



CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A.C.

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DE GENES DE LIPASA NOVEDOSOS IDENTIFICADOS  
POR ESCRUTINIO FUNCIONAL EN UNA BIBLIOTECA METAGENÓMICA DEL  
ACUÍFERO DE YUCATÁN**

TESIS QUE PRESENTA

CASTRO AVILÉS JAIME

EN OPCIÓN AL TÍTULO DE

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

OPCIÓN BIOTECNOLOGÍA

MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO

2016



*CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.*  
*POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS*



Por medio de la presente hago constar que el trabajo de tesis de **Jaime Castro Avilés**, titulado “Clonación y expresión de genes de lipasa novedosos identificados por escrutinio funcional en una biblioteca metagenómica del acuífero de Yucatán”, fue realizado en los laboratorios de Microbiología Microbiana y Metagenómica de la Unidad de Biotecnología, del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., en la línea de Agrobiotecnología, bajo la dirección de la Dra. Blondy Beatriz Canto Canché y la Dra. Aileen O’connor Sánchez, dentro de la opción de Biotecnología, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Esta tesis tiene orientación al desarrollo socioeconómico de la región porque está orientada hacia la economía basada en conocimiento.

Atentamente:

---

Dr. Manuel Martínez Estévez  
Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 11 Noviembre de 2016



## DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que á razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma: \_\_\_\_\_



Nombre: JAIME CASTRO AVILÉS



Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte del proyecto titulado “CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DE GENES DE LIPASA NOVEDOSOS IDENTIFICADOS POR ESCRUTINIO FUNCIONAL EN UNA BIBLIOTECA METAGENÓMICA DEL ACUÍFERO DE YUCATÁN” bajo la dirección de la Dra. Blondy Beatriz Canto Canché y la Dra. Ingrid Aileen O’Connor Sánchez.



## **AGRADECIMIENTOS**

El presente trabajo se desarrolló en el centro de investigación científica de Yucatán (CICY) en las instalaciones de la unidad de Biotecnología. Fue parcialmente financiado por el FOMIX-YUCATÁN proyecto 165026, "Aprovechamiento sustentable del Acuífero de Yucatán mediante tecnología para la búsqueda de productos biotecnológicos con potencial de alto impacto económico". Se agradece el apoyo de la beca otorgada (550449/300744) por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) durante mis 2 años de maestría. También se agradece el apoyo económico otorgado tanto por el FOMIX-YUCATÁN, como por la beca de movilidad asignada por el departamento de posgrado en Ciencias Biológicas de CICY para asistir al 9° Encuentro Nacional de Biotecnología del IPN, llevado a cabo en Atlihuetzia Tlaxcala, México, del 13-16 de octubre del 2014.

A mis Directoras de tesis la Dra. Blondy Beatriz Canto Canché y Dra. Ingrid Aileen O'Connor Sánchez por su paciencia, tiempo y dedicación en el asesoramiento del proyecto en cuestión para la obtención del grado de maestría en ciencias biológicas. También agradezco el tiempo que invirtieron en mi desarrollo personal con sus consejos.

Se agradece a los Maestros en ciencias biológicas Miguel Tzec, Bartolomé Chi Manzanero por el apoyo técnico y administrativo durante el transcurso del proyecto de tesis de posgrado. Así mismo se da gracias al apoyo incondicional del Doctor en ciencias biológicas Cesar de los Santos Briones quien además de cumplir con su asistencia técnica aportó conocimiento y apoyo moral durante mi formación académica.

Se agradece al M.C. Max Mizraim Apolinar, al M.C Miguel Marfil Santana y al Dr. Ernesto Pérez Rueda por fortalecer el desarrollo del proyecto con programas informáticos indispensables para los análisis *in silico* y también por sus aportaciones académicas que agilizaron de manera significativa cada estudio.

Al Ing. Sergio Ramos Jiménez, a la Dra. Elda Isaura España y al M.C Miguel Ángel Canseco Pérez por su apoyo moral e invaluable amistad durante todo el proceso de formación.

Al CONACYT por la beca otorgada, a los doctores que formaron parte del comité tutorial y que sustentaron este trabajo con sus valiosos aportes: la Dra. Alejandra Prieto Davó, el Dr.

Luis Alfonso Saenz Carbonell y principalmente a mis asesoras de tesis la Dra. Blondy Beatriz Canto Canché y la Dra. Ingrid Aileen O'Connor Sánchez.

Me siento orgulloso de haber trabajado a lado de mi grupo de amigos de laboratorio siempre dispuestos a apoyarnos los unos a los otros, para nuestro crecimiento personal y profesional: Yamili Burgos, Abraham Obrador, Sergio Ramos Jiménez, Miguel Ángel Canseco Pérez, Elda Isaura España, Helio Lauri, Miguel Marfil Santana, Miguel Tzec, Inés Arana Guevara, María José García, Leonor Vela Luna, Daniela Torres.

## **DEDICATORIAS**

DEDICO DE TODO CORAZÓN, MI TRABAJO DE TESIS A MIS PADRES Y HERMANOS QUE A PESAR DE ENCONTRARSE LEJOS DE MI, NUNCA ME DEJARON CAER Y SIEMPRE ESTUVIERON EN MIS MOMENTOS MAS DIFÍCILES, DÁNDOME EL APOYO MORAL Y ECONÓMICO EN ESTA NUEVA ETAPA DE MI VIDA. JAMAS PODRÉ REEMPLAZAR LA VIDA TAN MARAVILLOSA QUE HE TENIDO A SU LADO. AGRADEZCO A MI PADRE POR TRANSMITIRME SU ESPIRITU CREATIVO Y EMPRENDEDOR. A MI MADRE POR ACOMPAÑARME TODA LA VIDA Y ENSEÑARME A PERSEVERAR AÚN EN LOS MOMENTOS MÁS DIFÍCILES.



---

## ÍNDICE

CAPÍTULO I.....	1
CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DE GENES DE LIPASAS PROVENIENTES DE UNA BIBLIOTECA METAGENÓMICA DEL ACUÍFERO DE YUCATÁN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES .....	3
1.1 MICROORGANISMOS Y ENZIMAS.....	3
1.2 ENZIMAS LIPOLÍTICAS.....	4
1.3 TRIGLICÉRIDOS.....	4
1.4 LIPASAS.....	7
1.5 CARACTERÍSTICAS DE LAS LIPASAS.....	7
1.6 MECANISMO DE CATÁLISIS DE LAS LIPASAS.....	8
1.7 METAGENÓMICA.....	9
1.8 ACUÍFERO DE YUCATÁN.....	12
1.9 APORTACIONES A LOS ESTUDIOS DE LIPASAS.....	14
1.9.1 ANTECEDENTES DE ESTUDIO DE METAGENÓMICA EN YUCATÁN.....	21
OBJETIVO GENERAL.....	23
OBJETIVOS ESPECÍFICOS. ....	23
JUSTIFICACIÓN.....	24
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	27

---

<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>29</b>
<b>DETECCIÓN DE CLONAS METAGENÓMICAS CON ACTIVIDAD DE LIPASAS.....</b>	<b>29</b>
<b>2.1 INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>29</b>
<b>2.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>29</b>
<b>2.2.1 ESCRUTINIO EN MEDIOS SELECTIVOS.....</b>	<b>29</b>
<b>2.2.2 PURIFICACIÓN DE ADN.....</b>	<b>30</b>
<b>2.2.3 DIGESTIÓN CON DE FÓSMIDOS CON <i>Bam</i>HI.....</b>	<b>30</b>
<b>2.2.4 SECUENCIACIÓN DE FÓSMIDOS.....</b>	<b>30</b>
<b>2.3 RESULTADOS.....</b>	<b>31</b>
<b>2.3.1 CLONAS CON ACTIVIDAD LIPOLÍTICA.....</b>	<b>31</b>
<b>2.3.2 PURIFICACIÓN DE FÓSMIDOS POSITIVOS EN MEDIO FUNCIONAL.....</b>	<b>32</b>
<b>2.3.3 DIGESTIÓN DE FÓSMIDOS CON <i>Bam</i>HI.....</b>	<b>34</b>
<b>2.3.4 SECUENCIACIÓN DE LOS FÓSMIDOS.....</b>	<b>34</b>
<b>2.4 DISCUSIÓN.....</b>	<b>35</b>
<b>CAPÍTULO III.....</b>	<b>39</b>
<b>ANÁLISIS <i>in silico</i> DE LOS FÓSMIDOS DE LAS CLONAS POSITIVAS METAGENÓMICAS DEL ACUÍFERO DE YUCATÁN.....</b>	<b>39</b>
<b>3.1 INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>39</b>
<b>3.2 MATERIALES Y MÉTODOS. ....</b>	<b>40</b>
<b>3.2.1 ANÁLISIS EN VECSCREEN DE NCBI.....</b>	<b>40</b>
<b>3.2.2 REVISIÓN DE SECUENCIAS CRUDAS EN WEBCUTTER 2.0.....</b>	<b>40</b>

---

3.2.3 ANÁLISIS DE ORFs EN ORFINDER Y BLAST-X EN NCBI.....	41
3.2.4 ELABORACIÓN DE BASES DE DATOS DE LIPASA.....	41
3.2.5 ANÁLISIS DE ORFs EN GLIMMER.....	41
3.2.6 BÚSQUEDA DE DOMINIOS DE LIPASAS CON HMMs.....	42
3.3 RESULTADOS.....	43
3.3.1 ANÁLISIS BLAST-X DE LOS CONTIGS.....	43
3.3.2 ANÁLISIS <i>perfectBLAST</i> DE LOS CONTIGS.....	43
3.3.3 DIGESTIÓN <i>in silico</i> DE LOS CONTIGS.....	43
3.3.4 ANÁLISIS DE LOS CONTIGS EN GLIMMER DE GENIOUS PROT 5.4.7.....	44
3.4.5 BÚSQUEDA DE DOMINIOS DE LIPASAS CON HMMs.....	48
3.4 DISCUSIÓN.....	51
CAPÍTULO IV.....	53
SUB-CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DE GENES DE LIPASAS DEL METAGENOMA DEL ACUÍFERO DE YUCATÁN.....	53
4.1 INTRODUCCIÓN.....	53
4.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	57
4.2.1 ELABORACIÓN DE OLIGONUCLEÓTIDOS.....	57
4.2.2 SUB-CLONACIÓN <i>in silico</i> .....	59
4.2.3 AMPLIFICACIÓN POR PCR DE FÓSMIDO.....	59
4.2.4 PURIFICACIÓN DE ADN EN GEL DE ELECTROFORESIS.....	59
4.2.5 AMPLIFICACIÓN POR PCR DE POOLS DE FÓSMIDOS.....	59

