacteriol.* **56**:439-447.
97. **Hayashi, H., T. Abe, M. Sakamoto, H. Ohara, T. Ikemura, K. Sakka, y Y. Benno.** 2005. Direct cloning of genes encoding novel xylanases from the human gut. *Can J Microbiol* **51**:251-259.
98. **Heath, C., X. P. Hu, S. C. Cary, y D. Cowan.** 2009. Identification of a Novel Alkaliphilic Esterase Active at Low Temperatures by Screening a Metagenomic Library from Antarctic Desert Soil. *Appl Environ Microbiol.* **75**:4657-4659.
99. **Heikinheimo, P., A. Goldman, C. Jeffries, y D. L. Ollis.** 1999. Of barn owls and bankers: a lush variety of α/β hydrolases. *Structure* **7**:R141-R146.
100. **Henderson, I. R., F. Navarro-Garcia, y J. P. Nataro.** 1998. The great escape: structure and function of the autotransporter proteins. *Trends Microbiol* **6**:370-378.
101. **Henne, A., R. Daniel, R. A. Schmitz, y G. Gottschalk.** 1999. Construction of environmental DNA libraries in *Escherichia coli* and screening for the presence of genes conferring utilization of 4-hydroxybutyrate. *Appl Environ Microbiol* **65**:3901-3907.
102. **Henne, A., R. A. Schmitz, M. Bomeke, G. Gottschalk, y R. Daniel.** 2000. Screening of environmental DNA libraries for the presence of genes conferring lipolytic activity on *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **66**:3113-3116.
103. **Hong, S., E. Jung, J. Joo, y Y. Yoo.** 2012. Soluble expression of *Candida antarctica* lipase B in *Escherichia coli* by fusion with Skp chaperone. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* **17**:687-692.
104. **Hotelier T, Renault L, Cousin X, Negre V, Marchot P, y C. A.** 2004. ESTHER, the database of the alpha/beta-hydrolase fold superfamily of proteins. *Nucleic Acids Research*, **32**:145.
105. **Hu, Q., M. Sommerfeld, E. Jarvis, M. Ghirardi, M. Posewitz, M. Seibert, y A. Darzins.** 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *Plant J* **54**:621-639.
106. **Hu, Y., C. Fu, Y. Huang, Y. Yin, G. Cheng, F. Lei, N. Lu, J. Li, E. J. Ashforth, L. Zhang, y B. Zhu.** 2010. Novel lipolytic genes from the microbial metagenomic library of the South China Sea marine sediment. *FEMS Microbiol Ecol* **72**:228-237.

107. **Huttunen, J. T., J. Alm, A. Liikanen, S. Juutinen, T. Larmola, T. Hammar, J. Silvola, y P. J. Martikainen.** 2003. Fluxes of methane, carbon dioxide and nitrous oxide in boreal lakes and potential anthropogenic effects on the aquatic greenhouse gas emissions. *Chemosphere* **52**:609-621.
108. **Ilmberger, N., y W. R. Streit.** 2010. Screening for Cellulase-Encoding Clones in Metagenomic Libraries #, p. 177-188, *T Metagenomics*, vol. 668.
109. **ITB.** 10 Dez 200 2009, posting date. The Lipase Engineering Database. Institute of Technical Biochemistry. [Online.]
110. **Jaeger, K.-E., y M. T. Reetz.** 1998. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends in biotechnology* **16**:396-403.
111. **Jaeger, K. E., B. W. Dijkstra, y M. T. Reetz.** 1999. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annu Rev Microbiol* **53**:315-351.
112. **Jaeger, K. E., y T. Eggert.** 2002. Lipases for biotechnology. *Curr Opin Biotechnol* **13**:390-397.
113. **Jaeger, K. E., S. Ransac, B. W. Dijkstra, C. Colson, M. van Heuvel, y O. Misset.** 1994. Bacterial lipases. *FEMS Microbiol Rev* **15**:29-63.
114. **Jaeger, K. E., y M. T. Reetz.** 2000. Directed evolution of enantioselective enzymes for organic chemistry. *Curr Opin Chem Biol* **4**:68-73.
115. **Jeon, J. H., J. T. Kim, S. G. Kang, J. H. Lee, y S. J. Kim.** 2009. Characterization and its potential application of two esterases derived from the arctic sediment metagenome. *Mar Biotechnol (NY)* **11**:307-316.
116. **Jeon, J. H., J. T. Kim, Y. J. Kim, H. K. Kim, H. S. Lee, S. G. Kang, S. J. Kim, y J. H. Lee.** 2009. Cloning and characterization of a new cold-active lipase from a deep-sea sediment metagenome. *Applied Microbiology and Biotechnology* **81**:865-874.
117. **Jeong, G.-T., y D.-H. Park.** 2008. Lipase-Catalyzed Transesterification of Rapeseed Oil for Biodiesel Production with Butanol. *Appl Biochem Biotechnol* **148**:131-139.