---

4.2.6 SUB-CLONACIÓN Y SECUENCIACIÓN.....	60
4.2.7 SUB-CLONACIÓN Y SECUENCIACIÓN.....	61
4.2.8 TRANSFORMACIÓN Y SOBRE-EXPRESIÓN EN CÉLULAS DE BL21 (DE3).....	61
4.2.9 LISIS CELULAR.....	61
4.2.10 ENSAYO DE ACTIVIDAD LIPASA.....	61
4.2.11 ANÁLISIS DE SECUENCIA Y ESTUDIO FILOGENÉTICO DE <i>LipJ4</i> .....	62
4.2.12 ESPECIFICIDAD DE SUSTRATOS.....	62
4.3 RESULTADOS.....	62
4.3.1 SUB-CLONACIÓN <i>in silico</i> DE LOS ORFs DE LIPASAS E HIDROLASAS.....	62
4.3.2 AMPLIFICACION POR PCR EN EL FÓSMIDO 7 Y POOLS DE FÓSMIDOS.....	70
4.3.3 SUB-CLONACIÓN DE LOS ORFs EN CÉLULAS TOP10.....	71
4.3.4 SUB-CLONACIÓN DE LOS ORFs EN CÉLULAS DE BL21 (DE3).....	71
4.3.5 SOBRE-EXPRESIÓN DE LOS GENES DE LIPASA.....	74
4.3.6 ANÁLISIS <i>in silico</i> DE <i>LipJ4</i> .....	75
4.3.7 ANÁLISIS DE SUSTRATO DE <i>LipJ4-ChapJ4</i> CON P-NITROFENIL ÉSTERES.....	83
4.4 DISCUSIÓN.....	84
CAPÍTULO V.....	91
CONCLUSIONES Y PERPECTIVAS.....	91
5.1 CONCLUSIONES.....	91
3.2 PERSPECTIVAS.....	92

---

<b>5.3 ANEXOS.....</b>	<b>93</b>
<b>5.3.1 ANÁLISIS DE LOS CONTIGS 6,10 Y 14 CON EL PROGRAMA GENEIOUS PROT 5.4.7.....</b>	<b>93</b>
<b>5.3.2 CLONAS DE BL21 INDUCIDAS CON IPTG.....</b>	<b>94</b>
<b>5.3.3 ESTRUCTURA SECUNDARIA DE <i>LipJ4</i>.....</b>	<b>95</b>
<b>5.3.4 PRUEBA COLORIMÉTRICA DE P-NITROFENIL PALMITATO <i>LipJ4</i> Y <i>ChapJ4</i>....</b>	<b>96</b>
<b>5.3.5 DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS DE LOS ANÁLISIS <i>in silico</i>.....</b>	<b>97</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>103</b>

---

## LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1 Lipólisis.....	5
Figura 1.2 Estructura secundaria de lipasas.....	8
Figura 1.3 Reacción catalítica del sitio activo en lipasas.....	9
Figura 1.4 Construcción de bibliotecas metagenómicas.....	11
Figura 1.5 Árbol filogenético de lipasas/esterasas derivado de las secuencias de 40 metagenomas reportadas.....	17
Figura 1.6 Alineamiento múltiple de <i>LipA</i> de <i>Pseudomonas</i> sp. SW-3 (P. SW-3).....	19
Figura 1.7 Estructura 3D de la lipasa predicha de <i>P. mirabilis</i> (PML).....	21
Figura 1.8 Fósrido empleado en la construcción de la biblioteca metagenómica del Acuífero de Yucatán.....	22
Figura 1.9 Construcción de la biblioteca metagenómica.....	22
Figura 2.1 Controles, negativo y positivo para la detección de lipasas en medio de Rodamina B y aceite de olivo.....	31
Figura 2.2 Clonas metagenómicas con posible actividad lipolítica evaluadas sobre medio LB con Rodamina B y aceite de olivo.....	32
Figura 2.3 Resultado de electroforesis de los fósridos aislados de las clonas metagenómicas positivas (6,7, 10 y 14).....	34
Figura 2.4 Digestión realizada con la enzima <i>Bam</i> HI de los fósridos aislados de las clonas metagenómicas 6, 7,10 y 14.....	34
Figura 3.1 Análisis del contig 7 en el programa Geneious 5.4.7.....	45
Figura 3.2 Análisis del contig 40 en el programa Geneious 5.4.7.....	46

---

Figura 3.3 Análisis del contig 99 en el programa Geneious 5.4.7.....	47
Figura 4.1 Estructura de los vectores pLATE.....	56
Figura 4.2 Mapa esquemático mostrando la localización de 1 ( <i>HidJ1</i> ).....	63
Figura 4.3 Mapa esquemático mostrando la localización de 1 ( <i>HidJ2</i> ).....	64
Figura 4.4 Mapa esquemático mostrando la localización de 1 ( <i>LipJ1</i> ).....	65
Figura 4.5 Mapa esquemático mostrando la localización de 1 ( <i>LipJ2</i> ).....	66
Figura 4.6 Mapa esquemático mostrando la localización de 1 ( <i>LipJ3</i> ).....	67
Figura 4.7 Mapa esquemático mostrando la localización de 1 ( <i>LipJ4</i> ).....	68
Figura 4.8 Mapa esquemático mostrando la localización de 1 ( <i>ChapJ4</i> ).....	69
Figura 4.9 Mapa esquemático mostrando la localización de 1 ( <i>LipJ4-ChapJ4</i> ).....	70
Figura 4.10 Gel mostrando los fragmentos amplificados de las hidrolasas <i>HidJ1</i> e <i>HidJ2</i> en BL21 (DE3).....	71
Figura 4.11 Gel mostrando los fragmentos amplificados de los insertos de <i>LipJ1</i> , <i>LipJ2</i> y <i>LipJ3</i> en células de BL21 (DE3).....	72
Figura 4.12 Gel mostrando los fragmentos amplificados de <i>LipJ4</i> y <i>ChapJ4</i> en BL21 (DE3).....	73
Figura 4.13 Resultado de la amplificación del complejo <i>LipJ4-ChapJ4</i> en BL21 (DE3).....	74
Figura 4.14 Esquema mostrando el ensayo de actividad en papel filtro sobre medio de Rodamina B y aceite de olivo.....	75
Figura 4.15 Estructura $\alpha/\beta$ hidrolasa de <i>LipJ4</i> .....	76
Figura 4.16 Estructura 3D de la triada catalítica de <i>LipJ4</i> .....	77

---

Figura 4.17 Estructura 3D de <i>LipJ4</i> que muestra el sitio de unión del sustrato con el sitio activo.....	78
Figura 4.18 Árbol filogenético de <i>LipJ4</i> con las VIII familias de lipasas por NJ.....	79
Figura 4.19 Análisis filogenético ML de <i>LipJ4</i> y la Familia I de lipasas.....	81
Figura 4. 20 Alineamiento de <i>LipJ4</i> con la Sub-familial.1 y I.2 de lipasas.....	82
Figura 4.21 Preferencia de sustratos de <i>LipJ4-ChapJ4</i> .....	84
Figura 5.1 Genes presentes en el contig de la clona 6 con el programa Geneious 5.4.7.....	93
Figura 5.2 Genes presentes en el contig de la clona 10 con el programa Geneious 5.4.7.....	94
Figura 5.3 Genes presentes en el contig de la clona 14 con el programa Geneious 5.4.7.....	94
Figura 5.4 Clonas BL21 inducidas con IPTG sobre medios de Rodamina B y aceite de olivo.....	95
Figura 5.5 Estructura $\alpha/\beta$ hidrolasa de <i>LipJ4</i> en Phyre2.....	96
Figura 5.6 Prueba colorimétrica de p-nitrofenil palmitato a <i>LipJ4</i> y <i>LipJ4-ChapJ4</i> .....	97

---

## LISTADO DE CUADROS

Cuadro 1.1 Sustratos utilizados para la inducción de lipasas.....	6
Cuadro 1.2 Clasificación de las familias de lipasas/esterasas bacterianas propuestas por Arpigny y Jaeger.....	14
Cuadro 2.1 Purificación de ADN de las clonas metagenómicas positivas en el escrutinio de lipasas.....	32
Cuadro 2.2 Parámetros de purificación para la secuenciación de los fósmidos 6, 7, 10 y 14.....	35
Cuadro 3.1 Tamaño de cada contig por clona.....	43
Cuadro 3.2 Digestión <i>in silico</i> de los 4 fósmidos recombinantes.....	44
Cuadro 3.3 Características de los ORFs analizados en los programas BLAST-x, SignalP 4.0 y TMHMM 2.0.....	47
Cuadro 3.4 Resultados del análisis en Pfam 27.0 de los contigs (7,40 y99).....	48
Cuadro 3.5 Análisis de ORFs con Superfamily 1.75.....	50
Cuadro 4.1 Características de los vectores pLATE 11,31 y 52.....	54
Cuadro 4.2 Oligonucleótidos con adaptadores para la sub-clonación en los vectores de pLATE 11, 31 y 52.....	57
Cuadro 5.1 Secuencias de lipasas, utilizadas para los análisis <i>in silico</i> de <i>LipJ4</i> .....	97