118. **Johnson, K. A., y R. S. Goody.** 2011. The Original Michaelis Constant: Translation of the 1913 Michaelis-Menten Paper. *Biochemistry* **50**:8264-8269.
119. **Kaieda, M., T. Samukawa, A. Kondo, y H. Fukuda.** 2001. Effect of Methanol and water contents on production of biodiesel fuel from plant oil catalyzed by various lipases in a solvent-free system. *J Biosci Bioeng* **91**:12-15.

120. **Kaieda, M., T. Samukawa, T. Matsumoto, K. Ban, A. Kondo, Y. Shimada, H. Noda, F. Nomoto, K. Ohtsuka, E. Izumoto, y H. Fukuda.** 1999. Biodiesel fuel production from plant oil catalyzed by *Rhizopus oryzae* lipase in a water-containing system without an organic solvent. *J Biosci Bioeng* **88**:627-631.
121. **Kanwar, L., B. K. Gogoi, y P. Goswami.** 2002. Production of a *Pseudomonas* lipase in n-alkane substrate and its isolation using an improved ammonium sulfate precipitation technique. *Bioresour Technol* **84**:207-211.
122. **Karabulut, I., S. Turan, y G. Ergin.** 2004. Effects of chemical interesterification on solid fat content and slip melting point of fat/oil blends. *European Food Research and Technology* **218**:224-229.
123. **Khan, M., y K. Jithesh.** 2012. Expression and purification of organic solvent stable lipase from soil metagenomic library. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **28**:2417-2424.
124. **Kim Eun Kyung, Jang Won Hee, Ko Jung Ho, Kang Jong Seok, Noh Moon Jong , y Y. O. Joon.** 2001. Lipase and Its Modulator from *Pseudomonas* sp. Strain KFCC 10818: Proline-to-Glutamine Substitution at Position 112 Induces Formation of Enzymatically Active Lipase in the Absence of the Modulator. *J Bacteriology* **183**:20.
125. **Kim, E. Y., K. H. Oh, M. H. Lee, C. H. Kang, T. K. Oh, y J. H. Yoon.** 2009. Novel cold-adapted alkaline lipase from an intertidal flat metagenome and proposal for a new family of bacterial lipases. *Appl Environ Microbiol* **75**:257-260.
126. **Kim, J.-Y., G.-S. Choi, Y.-J. Kim, Y.-W. Ryu, y G.-J. Kim.** 2002. A new isolate *Bacillus stearothermophilus* JY144 expressing a novel esterase with high enantioselectivity to (R)-ketoprofen ethyl ester: strain selection and gene cloning. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **18**:133-145.
127. **Kim, M. G., E. G. Lee, y B. H. Chung.** Improved enantioselectivity of *Candida rugosa* lipase towards ketoprofen ethyl ester by a simple two-step treatment. *Process Biochemistry* **35**:977-982.
128. **Kim, M. K., T. H. Kang, J. Kim, H. Kim, y H. D. Yun.** 2012. Cloning and identification of a new group esterase (Est5S) from noncultured rumen bacterium. *J Microbiol Biotechnol* **22**:1044-1053.
129. **Kim, Y. J., G. S. Choi, S. B. Kim, G. S. Yoon, Y. S. Kim, y Y. W. Ryu.** 2006. Screening and characterization of a novel esterase from a metagenomic library. *Protein Expr Purif* **45**:315-323.

130. **Kim, Y. O., Y. L. Heo, H. K. Kim, B. H. Nam, H. J. Kong, D. G. Kim, W. J. Kim, B. S. Kim, Y. J. Jee, y S. J. Lee.** 2012. Gene cloning and characterization of a cold-adapted esterase from *Acinetobacter venetianus* V28. *J Microbiol Biotechnol* **22**:1245-1252.
131. **Klinkesorn, U., A. H-Kittikun, P. Chinachoti, y P. Sophanodora.** 2004. Chemical transesterification of tuna oil to enriched omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Food Chemistry* **87**:415-421.
132. **Knothe Tate, M. L., T. D. Falls, S. H. McBride, R. Atit, y U. R. Knothe.** 2008. Mechanical modulation of osteochondroprogenitor cell fate. *Int J Biochem Cell Biol* **40**:2720-2738.
133. **Ko, K.-C., S.-O. Rim, Y. Han, B. Shin, G.-J. Kim, J. Choi, y J. Song.** 2012. Identification and characterization of a novel cold-adapted esterase from a metagenomic library of mountain soil. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **39**:681-689.
134. **Kolesarova, N., M. Hutnan, I. Bodik, y V. Spalkova.** 2011. Utilization of biodiesel by-products for biogas production. *J Biomed Biotechnol* **2011**:126798.
135. **Krebsfänger, N., K. Schierholz, y U. T. Bornscheuer.** 1998. Enantioselectivity of a recombinant esterase from *Pseudomonas fluorescens* towards alcohols and carboxylic acids. *Journal of Biotechnology* **60**:105-111.
136. **Krupa, S. V., y R. N. Kickert.** 1989. The Greenhouse effect: Impacts of ultraviolet-B (UV-B) radiation, carbon dioxide (CO₂), and ozone (O₃) on vegetation. *Environmental Pollution* **61**:263-393.
137. **Kuo, T. M., J. K. Huang, D. Labeda, L. Wen, y G. Knothe.** 2008. Production of 10-hydroxy-8(E)-octadecenoic acid from oleic acid conversion by strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Curr Microbiol* **57**:437-441.
138. **Kusdiana, D., y S. Saka.** 2004. Effects of water on biodiesel fuel production by supercritical methanol treatment. *Bioresour Technol* **91**:289-295.
139. **Lakay, F. M., A. Botha, y B. A. Prior.** 2007. Comparative analysis of environmental DNA extraction and purification methods from different humic acid-rich soils. *J Appl Microbiol* **102**:265-273.
140. **Larsen, M. W., U. T. Bornscheuer, y K. Hult.** 2008. Expression of *Candida antarctica* lipase B in *Pichia pastoris* and various *Escherichia coli* systems. *Protein Expression and Purification* **62**:90-97.
141. **Larue, R., Z. Yu, V. A. Parisi, A. R. Egan, y M. Morrison.** 2005. Novel microbial diversity adherent to plant biomass in the herbivore

- gastrointestinal tract, as revealed by ribosomal intergenic spacer analysis and rrs gene sequencing. *Environ Microbiol* **7**:530-543.
142. **LeClerc, G. R., A. Buchan, y J. T. Hollibaugh.** 2004. Chitinase gene sequences retrieved from diverse aquatic habitats reveal environment-specific distributions. *Appl Environ Microbiol* **70**:6977-6983.
 143. **Lee, M. H., K. S. Hong, S. Malhotra, J. H. Park, E. C. Hwang, H. K. Choi, Y. S. Kim, W. Tao, y S. W. Lee.** 2010. A new esterase EstD2 isolated from plant rhizosphere soil metagenome. *Applied Microbiology and Biotechnology* **88**:1125-1134.
 144. **Lee, M. H., C. H. Lee, T. K. Oh, J. K. Song, y J. H. Yoon.** 2006. Isolation and characterization of a novel lipase from a metagenomic library of tidal flat sediments: evidence for a new family of bacterial lipases. *Appl Environ Microbiol* **72**:7406-7409.
 145. **Lee, S. W., K. Won, H. K. Lim, J. C. Kim, G. J. Choi, y K. Y. Cho.** 2004. Screening for novel lipolytic enzymes from uncultured soil microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology* **65**:720-726.
 146. **Leggewie, C., H. Henning, C. Schmeisser, W. R. Streit, y K. E. Jaeger.** 2006. A novel transposon for functional expression of DNA libraries. *J Biotechnol* **123**:281-287.
 147. **Leresche, J. E., y H.-P. Meyer.** 2006. Chemocatalysis and Biocatalysis (Biotransformation): Some Thoughts of a Chemist and of a Biotechnologist. *Organic Process Research & Development* **10**:572-580.
 148. **Levinson, W. E., T. M. Kuo, y G. Knothe.** 2008. Characterization of fatty amides produced by lipase-catalyzed amidation of multi-hydroxylated fatty acids. *Bioresour Technol* **99**:2706-2709.
 149. **Li G, Wang K, y L. YH.** 2008 Molecular cloning and characterization of a novel pyrethroid-hydrolyzing esterase originating from the Metagenome. *Microb Cell Factories* **30**:7-38.
 150. **Li, G., Y. Jiang, X.-j. Fan, y Y.-h. Liu.** 2012. Molecular cloning and characterization of a novel β -glucosidase with high hydrolyzing ability for soybean isoflavone glycosides and glucose-tolerance from soil metagenomic library. *Bioresour Technol* **123**:15-22.
 151. **Li, Q., W. Du, y D. Liu.** 2008. Perspectives of microbial oils for biodiesel production. *Applied Microbiology and Biotechnology* **80**:749-756.
 152. **Li, Y., M. Wexler, D. J. Richardson, P. L. Bond, y A. W. Johnston.** 2005. Screening a wide host-range, waste-water metagenomic library in tryptophan auxotrophs of *Rhizobium leguminosarum* and of *Escherichia coli* reveals different classes of cloned trp genes. *Environ Microbiol* **7**:1927-1936.

153. **Liles, M. R., L. L. Williamson, J. Rodbumrer, V. Torsvik, R. M. Goodman, y J. Handelsman.** 2008. Recovery, purification, and cloning of high-molecular-weight DNA from soil microorganisms. *Appl Environ Microbiol* **74**:3302-3305.