<b>ABREVIATURAS</b>	
Amp	Ampere
CFU	Unidades formadoras de colonias
Fos	Fósmido
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido
D.O.	Densidad óptica
ML	Maximun-Likelihood
mL	Mililitro
MO	Microorganismo
MOs	Microorganismos
ng	Nanogramo
NJ	Neighbor-Joining
ORF	Marco de lectura abierto
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Rpm	Revoluciones por minuto
$\mu$ L	Microlitro
BACs	Cromosomas Artificiales Bacterianos
USD	Dólares
Vol	Volumen
Volt	Voltio

---



---

## RESUMEN

Las lipasas representan un grupo de enzimas muy importante para la investigación y el desarrollo en varias industrias biotecnológicas. En el CICY, se construyó una biblioteca metagenómica del Acuífero de Yucatán, usando insertos de gran tamaño clonados en fósmidos. En el presente trabajo, se encontraron cuatro clonas de esta biblioteca metagenómica mediante escrutinio funcional de actividad lipolítica extracelular, y se llevaron a cabo análisis bioinformáticos de los contigs contenidos en ellas. En el ADN exógeno de una de estas clonas, se identificó un gen que, de acuerdo con el análisis BLAST-x, tiene como homólogo más cercano, una lipasa lactonizante de *Acidovorax* sp. KKS102, al cual se denominó *LipJ4*, y otro, al que se nombró *ChapJ4*, que tiene como homólogo más cercano una chaperona también de *Acidovorax* sp. KKS102. *LipJ4* mostró 97% identidad, 83% de cobertura y un E-value de  $3e^{-167}$ , mientras que *ChapJ4* mostró 98% de identidad, 84% de cobertura y un E-value de  $1e^{-126}$ . Cuando estos dos genes (*LipJ4* y *ChapJ4*) fueron clonados por separado, ninguna de las sub-clonas tuvo fenotipo lipolítico en la prueba funcional. Sin embargo, cuando ambos se clonaron juntos, las sub-clonas resultantes fueron positivas, sugiriendo que el producto de *LipJ4* depende del de *ChapJ4* para ser funcional. Un análisis filogenético de la secuencia traducida de *LipJ4* indicó que esta se agrupa con la sub-familia I.1 de lipasas verdaderas. De acuerdo con los resultados obtenidos del alineamiento en ClustalW, *LipJ4* muestra dominios conservados de esta sub-familia, un motivo peptapéptido GSHHG que se comparte con otros miembros de este grupo, así como una triada catalítica compuesta por Ser<sup>173</sup>, Asp<sup>319</sup>, His<sup>340</sup>, sitios de unión a Ca<sup>+2</sup> y un puente disulfuro formado por residuos de cisteína. El modelamiento 3D con I-TASSER mostró que la lipasa se pliega como una  $\alpha/\beta$  hidrolasa canónica. La caracterización bioquímica de *LipJ4* mostró que es capaz de hidrolizar p-nitrophenyl caprylate (C8), a 45°C, con una actividad relativa del 100% y p-nitrophenyl miristate (C14) con una de 70%. Estos sustratos se usan en la industria cosmética y la de alimentos, y algunos miembros de la sub-familia I.1 de lipasas, se han propuesto como promisorios catalizadores para la producción de biodiésel, a través de reacciones químicas de transesterificación. Por lo que, la nueva lipasa encontrada en este proyecto podría tener relevancia biotecnológica.

---

---

## ABSTRACT

Lipases represent an important group of enzymes for research and development in several biotechnological industries. In CICY, a large-insert metagenomic library of the Aquifer of Yucatán was constructed by using fosmids. In the work described here, four clones of this metagenomic library were found by functional screening of extracellular lipolytic activity, and bioinformatic procedures were performed to analyze the contigs they contained. In the exogenous DNA of one positive clone was identified a gene which, according BLAST-x analysis, has as nearest homolog a lactonizing lipase of *Acidovorax* sp. KKS102, named *LipJ4*, and other, named *ChapJ4*, which has a nearest homolog a chaperone, also from *Acidovorax* sp. KKS102. *LipJ4* showed 97% identity, 83% cover and an E value of  $3e^{-167}$ , while *ChapJ4* showed 98% identity, 84% cover and an E value of  $1e^{-126}$ . When these two genes were independently sub-cloned, none of the sub-clones showed lipolytic phenotype when subjected to the functional test. Nevertheless, when they were cloned together, the resulting sub-clones were positive, suggesting that the product of *LipJ4* depends on the product of *ChapJ4* to be functional. Phylogenetic analysis of *LipJ4* translated sequence showed that it cluster together with the subfamily I.1 of true lipases. According to the data obtained with ClustalW, *LipJ4* exhibits conserved domains of this sub-family, a GSHSG penta-peptide sequence motif which is shared with others member in this cluster, a catalytic triad composed by Ser<sup>173</sup>, Asp<sup>319</sup>, His<sup>340</sup>, two Ca<sup>+2</sup> binding sites, and one disulfide bridge. I-TASSER 3D modeling showed that the predicted lipase folds as a canonical  $\alpha/\beta$  hydrolase. Biochemical characterization of *LipJ4* showed that is able to hydrolyze at 45°C p-nitrophenyl caprylate (C8) with a relative activity of 100% and p-nitrophenyl miristate (C14) with 70%. These substrates are used by cosmetic and food industries, and some members of subfamily I.1 of lipases have been reported as promising catalysts for biodiesel production, through the chemical reactions transesterification. Thus, the novel lipase found in this project may have biotechnological relevance.

---

---

---



## CAPÍTULO I

### CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DE GENES DE LIPASAS PROVENIENTES DE UNA BIBLIOTECA METAGENÓMICA DEL ACUÍFERO DE YUCATÁN

#### INTRODUCCIÓN

La transformación de grupos químicos presentes en el aire y el suelo ha conllevado a los microorganismos a presentar actividades metabólicas diferentes para cada sistema biológico (Simon & Daniel, 2011). Ya que la vida depende de reacciones químicas para la actividad metabólica, es necesaria la producción de biomoléculas (enzimas) que regulen las velocidades de reacción en los diferentes procesos biológicos que cada célula necesita para sobrevivir (Loyola-Vargas, 2005).

El déficit en el procesamiento de algunas moléculas complejas es provocado por la insolubilidad en agua de algunos compuestos como los lípidos que representan un valor importante de la biomasa de la tierra (Simon & Daniel, 2011). Por ende las enzimas lipolíticas tienen un papel importante para el procesamiento de degradación y movilización de ácidos grasos dentro de las células; así como la transferencia de un organismo a otro (Simon & Daniel, 2011). Las enzimas lipolíticas conocidas como carboxil éster hidrolasas (EC 3.1.1.2) y triacilglicerol lipasa (EC 3.1.1.3) despertaron interés de la industria para satisfacer las necesidades de síntesis de nuevos productos y promovieron la búsqueda de estos biocatalizadores a través del escrutinio de los microorganismos (Levisson, 2009).

Uno de los grandes problemas de la industria, ha sido encontrar enzimas adecuadas para la selectividad y eficiencia de la gran diversidad de los procesos químicos utilizados para la bioconversión; aumentando la demanda de las biomoléculas termoestables que se encuentran en organismos mesófilos, termófilos, psicrófilos, patogénicos o que poseen alguna toxina (Hasan *et al.*, 2006).

La termoestabilidad biocatalítica de las enzimas lipolíticas ha permitido el desarrollo de nuevos productos en un rango más amplio de temperatura y pH; puesto que los sustratos lipídicos son más solubles a altas temperaturas y las reacciones libres de disolventes son

más factibles (Hasan *et al.*, 2006; Syal & Gupta, 2015). También los procesos requieren eliminar la viscosidad de la reacción y la contaminación por MOs (Yuan *et al.*, 2016).

La industria demanda de enzimas con capacidad catalítica sobre sustancias hidrofóbicas y en algunos casos hidrofílicas, como los alcoholes que facilitan la síntesis de biodiésel, moléculas novedosas para el área farmacéutica, grasas modificadas y compuestos de alto valor (Martini *et al.*, 2014). También muchas empresas producen lipasas empleando organismos huéspedes de fácil crecimiento sobre medios de cultivos económicos (Sarrouh *et al.*, 2012). El empleo de cultivos bacterianos en la producción enzimática, se ve favorecido por encima de las levaduras, debido a que presentan pH neutros o alcalinos y una mayor termoestabilidad en los procesos de reacción (Sarrouh *et al.*, 2012).

El metagenoma bacteriano representa una amplia fuente de enzimas y proteínas con funciones desconocidas, ya que existen muchos microorganismos que aún no se han podido aislar en condiciones de laboratorio, lo que lleva a la necesidad de utilizar nuevos métodos de búsqueda (Fersini *et al.*, 2012).

La importancia de las herramientas metagenómicas es que facilita la búsqueda para encontrar moléculas con gran potencial redox, con capacidades de trabajar en diferentes pH y salinidad (Rojas-Herrera *et al.*, 2011).

Las lipasas representaron un valor de 1 billón de dólares en el 2012, posicionándose en el tercer lugar de las enzimas más comercializadas en el mundo después de las proteasas y las carbohidrasas, con una estimación financiera de 7 mil millones de dólares distribuidos principalmente en el sector farmacéutico (29%), la industria de los biocombustibles (18%), la industria de alimentos y productos asociados (14%), un 11% con fines de investigación y biotecnología, y finalmente el 38% se encuentra distribuido en el procesamiento de papel, cosméticos y los productos de limpieza (Casas-Godoy *et al.*, 2012). Estos datos evidencian la importancia biotecnológica de estas enzimas hidrolíticas. Las principales reacciones de las lipasas son la acidólisis, la alcoholólisis y la transesterificación que alteran las propiedades físicas de los triglicéridos produciendo nuevos ésteres (Sangeetha *et al.*, 2011).