154. **Liu, K., J. Wang, D. Bu, S. Zhao, C. McSweeney, P. Yu, y D. Li.** 2009. Isolation and biochemical characterization of two lipases from a metagenomic library of China Holstein cow rumen. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **385**:605-611.
155. **Liu, P., Y.-F. Wang, H. E. Ewis, A. T. Abdelal, C.-D. Lu, R. W. Harrison, y I. T. Weber.** 2004. Covalent Reaction Intermediate Revealed in Crystal Structure of the *Geobacillus stearothermophilus* Carboxylesterase Est30. *Journal of Molecular Biology* **342**:551-561.
156. **Liu, X., X. Piao, Y. Wang, y S. Zhu.** 2008. Calcium Ethoxide as a Solid Base Catalyst for the Transesterification of Soybean Oil to Biodiesel. *Energy & Fuels* **22**:1313-1317.
157. **Liu, Y.-Y., J.-H. Xu, y Y. Hu.** 2000. Enhancing effect of Tween-80 on lipase performance in enantioselective hydrolysis of ketoprofen ester. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **10**:523-529.
158. **Lorenz, P., K. Liebeton, F. Niehaus, y J. Eck.** 2002. Screening for novel enzymes for biocatalytic processes: accessing the metagenome as a resource of novel functional sequence space. *Curr Opin Biotechnol* **13**:572-577.
159. **Lorenz P., y E. J.** 2005. Metagenomics and industrial applications. *Nat Rev Microbiol.* **3**:510-516.
160. **Lotrakul, P., y S. Dharmsthiti.** 1997. Purification and characterization of lipase from *Aeromonas sobria* LP004. *J Biotechnol* **54**:113-120.
161. **Loveless, B. J., y M. H. Saier, Jr.** 1997. A novel family of channel-forming, autotransporting, bacterial virulence factors. *Mol Membr Biol* **14**:113-123.
162. **Lu, G., y E. N. Moriyama.** 2004. Vector NTI, a balanced all-in-one sequence analysis suite. *Briefings in bioinformatics* **5**:378-388.
163. **Ma, F., y M. A. Hanna.** 1999. Biodiesel production: a review. *Bioresour Technol* **70**:1-15.
164. **Martinez, J. P., N. W. Oesch, y L. M. Ciuffetti.** 2004. Characterization of the multiple-copy host-selective toxin gene, ToxB, in pathogenic and nonpathogenic isolates of *Pyrenophora tritici-repentis*. *Mol Plant Microbe Interact* **17**:467-474.

165. **Mata, T. M., A. A. Martins, y N. S. Caetano.** 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **14**:217-232.
166. **Meher, L. C., V. S. Dharmagadda, y S. N. Naik.** 2006. Optimization of alkali-catalyzed transesterification of *Pongamia pinnata* oil for production of biodiesel. *Bioresour Technol* **97**:1392-1397.
167. **Meilleur, C., J.-F. Hupé, P. Juteau, y F. Shareck.** 2009. Isolation and characterization of a new alkali-thermostable lipase cloned from a metagenomic library. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **36**:853-861.
168. **Mittelbach, M., y S. Schober.** 2003. The influence of antioxidants on the oxidation stability of biodiesel. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **80**:817-823.
169. **Morimoto, S., y T. Fujii.** 2009. A new approach to retrieve full lengths of functional genes from soil by PCR-DGGE and metagenome walking. *Applied Microbiology and Biotechnology* **83**:389-396.
170. **Moser, B.** 2009. Biodiesel production, properties, and feedstocks. In *Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* **45**:229-266.
171. **Mudhoo, A., T. Forster-Carneiro, y A. Sanchez.** 2011. Biohydrogen production and bioprocess enhancement: a review. *Crit Rev Biotechnol* **31**:250-263.
172. **Nacke, H., M. Engelhaupt, S. Brady, C. Fischer, J. Tautzt, y R. Daniel.** 2012. Identification and characterization of novel cellulolytic and hemicellulolytic genes and enzymes derived from German grassland soil metagenomes. *Biotechnol Lett* **34**:663-675.
173. **Nardini, M., y B. W. Dijkstra.** 1999. α/β Hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. *Current Opinion in Structural Biology* **9**:732-737.
174. **NCBI** 2012, posting date. ORF Finder (Open Reading Frame Finder). www.ncbi.nlm.nih.gov. [Online.]
175. **Nelson, L., T. Foglia, y W. Marmer.** 1996. Lipase-catalyzed production of biodiesel. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **73**:1191-1195.
176. **Nielsen, H., J. Engelbrecht, S. Brunak, y G. von Heijne.** 1997. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng* **10**:1-6.
177. **Nigam, P. S., y A. Singh.** 2011. Production of liquid biofuels from renewable resources. *Progress in Energy and Combustion Science* **37**:52-68.

178. **Norizzah, A. R., C. L. Chong, C. S. Cheow, y O. Zaliha.** 2004. Effects of chemical interesterification on physicochemical properties of palm stearin and palm kernel olein blends. *Food Chemistry* **86**:229-235.
179. **Noureddini, H., X. Gao, y R. S. Philkana.** 2005. Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil. *Bioresour Technol* **96**:769-777.
180. **Ollis, D. L., E. Cheah, M. Cygler, B. Dijkstra, F. Frolow, S. M. Franken, M. Harel, S. J. Remington, I. Silman, J. Schrag, y et al.** 1992. The alpha/beta hydrolase fold. *Protein Eng* **5**:197-211.
181. **Pace, N. R., G. J. Olsen, y C. R. Woese.** 1986. Ribosomal RNA phylogeny and the primary lines of evolutionary descent. *Cell* **45**:325-326.
182. **Park, I. H., S. H. Kim, Y. S. Lee, S. C. Lee, Y. Zhou, C. M. Kim, S. C. Ahn, y Y. L. Choi.** 2009. Gene cloning, purification, and characterization of a cold-adapted lipase produced by *Acinetobacter baumannii* BD5. *J Microbiol Biotechnol* **19**:128-135.
183. **Paustian, K.** 2005. Carbon emissions and sequestration, p. 175-180. *In* H. Editor-in-Chief: Daniel (ed.), *Encyclopedia of Soils in the Environment*. Elsevier, Oxford.
184. **Petersen, T. N., S. Brunak, G. von Heijne, y H. Nielsen.** 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature methods* **8**:785-786.
185. **Phuong, J., S. Kim, R. Thomas, y L. Zhang.** 2012. Predicted toxicity of the biofuel candidate 2,5-dimethylfuran in environmental and biological systems. *Environ Mol Mutagen* **53**:478-487.
186. **Piel, J., D. Hui, G. Wen, D. Butzke, M. Platzner, N. Fusetani, y S. Matsunaga.** 2004. Antitumor polyketide biosynthesis by an uncultivated bacterial symbiont of the marine sponge *Theonella swinhoei*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:16222-16227.
187. **Pohlenz, H.-D., W. Boidol, I. Schüttke, y W. R. Streber.** 1992. Purification and properties of an *Arthrobacter oxydans* P52 carbamate hydrolase specific for the herbicide phenmedipham and nucleotide sequence of the corresponding gene. *Journal of bacteriology* **174**:6600-6607.
188. **Pruitt, K. D., T. Tatusova, y D. R. Maglott.** 2005. NCBI Reference Sequence (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins. *Nucleic Acids Research* **33**:D501-D504.
189. **Purcarea, C., V. Simon, D. Prieur, y G. Hervé.** 1996. Purification and Characterization of Carbamoyl-Phosphate Synthetase from the Deep-

- Sea Hyperthermophilic *Archaeobacterium Pyrococcus abyssi*. European Journal of Biochemistry **236**:189-199.
190. **Ranjan, R., A. Grover, R. K. Kapardar, y R. Sharma.** 2005. Isolation of novel lipolytic genes from uncultured bacteria of pond water. Biochem Biophys Res Commun **335**:57-65.
 191. **Rashamuse, K., T. Ronneburg, F. Hennessy, D. Visser, E. Van Heerden, L. Piater, D. Litthauer, C. Möller, y D. Brady.** 2009. Discovery of a novel carboxylesterase through functional screening of a pre-enriched environmental library. Journal of Applied Microbiology **106**:1532-1539.
 192. **Rashid, N., Y. Shimada, S. Ezaki, H. Atomi, y T. Imanaka.** 2001. Low-temperature lipase from psychrotrophic *Pseudomonas* sp. strain KB700A. Appl Environ Microbiol **67**:4064-4069.
 193. **Rehm, S., P. Trodler, y J. Pleiss.** 2010. Solvent-induced lid opening in lipases: a molecular dynamics study. Protein Sci **19**:2122-2130.
 194. **Reyes-Duarte, D., M. Ferrer, y H. Garcia-Arellano.** 2012. Functional-based screening methods for lipases, esterases, and phospholipases in metagenomic libraries. Methods Mol Biol **861**:101-113.
 195. **Rhee, J. K., D. G. Ahn, Y. G. Kim, y J. W. Oh.** 2005. New thermophilic and thermostable esterase with sequence similarity to the hormone-sensitive lipase family, cloned from a metagenomic library. Appl Environ Microbiol **71**:817-825.
 196. **Riggs, P.** 2001. Expression and Purification of Maltose-Binding Protein Fusions, Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, Inc.
 197. **Rocco, M. A., D. Waraho-Zhmeyev, y M. P. DeLisa.** 2012. Twin-arginine translocase mutations that suppress folding quality control and permit export of misfolded substrate proteins. Proceedings of the National Academy of Sciences **109**:13392-13397.