## ANTECEDENTES

### 1.1 MICROORGANISMOS Y ENZIMAS

Las investigaciones han llevado a describir la diversidad genética de muchos entornos como las aguas termales, el océano, el suelo, el intestino humano, el rumen de los animales, entre otros. Sin embargo los investigadores se dieron cuenta que había una gran cantidad de microorganismos que no podían ser identificados por las tinciones de aquel tiempo tras realizar pruebas de microscopía y diluciones (Handelsman, 2004). También se podría mencionar un trabajo realizado por Brock en 1980 donde encontraron microorganismos en los manantiales de agua caliente en Yellowstone que no se podían cultivar *in vitro* debido a que se requerían condiciones de temperatura que excedían el punto de fusión del agar, reforzando el pensamiento sobre la dificultad para descubrir linajes de microorganismos nuevos debido a la limitante de tener que sembrar en placa de agar (Handelsman, 2004).

Cabe mencionar que por el uso de estas técnicas de cultivo, no solo el descubrimiento de nuevos microorganismos se vio afectado, sino también el de biomoléculas como las enzimas, y se pensó en implementar un nuevo enfoque en donde se trabajara a nivel de ADN (Amann *et al.*, 1995).

Los microorganismos pueden producir surfactantes, emulsificantes y enzimas que ayudan a solubilizar los lípidos, y poseen diferentes especificidades de sustrato (Hasan *et al.*, 2006). Cabe mencionar que las enzimas pasaron a formar parte importante de la industria a raíz de que fueron utilizadas por las civilizaciones antiguas para los procesos de vinificación, panificación, producción de alcohol, entre otros, aun sin tener conocimiento de lo que eran (Amara *et al.*, 2009). Su importancia no solo fue alimentaria, sino que para el año 2000 adquirieron una ventaja industrial significativa de 1,5 miles de millones de dólares en EE.UU con dominancia en el mercado de las enzimas hidrolíticas: amilasas, amidasas, proteasas, lipasas y esterases.

La lipasas alcalinas para la industria de los detergentes también se emplean para la síntesis quiral de moléculas en la industria farmacéutica y las primeras cepas seleccionadas productoras de estas enzimas fueron algunas especies de *Candida*, *Pseudomonas* y

*Bacillus* con un pH óptimo de 8.5 y 9.5 respectivamente (Horikoshi, 1999; Gupta *et al.*, 2004).

## 1.2 ENZIMAS LIPOLÍTICAS

Las enzimas lipolíticas (triacilglicerol acilhidrolasas) se reportaron entre las enzimas más importantes en la industria debido a su capacidad para hidrolizar lípidos en presencia de agua (Sangeetha *et al.*, 2011).

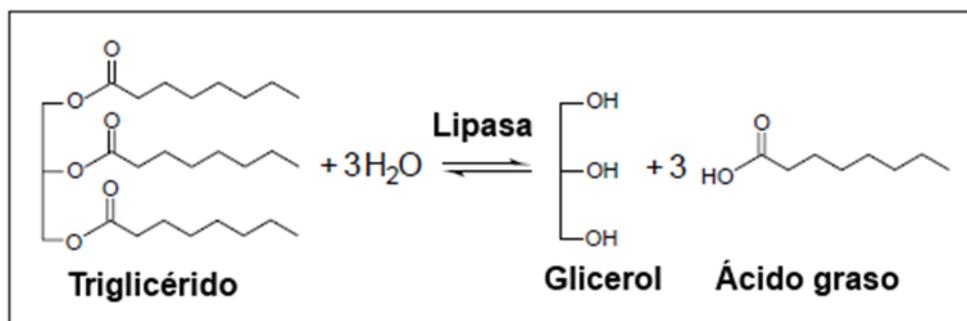
Las lipasas tienen una preferencia por moléculas hidrocarbonadas mayores o iguales a los 12 átomos de carbono y son poco solubles en agua (López-López *et al.*, 2014). Mientras que las esterasas hidrolizan moléculas más solubles en agua y con cadenas menores de 12 átomos de carbono (López-López *et al.*, 2014). La poca solubilidad en agua de los sustratos de las lipasas propicia un mecanismo conocido como activación interfacial que consiste en una cinética no Michaeliana dada por la presencia de una cubierta que cubre el sitio activo de la enzima y que se abre en presencia de un sustrato insoluble (Okano *et al.*, 2015).

La mayor parte de las lipasas y esterasas que se han logrado caracterizar, son las provenientes de bacterias y hongos; puesto que su proceso implica bajos costos de producción (Okano *et al.*, 2015).

## 1.3 TRIGLICÉRIDOS

Los lípidos representan la principal fuente de energía, son fundamentales en la formación de estructuras celulares como las membranas y constituyen el vehículo de vitaminas liposolubles. Organolépticamente aumentan la palatabilidad y el sabor de las comidas, así como también representan los componentes más importantes de la saciedad postprandial que producen los alimentos: su manejo tecnológico es más complicado debido a su baja solubilidad en agua (como los triglicéridos, los fosfolípidos y los esteroides). Los triglicéridos son los principales lípidos que se encuentran en los alimentos y son moléculas estructuralmente asimétricas, de modo que cada unión de ácido graso al grupo hidroxilo del glicerol es diferente (Valenzuela *et al.*, 2002).

Un triglicérido puede ser hidrolizado en una molécula de glicerol y 3 de ácidos grasos, u ocurrir la reacción inversa de síntesis. La figura 1 muestra cómo se da este proceso en presencia de una lipasa (Jaeger & Reetz, 1998).



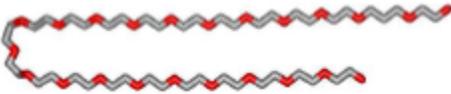
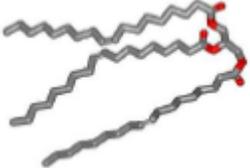
**Figura 1.1** Lipólisis (Jaeger & Reetz, 1998).

Debido a su versatilidad estas enzimas adquieren ventajas de mercado para el procesamiento de grasas y aceites, elaboración de alimentos, síntesis de productos químicos y farmacéuticos, fabricación de papel, de cosméticos y el tratamiento de aguas residuales ricas en lípidos (Altan, 2004). Su desventaja recae en los costos de producción debido a que muchas veces se le requiere pura, libre de otras enzimas. Las lipasas deben ser inmovilizadas para que puedan ser reutilizables y estables, permitiendo operar el proceso continuamente; el proceso enzimático debe ser único (Cetina-Medina, 2010).

Para que los microorganismos puedan sintetizar lipasas *in vitro* se necesita adicionar lípidos que funcionen como inductores; estas moléculas son comúnmente aceites vegetales, ácidos y ésteres grasos como los jabones, el colesterol, sales biliares y los detergentes que generalmente se encuentran en los residuos agroindustriales (Aceves-Diez & Castañeda-Sandoval, 2012). También se pueden utilizar sustratos como triglicéridos, surfactantes y derivados de polietilén glicol para detectar la actividad lipolítica en medio sólido o líquido (Cuadro 1.1): y se pueden utilizar indicadores de reacción como agentes fluoróforos.

**Cuadro 1.1** Sustratos utilizados para la inducción de lipasas. El color rojo indica las moléculas reactivas de oxígeno (modificado de Hellner, 2011).

Aditivos	Sustratos	Molécula
----------	-----------	----------

<b>LA</b>	Ácido láurico	
<b>OA</b>	Ácido oleico	
<b>TEG</b>	Tetraetilen glicol	
<b>PEG400</b>	Polietilén glicol 400	
<b>PEG1000</b>	Polietilén glicol 1000	
<b>BRIJ</b>	BRIJ-30 (Polietilén glicol dodecil éter)	
<b>L-TEG-L</b>	Tetraetilen glicol dilaurato	
<b>TRX100</b>	Tritón X 100	
<b>Aceite de olivo</b>	Trioleína	

#### 1.4 LIPASAS

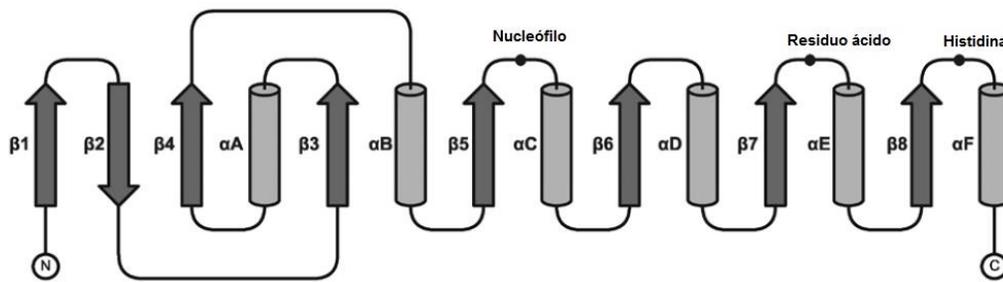
De acuerdo con la definición de la comisión de enzimas de la IUPAC las lipasas son triacilglicerol éster hidrolasas que catalizan de forma natural la hidrólisis de triacilglicéridos y están presentes en todos los organismos vivos, desde los microorganismos hasta los animales superiores, y son imprescindibles para la asimilación y almacenamiento de los

lípidos, así como para la utilización de las grasas que sirven de reserva (García-Román, 2005). Identificadas por primera vez por el microbiólogo Christiaan Eijkmann a principios del siglo XX, sus características fueron descritas en 1945 por Schonheyder y Volqvartz (García-Roman, 2005). Sarda y Desnuelle en 1958 comprobaron que la lipasa pancreática es especialmente activa cuando el sustrato se encuentra en emulsión, con una actividad escasa o nula sobre un sustrato no disuelto (García-Román, 2005). Las lipasas catalizan la hidrólisis y la síntesis de ésteres a partir de glicerol y ácidos grasos de cadena larga, por lo general procediendo con alta regio-y/o enantioselectividad, característica que los posiciona como un importante grupo de biocatalizadores en química orgánica (Jaeger & Reetz, 1998).

### **1.5 CARACTERÍSTICAS DE LAS LIPASAS**

Las lipasas son únicas debido a su naturaleza interfacial: propiedad que representa la insolubilidad en agua de los sustratos (lípidos), y la solubilidad de las enzimas en la reacción (Casas-Godoy *et al.*, 2012). Las lipasas generalmente no requieren cofactores para su actividad catalítica y pertenecen a la superfamilia de proteínas con estructura de  $\alpha/\beta$  hidrolasas como se muestra en la Figura 2 (Casas-Godoy *et al.*, 2012; Nagarajan, 2012).