 198. **Rodolfi, L., G. Chini Zittelli, N. Bassi, G. Padovani, N. Biondi, G. Bonini, y M. R. Tredici.** 2009. Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. Biotechnol Bioeng **102**:100-112.
 199. **Rondon M. R., August P. R., Bettermann A. D., Brady S. F., Grossman T. H., Liles M. R., Loiacono K. A., Lynch B. A., MacNeil I. A., Minor C., Tiong C. L., Gilman M., Osburne M. S., Clardy J., Handelsman J., y G. R. M.** 2000. Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. Appl. Environ. Microbiol. **66**:2541-2547.

200. **Rondon, M. R., P. R. August, A. D. Bettermann, S. F. Brady, T. H. Grossman, M. R. Liles, K. A. Loiacono, B. A. Lynch, I. A. MacNeil, C. Minor, C. L. Tiong, M. Gilman, M. S. Osburne, J. Clardy, J. Handelsman, y R. M. Goodman.** 2000. Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Appl Environ Microbiol* **66**:2541-2547.
201. **Rosenau, F., y K. Jaeger.** 2000. Bacterial lipases from *Pseudomonas*: regulation of gene expression and mechanisms of secretion. *Biochemistry* **82**:1023-1032.
202. **Samad, M. Y. A., C. N. A. Razak, A. B. Salleh, W. M. Zin Wan Yunus, K. Ampon, y M. Basri.** 1989. A plate assay for primary screening of lipase activity. *Journal of Microbiological Methods* **9**:51-56.
203. **Sambrook, J., y D. W. Russell.** 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. Volume 1-3. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
204. **Sambrook, J. F.** 1989. Molecular cloning, a laboratory manual, J. Sambrook, EF Fritsch, T. Maniatis, vol. 3. Cold Spring Harbor Laboratory.
205. **Sarkar, N., S. K. Ghosh, S. Bannerjee, y K. Aikat.** 2012. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. *Renewable Energy* **37**:19-27.
206. **Schenk, P., S. Thomas-Hall, E. Stephens, U. Marx, J. Mussnug, C. Posten, O. Kruse, y B. Hankamer.** 2008. Second Generation Biofuels: High-Efficiency Microalgae for Biodiesel Production. *BioEnergy Research* **1**:20-43.
207. **Scherer, M., S. Oliveira, S. Lima, L. Andrade, y A. Caires.** 2011. Determination of the Biodiesel Content in Diesel/Biodiesel Blends: A Method Based on Fluorescence Spectroscopy. *Journal of Fluorescence* **21**:1027-1031.
208. **Schirmer, A., R. Gadkari, C. D. Reeves, F. Ibrahim, E. F. DeLong, y C. R. Hutchinson.** 2005. Metagenomic Analysis Reveals Diverse Polyketide Synthase Gene Clusters in Microorganisms Associated with the Marine Sponge *Discodermia dissoluta*. *Appl Environ Microbiol* **71**:4840-4849.
209. **Schmeisser, C., C. Stöckigt, C. Raasch, J. Wingender, K. N. Timmis, D. F. Wenderoth, H.-C. Flemming, H. Liesegang, R. A. Schmitz, K.-E. Jaeger, y W. R. Streit.** 2003. Metagenome Survey of Biofilms in Drinking-Water Networks. *Appl Environ Microbiol* **69**:7298-7309.
210. **Schmid A., Dordick J. S. , Hauer B., Kiener A. , Wubbolts M., y W. B.** 2001. Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature* **409**:258-268

211. **Sern, C. H., C. Y. May, Z. Zakaria, R. Daik, y C. S. Foon.** 2007. The effect of polymers and surfactants on the pour point of palm oil methyl esters. *European Journal of Lipid Science and Technology* **109**:440-444.
212. **Sharma, S., F. Khan, y G. Qazi.** 2010. Molecular cloning and characterization of amylase from soil metagenomic library derived from Northwestern Himalayas. *Applied Microbiology and Biotechnology* **86**:1821-1828.
213. **Shibatani, T., K. Omori, H. Akatsuka, E. Kawai, y H. Matsumae.** 2000. Enzymatic resolution of diltiazem intermediate by *Serratia marcescens* lipase: molecular mechanism of lipase secretion and its industrial application. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **10**:141-149.
214. **Shimada, Y., Y. Watanabe, T. Samukawa, A. Sugihara, H. Noda, H. Fukuda, y Y. Tominaga.** 1999. Conversion of vegetable oil to biodiesel using immobilized *Candida antarctica* lipase. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **76**:789-793.
215. **Singh, J., A. Behal, N. Singla, A. Joshi, N. Birbian, S. Singh, V. Bali, y N. Batra.** 2009. Metagenomics: Concept, methodology, ecological inference and recent advances. *Biotechnol J* **4**:480-494.
216. **Smith, K. A.** 2005. Green house gas emissions p. 145-153. *In* H. Editor-in-Chief: Daniel (ed.), *Encyclopedia of Soils in the Environment*. Elsevier, Oxford.