Para llevar a cabo la transformación de los sustratos, estas enzimas, forman dentro de su estructura tridimensional un bolsillo conocido como la triada catalítica y un agujero oxianión que permite a las lipasas acomodar el sustrato de su preferencia (Casas-Godoy *et al.*, 2012). La triada catalítica está compuesta por la serina catalítica, el aspartato o glutamina y la histidina (Gupta *et al.*, 2004). También tienen en su estructura un dominio móvil, conocido como tapa (lid catalítico), que protege el sitio activo (hidrofílico), el cual se abre cuando la enzima se encuentra en una interface lípido-agua que expone al sitio activo de la enzima para que se lleve a cabo la hidrólisis; este mecanismo es conocido como fase interfacial y explica el comportamiento de estas enzimas, que no siguen el modelo de Michaelis Menten (Casas-Godoy *et al.*, 2012).

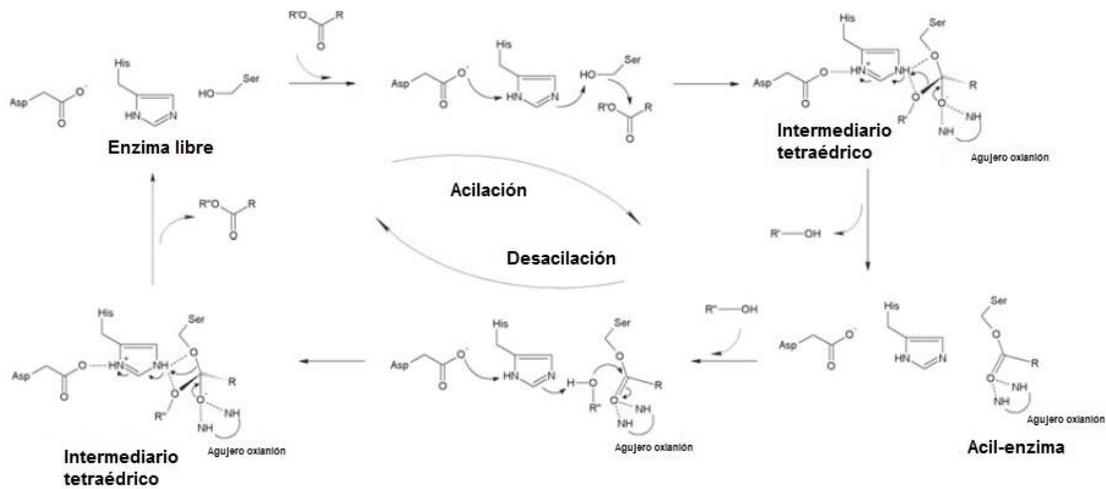


**Figura 1.2** Estructura secundaria en lipasas. Plegamiento canónico de alfa-beta hidrolasas, con dominios canónicos, carboxilo terminal(C), amino terminal (N), Triada catalítica conformada por serina (Nucleófilo), aspartato ( residuo ácido) e histidina (modificado de Levisson, 2009).

## 1.6 MECANISMO DE CATÁLISIS DE LAS LIPASAS

La reacción de hidrólisis comienza por una acilación en el sitio activo (Asp, Ser e His), lugar donde se propicia la transferencia de protones para la activación del grupo hidroxilo de la serina catalítica. Como consecuencia, el residuo de hidroxilo de éste aminoácido aumenta su nucleofilicidad y ataca al grupo carbonilo del sustrato, produciéndose el primer intermediario tetraédrico: complejo formado por la carga negativa que aporta el oxígeno en el grupo carbonilo de la unión serina-sustrato (Casas-Godoy *et al.*, 2012). El agujero oxianión estabiliza la distribución de las cargas y reduce la energía del estado del intermediario tetraédrico mediante la formación de al menos dos enlaces de hidrógeno (Casas-Godoy *et al.*, 2012). La enzima se regenera en la última etapa de este proceso, conocido como desacilación: un nucleófilo ataca a la enzima liberando el producto.

El nucleófilo puede ser  $H_2O$  en el caso de la hidrólisis o un alcohol en el caso de alcoholólisis (Casas-Godoy *et al.*, 2012). La figura 5 muestra el proceso descrito anteriormente.



**Figura 1.3** Reacción catalítica del sitio activo en lipasas. La hidrólisis de lipasas está dada por dos procesos; en la acilación el sustrato se une a la serina catalítica y en la desacilación se lleva a cabo la liberación de los productos, con el regreso de la enzima a su estado inicial (Casas-Godoy *et al.*, 2012).

## 1.7 METAGENÓMICA

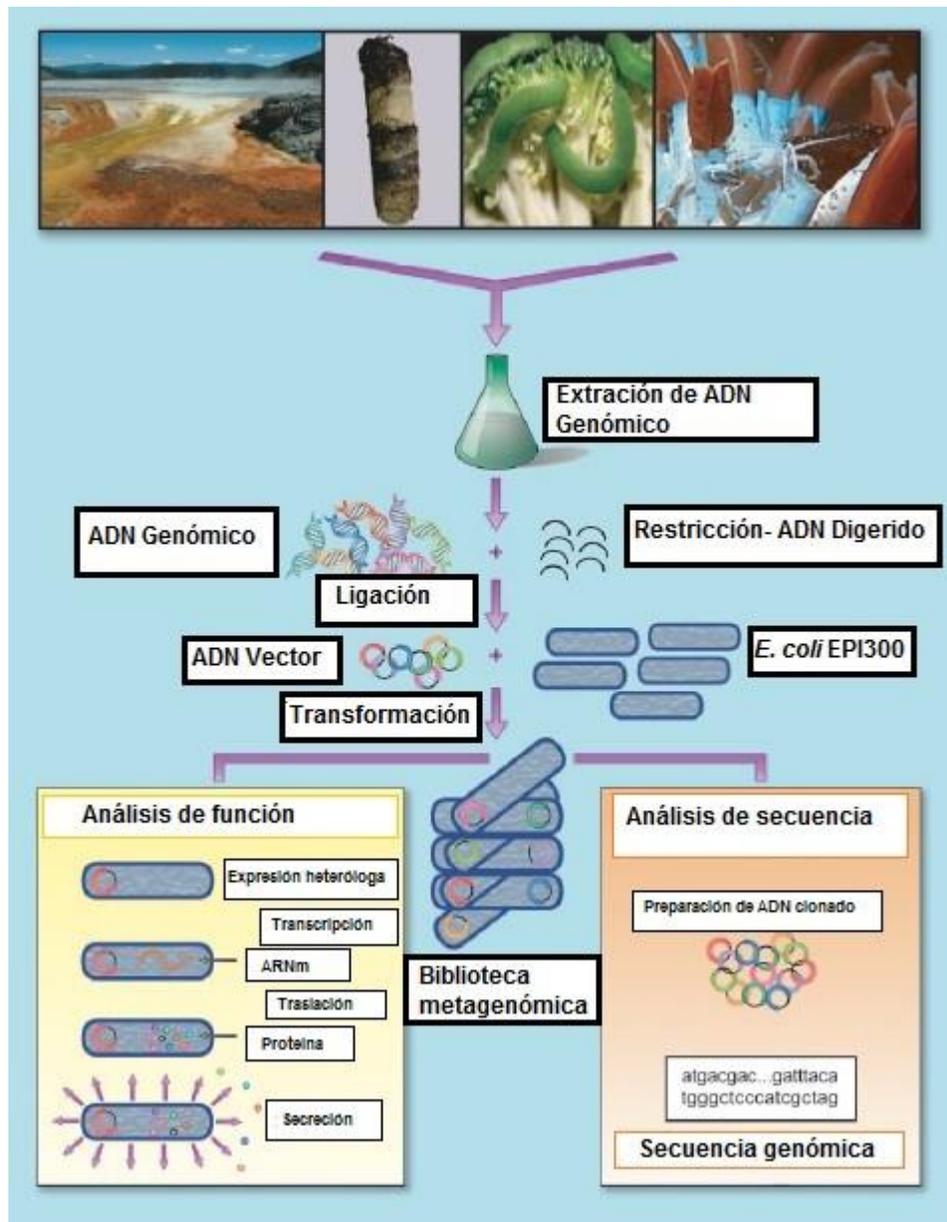
La metagenómica permite el análisis de las comunidades bacterianas completas a través de su ADN (metagenoma), sin la necesidad de cultivos directamente en un laboratorio; lo cual ha contribuido al descubrimiento de nuevas enzimas (Faoro *et al.*, 2011).

La metagenómica se define como la aplicación de herramientas funcionales y de secuenciación masiva de ADN a partir de una muestra ambiental o una serie de muestras relacionadas (Kunin *et al.*, 2008), y surge con los trabajos realizados por Pace en 1985: autor que implementó la clonación de ácidos nucleicos aislados de muestras representativas del medio ambiente (Handelsman, 2004). Surge ante la problemática de no poder investigar nuevos MOs y sus biomoléculas, los que finalmente sirven para dar sustento a las necesidades básicas de los seres humanos y el entorno que nos rodea (Handelsman, 2004).

El procedimiento incluye el aislamiento del ADN de la muestra ambiental, la clonación de pequeños o grandes insertos en vectores de ADN y la generación de bibliotecas (metagenómicas) en organismos huéspedes como *Escherichia coli* (Chow *et al.*, 2012). Los pasos que implican la elaboración de una biblioteca metagenómica se representan en la figura 1.4.

Los proyectos para la elaboración de bibliotecas metagenómicas se han enfocado en las muestras tomadas de agua o suelo por la gran riqueza de microorganismos que se encuentran en ellas (50,00-40,000 especies/g de suelo), así como también por la abundancia de biocatalizadores y productos naturales que contienen. Sin embargo también se han tomado otros puntos de partida para la toma de muestras como: el microbioma de animales, sedimentos marinos, biopelículas, efluentes industriales, entre otros (Sabree *et al.*, 2009).