217. **Sogin, M. L., H. G. Morrison, J. A. Huber, D. Mark Welch, S. M. Huse, P. R. Neal, J. M. Arrieta, y G. J. Herndl.** 2006. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere". *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:12115-12120.
218. **Solbak, A., T. Richardson, R. McCann, K. Kline, F. Bartnek, G. Tomlinson, P.-G. L. Tan X, G. Frey, y M. Podar.** 2005. Discovery of pectin-degrading enzymes and directed evolution of a novel pectate lyase for processing cotton fabric. *J Biol Chem* **280**:9431-9438.
219. **Song, D., L. Hou, y D. Shi.** 2008. [Exploitation and utilization of rich lipids-microalgae, as new lipids feedstock for biodiesel production--a review]. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* **24**:341-348.
220. **Song, J. S., J. H. Jeon, J. H. Lee, S. H. Jeong, B. C. Jeong, S. J. Kim, y S. H. Lee.** 2005. Molecular characterization of TEM-type beta-lactamases identified in cold-seep sediments of Edison Seamount (south of Lihir Island, Papua New Guinea). *J Microbiol* **43**:172-178.
221. **Soriano Jr, N. U., V. P. Migo, y M. Matsumura.** 2006. Ozonized vegetable oil as pour point depressant for neat biodiesel. *Fuel* **85**:25-31.

222. **Soriano, N. U., V. P. Migo, K. Sato, y M. Matsumura.** 2005. Crystallization behavior of neat biodiesel and biodiesel treated with ozonized vegetable oil. *European Journal of Lipid Science and Technology* **107**:689-696.
223. **Srivastava, A., y R. Prasad.** 2000. Triglycerides-based diesel fuels. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **4**:111-133.
224. **Steele, H. L., K. E. Jaeger, R. Daniel, y W. R. Streit.** 2009. Advances in recovery of novel biocatalysts from metagenomes. *J Mol Microbiol Biotechnol* **16**:25-37.
225. **Stein, J. L., T. L. Marsh, K. Y. Wu, H. Shizuya, y E. F. DeLong.** 1996. Characterization of uncultivated prokaryotes: isolation and analysis of a 40-kilobase-pair genome fragment from a planktonic marine archaeon. *J Bacteriol* **178**:591-599.
226. **Straathof, A. J. J., S. Panke, y A. Schmid.** 2002. The production of fine chemicals by biotransformations. *Curr Opin Biotechnol* **13**:548-556.
227. **Stuhrmann, M., H. C. Hennies, I. A. Bukhari, K. Brakensiek, G. Nurnberg, C. Becker, J. Huebener, M. C. Miranda, H. Frye-Boukhriss, S. Knothe, J. Schmidtke, y E. H. El-Harith.** 2008. Dyschromatosis universalis hereditaria: evidence for autosomal recessive inheritance and identification of a new locus on chromosome 12q21-q23. *Clin Genet* **73**:566-572.
228. **Suzuki, T., T. Nakayama, D. W. Choo, Y. Hirano, T. Kurihara, T. Nishino, y N. Esaki.** 2003. Cloning, heterologous expression, renaturation, and characterization of a cold-adapted esterase with unique primary structure from a psychrotroph *Pseudomonas* sp. strain B11-1. *Protein Expression and Purification* **30**:171-178.
229. **Synowiecki, J., B. Grzybowska, y A. Zdziełło.** 2006. Sources, Properties and Suitability of New Thermostable Enzymes in Food Processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **46**:197-205.
230. **Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, y K. S. .** 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*.(submitted).
231. **Tang, K., T. Utairungsee, P. Kanokratana, R. Sriprang, V. Champreda, L. Eurwilaichitr, y S. Tanapongpipat.** 2006. Characterization of a novel cyclomaltodextrinase expressed from environmental DNA isolated from Bor Khleung hot spring in Thailand. *FEMS Microbiol Lett* **260**:91-99.

232. **Thompson, J. D., D. G. Higgins, y T. J. Gibson.** 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**:4673-4680.
233. **Tjalsma, H., A. Bolhuis, J. D. Jongbloed, S. Bron, y J. M. van Dijk.** 2000. Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**:515-547.
234. **Torsvik, V., J. Goksøyr, y F. L. Daae.** 1990. High diversity in DNA of soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **56**:782-787.
235. **Torsvik, V. L.** 1980. Isolation of bacterial DNA from soil. *Soil Biology and Biochemistry* **12**:15-21.
236. **Vasudevan, P. T., y M. Briggs.** 2008. Biodiesel production--current state of the art and challenges. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **35**:421-430.
237. **Venter, J. C., K. Remington, J. F. Heidelberg, A. L. Halpern, D. Rusch, J. A. Eisen, D. Wu, I. Paulsen, K. E. Nelson, W. Nelson, D. E. Fouts, S. Levy, A. H. Knap, M. W. Lomas, K. Nealson, O. White, J. Peterson, J. Hoffman, R. Parsons, H. Baden-Tillson, C. Pfannkoch, Y. H. Rogers, y H. O. Smith.** 2004. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science* **304**:66-74.