Uno de los pasos más importantes para la construcción de las bibliotecas metagenómicas es la elección del vector hospedero de los insertos de ADN; esta selección dependerá del tamaño de los insertos clonados, lo cual tiene relación con el número de clones que se pretenden analizar. Si se busca una función codificada por un solo gen como en el caso de las hidrolasas, celulasas y genes que confieren resistencia a antibióticos, se utilizan insertos <10Kb, clonados en *E. coli.*, en vectores estándar derivados de pUC, pBluescript SK(+), pTOPO-XL, entre otros (Sabree *et al.*, 2009). Si lo que se quiere es buscar productos codificados por varios genes se requiere clonar fragmentos de ADN >20Kb, y se deberá recurrir a fósmidos, al cromosoma artificial bacteriano (BACs), o a los cósmidos (Sabree *et al.*, 2009). La clonación de fragmentos grandes de ADN permite encontrar los genes que codifican para una función o enzima determinada, junto a la ventaja de analizar grandes fragmentos en el genoma así como los operones que codifican la biosíntesis de metabolitos secundarios (Urban & Adamczak, 2008).



**Figura 1.4** Construcción de bibliotecas metagenómicas (modificado de Handelsman, 2004).

Las bibliotecas metagenómicas pueden contemplar pequeños o grandes insertos de ADN (en donde se pueden utilizar plásmidos que se mantienen estables con insertos de 10Kb), pero que requieren de 3-20 veces más clonas en comparación con las bibliotecas construidas en fósmidos/cósmidos, que aceptan insertos de 30-40 Kb y los BACs que tienen una capacidad para más de >200Kb (Sabree *et al.*, 2009).

Los plásmidos son adecuados para clonar pequeños insertos de ADN y resultan ser eficientes para la transformación de células hospederas por electroporación, choque térmico, conjugación y transfección por un fago (Buchholz *et al.*, 2012).

Los BACs se utilizan para bibliotecas genómicas a gran escala; sin embargo resultan tener poco éxito en el escrutinio funcional, debido a la inestabilidad de obtener y clonar insertos de ADN de tamaño apropiado a partir de muestras ambientales (Yeh *et al.*, 2011). Estudios anteriores utilizando este tipo de vectores han detectado insertos de tamaños similares a los de los fósmidos y los cósmidos, y el total de clones considerados y obtenidos fue mucho menor (Buchholz *et al.*, 2012).

Un fósrido es un vector capaz de aceptar insertos de 42Kb tanto de células procariontas como de eucariotas, teniendo como ventaja la facilidad de construcción y la alta expresión en el huésped de los genes exógenos, por ejemplo: *E. coli* (Yeh *et al.*, 2011).

Para los análisis de los metagenomas se puede emplear la secuenciación masiva, la búsqueda *in silico* de genes, la hibridación de clonas con sondas de ADN o ARN, o realizar búsqueda funcional mediante el monitoreo del producto en cultivos sobre placas de agar adicionados con sustratos o reactivos que permiten evidenciarlos; el éxito de esta estrategia requiere de la fidelidad de la transcripción y secreción del producto extracelularmente (Handelsman, 2004). Esta última técnica permite a la metagenómica identificar nuevos genes a través de funciones ya conocidas.

Young y colaboradores en el año 2009 realizaron la búsqueda de lipasas en una biblioteca metagenómica construida con el fósrido pCC1Fos<sup>TM</sup> proporcionado por Epicentre, realizando la prospección lipolítica en placas de agar con tributirina como sustrato (Kim *et al.*, 2009).

Couto y colaboradores (2010) también utilizaron la estrategia del sistema de Epicentre con el vector pCC2Fos<sup>TM</sup>, para la construcción de una biblioteca metagenómica a partir de sedimentos de manglares: trabajo que les permitió encontrar el gen funcional de la lipasa “LipA” de *Bacillus subtilis*.

## **1.8 ACUÍFERO DE YUCATÁN**

Los ambientes seleccionados para estos estudios suelen ser zonas poco exploradas con características diferentes a las de otros hábitats. Tal es el caso del Acuífero de Yucatán que se encuentra en una zona kárstica: término que hace referencia a todos aquellos fenómenos que se desarrollan por el paso o percolación de agua rica en CO<sub>2</sub>, a través de rocas permeables, en especial las calizas (González-Herrera *et al.*, 2007)

El Acuífero de la península de Yucatán representa uno de los sistemas kársticos más importantes del planeta con una extensión de 165,000km<sup>2</sup>, que comprende México, Guatemala y Belice. Presenta una alta disolución de carbonatos y una intrusión salina que proviene de las costas del Caribe hacia las costas del golfo de México (Bauer-Gottwein *et al.*, 2011). Por la diversidad microbiana del Acuífero de Yucatán, los estudios para la obtención de productos de interés biotecnológico resultan ser prometedores (Rojas-Herrera *et al.*, 2011).

Los ecosistemas que dependen de agua subterránea en ambientes kársticos (Acuíferos alcalinos) son considerados de suma importancia no solo por su naturaleza, sino que su compleja heterogeneidad, su susceptibilidad a la contaminación y su permeabilidad; puesto que, se produce la disolución de rocas carbonatadas y el aumento en la presencia de calcio, carbonato y magnesio (Escolero *et al.*, 2005).

La temperatura de los cenotes está entre los 24°C y 29°C, y el pH puede variar dependiendo de su cercanía hacia las costas por la intrusión salina. Estos sistemas acuáticos se dividen en cenotes lóticos y cenotes lénticos: los primeros hacen referencia a aquellos que tienen un pH homogéneo con valores neutros o por debajo del valor 7, mientras que los segundos tienen un pH bajo por la acumulación de ácido carbónico y las condiciones anóxicas (Schmitter-Soto *et al.*, 2002). El pH va de un valor de 6.7-8 en cenotes costeros, a un valor de 8.6 en cenotes continentales; cabe mencionar que la alcalinidad fluctúa en cada cenote debido a la variabilidad en agua meteórica rica en carbonatos y a la filtración del agua de lluvia debido a que los iones de estos carbonatos se neutralizan con el ácido húmico y taninos del mangle (Schmitter-Soto *et al.*, 2002).

Hay dos procesos que determinan la disolución de las rocas carbonatadas; el primer proceso es la disolución de la caliza por el ácido carbónico y el segundo proceso es la mezcla de agua dulce y salada, lo que mejora la reactividad del aragonito y la calcita

(Schmitter-Soto *et al.*, 2002). El Acuífero de Yucatán es una opción para la búsqueda de enzimas pues se han aislado organismos mesófilos haloalcalófilos de lugares como los lagos del Gran valle del Rif al este de África y los lagos de soda salina al oeste de USA (Horikoshi, 1999).

## 1. 9 APORTACIONES A LOS ESTUDIOS DE LIPASAS

En su gran mayoría tanto las lipasas como las esterasas poseen un motivo pentapeptídico conservado de Gly-X-Ser-X-Gly que se encuentra alrededor de la serina del sitio activo (Nagarajan, 2012). Además las lipasas en su gran mayoría poseen un sitio conservado del tipo GX al final de la cadena 3 beta plegada, mientras que las carboxilesterasas tienen el grupo GXGG en esta posición (Casas-Godoy *et al.*, 2012). El cuadro 1.2 muestra una descripción de las familias de lipasas clasificadas con base en secuencias de aminoácidos en los bloques motivo (regiones conservadas) y propiedades biológicas (Arpigny & Jaeger, 1999).

**Cuadro 1.2** Clasificación de las familias de lipasas/esterasas bacterianas propuesta por Arpigny y Jaeger en 1999. El cuadro representa una descripción de las 8 familias de lipasas junto a algunas enzimas descubiertas por metagenómica funcional (Modificado de López-López *et al.*, 2014).

Familia	Descripción
I	Familia de lipasas divididas en 6 subfamilias: lipasas de <i>Pseudomonas</i> (subfamilias I.1, I.2 y I.3), lipasas de <i>Bacillus</i> y <i>Staphylococcus</i> (I.4 y I.5) y algunas otras (I.6).
II	Modificación del motivo pentapéptido rodeando a la serina catalítica: Gly-Asp-Ser-(Leu) [GDS(L)].  Esterasas secretadas y unidas a membrana.
III	Lipasas y esterasas extracelulares.
IV	La mayoría en esta familia tienen similitud de secuencia con las lipasas sensibles a las hormonas de mamíferos (HSL).  Poseen un típico motivo HGG.

	La sub-familia <i>EstB</i> posee un segundo sitio activo de glutamato (secuencia conservada EXLLD) en lugar de aspartato (DPLXD).
<b>V</b>	Motivo conservado HGGG río arriba del pentapéptido GDSAG.  Secuencia similar con enzimas no lipolíticas: epóxido hidrolasas, dehalogenasas y haloperoxidasas.
<b>VI</b>	Esterasas pequeñas de (23–26 kDa).  Secuencias similares a las lisofosfolipasas de eucariotas.
<b>VII</b>	Esterasas bacterianas de gran tamaño (55 kDa).  Homología con las acetilcolinesterasas de eucariotas y carboxilesterasas de hígado e intestino.
<b>VIII</b>	Similitud a la clase C de $\beta$ -lactamasas.
<b>EstA</b>	Se vincula con la familia III, sin embargo tienen un motivo peptapéptido diferente (GHSMG).
<b>EstF</b>	Relacionadas a la familia V con la diferencia del motivo pentapéptido que es: GTSXG, y esta región está flanqueada por motivos HG.
<b>EstY</b>	Derivados de bacterias patogénicas.  Posibles factores de virulencia lipolíticas que no poseen el motivo pentapéptido GDSDL.
<b>LipG</b>	Presencia de Arg-Gly en la secuencia del agujero oxianión reemplazando a His-Gly, característica distintiva de las lipasas de hongos.
<b>LipEH166</b>	Lipasa de origen psicrófilo con 3 posibles marcos de lectura.

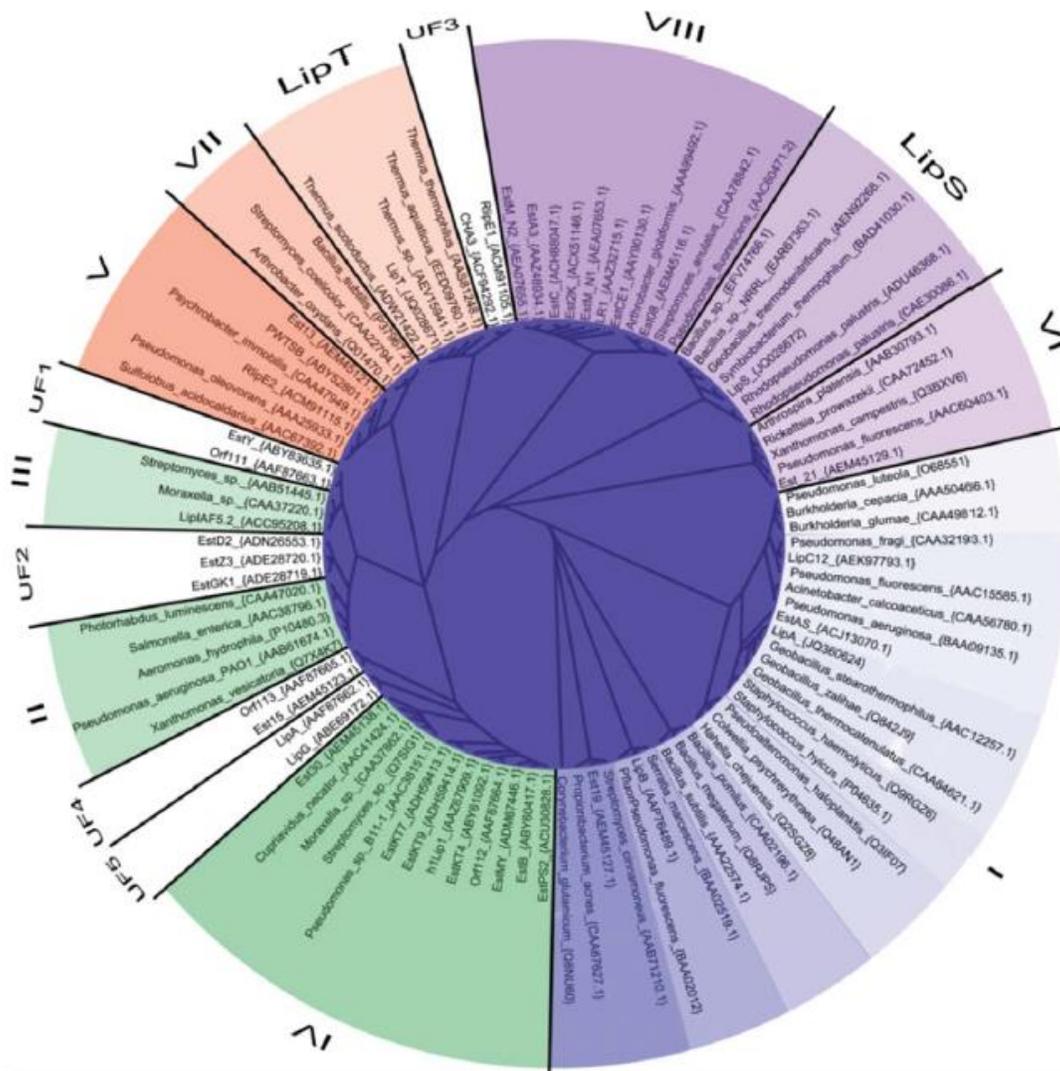
Esta clasificación se realizó con base en la estructura y similitud de las secuencias de aminoácidos, con asignación numérica del I-VIII (López-López *et al.*, 2014). Estudios de

lipasas de algunos metagenomas han propuesto a la familia 9 con base en algunas esterasas y lipasas que presentan un motivo G-X-S-Q-G, y que tienen estabilidad en solventes polares (Myung-Hwan *et al.*, 2010; Sang-Yi *et al.*, 2007).

Otro estudio de suma importancia fue el realizado por Bassegoda y colaboradores (2012), ya que pudieron ubicar a través del análisis *in silico* y la caracterización bioquímica a un nuevo grupo de lipasas con un motivo catalítico “Tyr-Asp-Ser-Leu” que difiere de las lipasas reportadas previamente. El gen perteneciente a *C. albicans* y comparte identidad con *Burkholderia cenocepacia* J2315 con un agujero oxoanión del tipo Y: nombrado así por sus residuos de aminoácidos Tyr<sup>110</sup> y Asp<sup>111</sup>. Los autores proponen a este grupo como la familia X de lipasas (Bassegoda *et al.*, 2012).

Algunos estudios con enfoque metagenómico han permitido encontrar nuevas lipasas/esterasas con propiedades diferentes a las familias mencionadas. Por ejemplo, dos de los nuevos grupos encontrados pertenecen a las lipasas *LipS* y *LipT*, ambas poseen una temperatura óptima de 70-75°C, tienen afinidad por sustratos de ésteres p-nitrofenil con cadenas largas de ácidos grasos (>8C). Además, estas enzimas tienen una alta termoestabilidad de hasta 90°C. Sin embargo, *LipS* puede hidrolizar sustratos más complejos con residuos fenólicos y ciclohexanoicos, con una alta regio-enantioselectividad por naproxeno, ibuprofeno y ácido metildecánico (Chow *et al.*, 2012).

Chow y colaboradores (2012) construyeron un árbol filogenético partiendo de secuencias de lipasas/esterasas pertenecientes a los 40 estudios metagenómicos disponibles en ese momento (Figura 1.5). En el árbol se pueden observar a las 8 familias reportadas por Arpigny y Jaeger más otros grupos que se separan de estas familias y se proponen como nuevas familias de lipasas (Chow *et al.*, 2012).



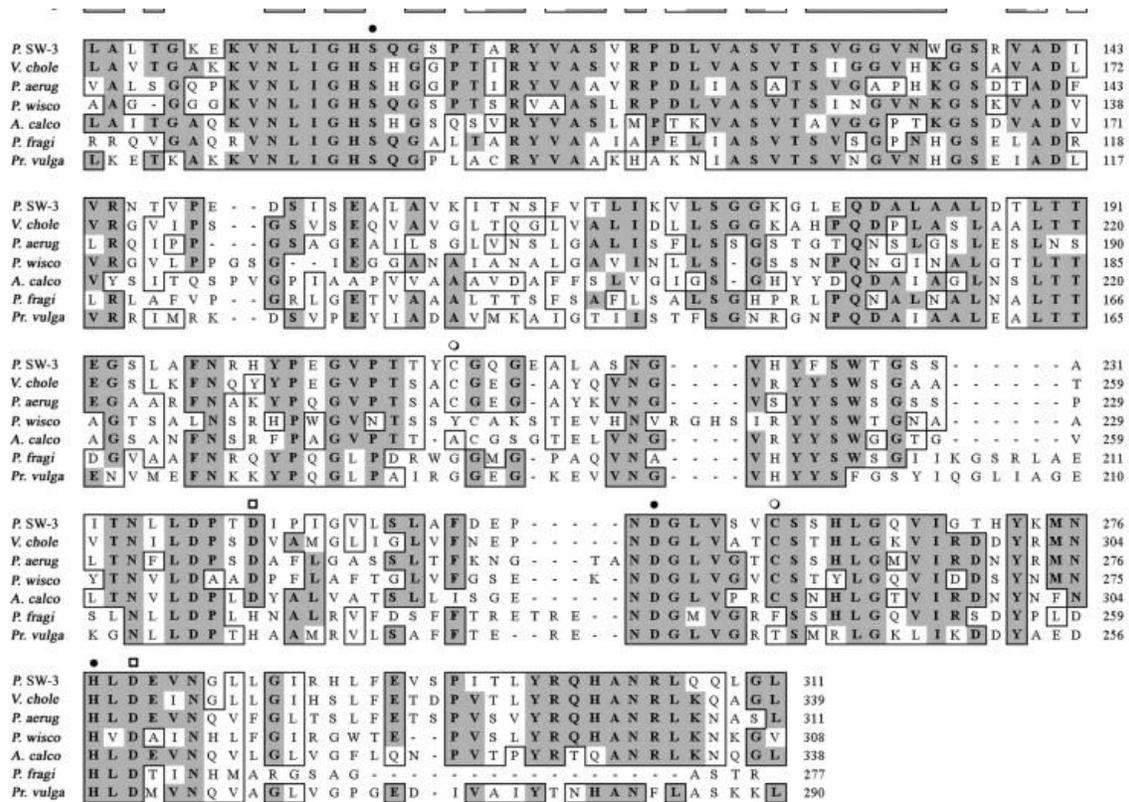
**Figura 1.5** Árbol filogenético de lipasas/esterasas derivado de las secuencias de 40 metagenomas reportados. Cada una de las VIII familias está marcada con un color diferente. Se muestra la familia *LipS* y *LipT*, y 5 grupos de secuencias de lipasas que aún están en estudio, como UF 1-5 y no se han clasificado con familias numeradas (Chow *et al.*, 2012).

A partir de esta tecnología, Biver y Vandenbol aislaron en el 2013 tres nuevos genes lipolíticos de una biblioteca metagenómica de un suelo forestal, mediante el cribado funcional en placas de agar tributirina. Los análisis filogenéticos revelaron que los genes

*SBLip2* y *SBLip5.1* pertenecían a la familia IV de esterasa/lipasa bacteriana, mientras que *SBLip1* mostró similitud a la clase C de  $\beta$ -lactamasas y por lo tanto se relacionó con la familia VIII de esterasas (Biver & Vandenbol, 2013). En el mismo año Kumar identificó una lipasa verdadera utilizando un aislado de la cepa *Bacillus* sp. (*DVL2*): la actividad de lipasa fue en presencia de aceite de olivo y Rodamina B en una placa de agar, con un halo color naranja fluorescente sobre la luz UV (Kumar *et al.*, 2012).