238. **Voget, S., C. Leggewie, A. Uesbeck, C. Raasch, K. E. Jaeger, y W. R. Streit.** 2003. Prospecting for novel biocatalysts in a soil metagenome. *Appl Environ Microbiol* **69**:6235-6242.
239. **Voget, S., H. L. Steele, y W. R. Streit.** 2006. Characterization of a metagenome-derived halotolerant cellulase. *J Biotechnol* **126**:26-36.
240. **Wang, G.** 2006. Diversity and biotechnological potential of the sponge-associated microbial consortia. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **33**:545-551.
241. **Wang, G. Y., E. Graziani, B. Waters, W. Pan, X. Li, J. McDermott, G. Meurer, G. Saxena, R. J. Andersen, y J. Davies.** 2000. Novel natural products from soil DNA libraries in a streptomycete host. *Org Lett* **2**:2401-2404.
242. **Wexler, M., P. L. Bond, D. J. Richardson, y A. W. Johnston.** 2005. A wide host-range metagenomic library from a waste water treatment plant yields a novel alcohol/aldehyde dehydrogenase. *Environ Microbiol* **7**:1917-1926.
243. **Wheeler, D. L., D. M. Church, S. Federhen, A. E. Lash, T. L. Madden, J. U. Pontius, G. D. Schuler, L. M. Schriml, E. Sequeira, y T. A. Tatusova.**

2003. Database resources of the National Center for Biotechnology. *Nucleic Acids Research* **31**:28-33.
244. **Will, C., A. Thurmer, A. Wollherr, H. Nacke, N. Herold, M. Schrumpf, J. Gutknecht, T. Wubet, F. Buscot, y R. Daniel.** 2010. Horizon-specific bacterial community composition of German grassland soils, as revealed by pyrosequencing-based analysis of 16S rRNA genes. *Appl Environ Microbiol* **76**:6751-6759.
245. **Wingfield, P. T., I. Palmer, y S.-M. Liang.** 2001. Folding and Purification of Insoluble (Inclusion Body) Proteins from *Escherichia coli*, Current Protocols in Protein Science. John Wiley & Sons, Inc.
246. **Woese, C. R.** 1987. Bacterial evolution. *Microbiol Rev* **51**:221-271.
247. **Woese, C. R., y G. E. Fox.** 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**:5088-5090.
248. **Wolff, R. L., W. W. Christie, F. Pedrono, A. M. Marpeau, N. Tsevegsuren, K. Aitzetmuller, y F. D. Gunstone.** 1999. Delta5-olefinic acids in the seed lipids from four Ephedra species and their distribution between the alpha and beta positions of triacylglycerols. Characteristics common to coniferophytes and cycadophytes. *Lipids* **34**:855-864.
249. **Woodcock, D. M., P. J. Crowther, J. Doherty, S. Jefferson, E. DeCruz, M. Noyer-Weidner, S. S. Smith, M. Z. Michael, y M. W. Graham.** 1989. Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Research* **17**:3469-3478.
250. **Wuebbles, D. J.** 2001. Atmospheric Gases, p. 293-305. *In* A. L. Editor-in-Chief: Simon (ed.), *Encyclopedia of Biodiversity*. Elsevier, New York.
251. **Yin, C.** 2012. Microwave-assisted pyrolysis of biomass for liquid biofuels production. *Bioresour Technol* **120**:273-284.
252. **Yun, J., S. Kang, S. Park, H. Yoon, M. J. Kim, S. Heu, y S. Ryu.** 2004. Characterization of a novel amylolytic enzyme encoded by a gene from a soil-derived metagenomic library. *Appl Environ Microbiol* **70**:7229-7235.
253. **Zhang, Y., M. A. Dube, D. D. McLean, y M. Kates.** 2003. Biodiesel production from waste cooking oil: 1. Process design and technological assessment. *Bioresour Technol* **89**:1-16.
254. **Zhang, Y., J. Zhao, y R. Zeng.** 2011. Expression and characterization of a novel mesophilic protease from metagenomic library derived from Antarctic coastal sediment. *Extremophiles* **15**:23-29.

255. **Zhou, W., y D. Boocock.** 2006. Phase distributions of alcohol, glycerol, and catalyst in the transesterification of soybean oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **83**:1047-1052.
256. **Zock, J., C. Cantwell, J. Swartling, R. Hodges, T. Pohl, K. Sutton, P. Rosteck Jr, D. McGilvray, y S. Queener.** 1994. The *Bacillus subtilis* pnbA gene encoding p-nitrobenzyl esterase: cloning, sequence and high-level expression in *Escherichia coli*. *Gene* **151**:37-43.