En los últimos años se ha incrementado la caracterización y simulación de proteínas a partir de la secuencia nucleotídica del gen de interés utilizando programas bioinformáticos de libre acceso: A este conjunto de técnicas se le conoce como modelaje *in silico* (Jiménez *et al.*, 2010).

Young y colaboradores muestran en su trabajo un análisis *in silico* realizado por “BLAST-P” de las secuencias traducidas de los insertos en sus clonas con actividad de lipasa sobre medios selectivos de tributirina y Rodamina B (An *et al.*, 2003). La figura 1.6 muestra el alineamiento múltiple en donde se observan los dominios conservados en las lipasas: dos residuos de Asp, en las posiciones 240 y 279, conocidos como los sitios de unión de  $\text{Ca}^{+2}$ , y dos residuos de Cys que forman un enlace di sulfuro en las posiciones 210 y 261 (An *et al.*, 2003).



**Figura 1.6** Alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos de *LipA* de *Pseudomonas* sp. SW-3 (P. SW-3). Los cuadros sombreados hacen referencia a los aminoácidos que se conservan en al menos cuatro de las siete secuencias: la tríada catalítica se indica mediante círculos llenos, los dos residuos Asp implicados en el sitio de unión al  $Ca^{2+}$  están marcados por los cuadrados blancos y finalmente los dos residuos de Cys que forman un enlace di sulfuro se indican con los cuadros blancos (An *et al.*, 2003).

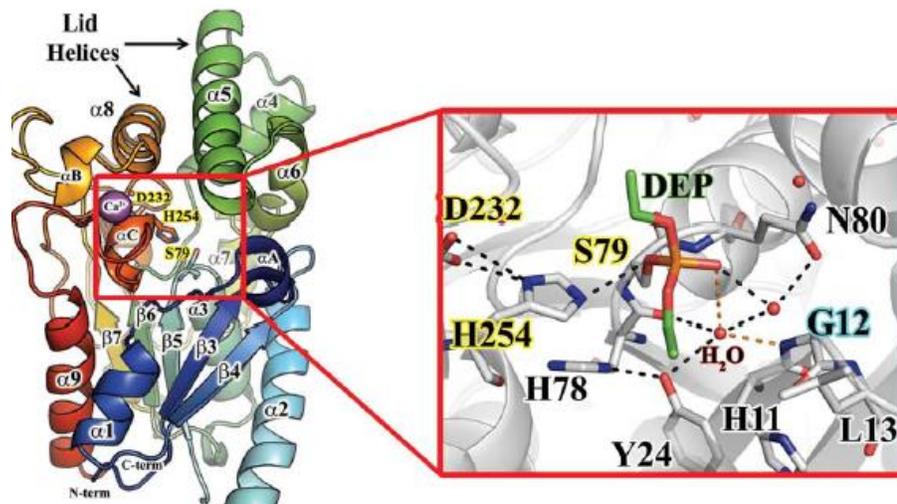
Young y colaboradores (2003) se basaron en el alineamiento de secuencias con ClustalW para suponer que tenían genes de lipasas (Jiménez *et al.*, 2010). Más tarde Khan y Jithesh (2012) identificaron una lipasa alcalina (*EH166*) adaptada al frío, a través de un alineamiento con el programa ClustalW de secuencias de un metagenoma de la zona intermareal.

Estos autores realizaron la caracterización bioquímica; determinación temperatura, preferencia de sustrato, el pH, el efecto de los iones metálicos y su actividad en disolventes orgánicos (Khan & Jithesh, 2012).

Fu y colaboradores (2013) trabajando con una muestra del sedimento de la zona intermareal del ártico encontraron un marco de lectura abierto con identidad de esterasa (*Est97*) en la secuencia de *Vibrio caribbenthicus*. Como parte de las características se encontró la triada catalítica (Ser<sup>144</sup>-His<sup>226</sup>-Asp<sup>197</sup>) ubicando a la serina catalítica en el pentapéptido conservado GX SXG (Figura 1.4), con una conformación  $\alpha/\beta$ -hidrolasa: 9 cadenas  $\beta$  y 6 cadenas  $\alpha$  (Fu *et al.*, 2013).

Estudios posteriores les permitieron identificar a la enzima como una esterasa por su preferencia de sustrato p-nitrofenil hexanoato, a pesar de poseer el dominio de tapa (lid). Esta se involucra en la entrada del sustrato y la salida de los productos terminados. Así mismo se encontraron dos bolsillos hidrofóbicos de unión a sustrato (sin estudios al respecto), con una baja actividad a 35% y una estructura secundaria que se ve alterada de los 10°C en adelante. Estos autores proponen que la presencia de residuos de metionina aumenta la flexibilidad de la enzima y se relacione con una característica de enzimas psicrófilas; su estructura carece de ramificaciones, de carga y de interacciones dipolo. La His<sup>226</sup> y el Asp<sup>197</sup> estabilizan a la Serina<sup>144</sup> catalítica para el ataque nucleofílico contra el sustrato. También encontraron que el agujero oxoanión está formado por los átomos de nitrógeno presentes en algunos aminoácidos que rodean el sitio activo; para la enzima *Est97* la Met<sup>145</sup>, la Gly<sup>52</sup> y la Gly<sup>53</sup> (Fu *et al.*, 2013).

Korman y Bowie (2012) modelaron la estructura de la lipasa de *P. mirabilis* colocando todos los elementos que conforman la estructura catalítica de la enzima (Fig 1.7) comparable con la estructura 3D de la lipasa de *Pseudomonas aureogina* que pertenece a la familia I.1.

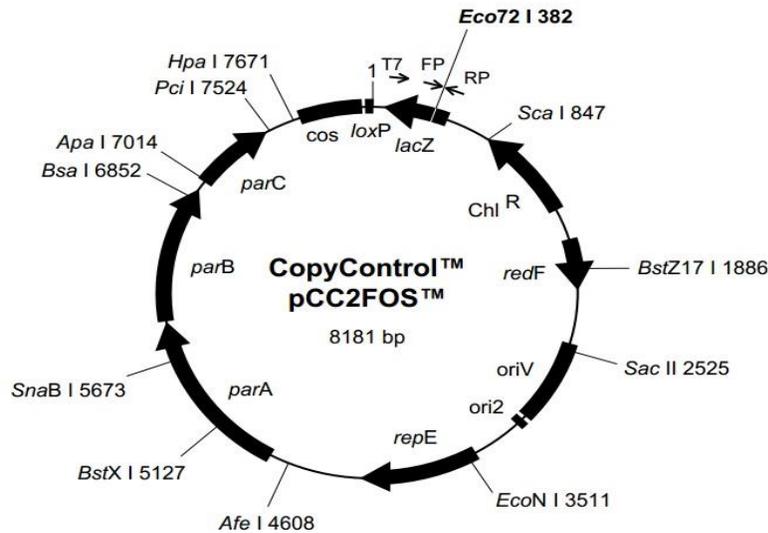


**Figura 1.7** Estructura 3D de la lipasa predicha de *P. mirabilis* (PML). El extremo C-terminal se muestra en la estructura alfa 1 de color azul marino y N-terminal se localiza al final de la estructura alfa 9 de color rojo. La unión a calcio se representa por una esfera de color morada. Dentro del recuadro se observa el inhibidor paraoxón (DEP) unido covalentemente a la serina catalítica (S79) representada por un color amarillo junto al resto de los residuos del sitio activo (D<sup>232</sup> y H<sup>254</sup>). En el estado de transición L<sup>13</sup> actúa como donador de hidrógenos para estabilizar el oxoanión. El resto de los residuos funcionan como estabilizadores (Korman y Bowie, 2012).

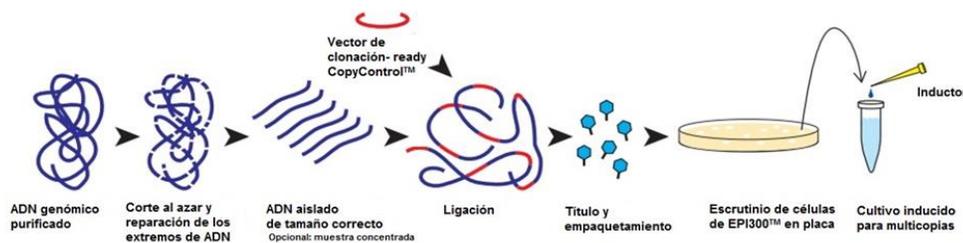
El trabajo elaborado por Glogauer y colaboradores muestra un seguimiento organizado de la identificación de genes de lipasa al encontrar la lipasa funcional *LipC12* a través de la metodología para la identificación y caracterización de genes (Glogauer *et al.*, 2011). Ya que el sistema “Copy Control Fosmid Library” (Epicentre, 2012a) permite la purificación del ADN con la reparación de sus extremos, la ligación en el vector pCC2Fos<sup>TM</sup>, el empaquetado en fago lambda y la infección de *E. coli* EPI300<sup>TM</sup> (Couto *et al.*, 2010).

### 1.9.1 ANTECEDENTES DE ESTUDIO DE METAGENÓMICA EN YUCATÁN

Para la construcción de la biblioteca metagenómica del Acuífero de Yucatán se utilizó el fósido pCC2Fos<sup>TM</sup> (Epicentre, 2012a), y el ADN se clonó en *E. coli* EPI300<sup>TM</sup>-T1R (Epicentre, 2012a). La figura 8 representa el mapa del vector.



**Figura 1.8** Fósido empleado en la construcción de la biblioteca metagenómica del Acuífero de Yucatán (Epicentre, 2012a).



**Figura 1.9** Construcción de la biblioteca metagenómica (modificada de Epicentre, 2012a).

La biblioteca metagenómica se realizó partiendo de una muestra de agua tomada de un punto del Acuífero de Yucatán. Posteriormente la biomasa procariótica se separó haciendo pasar la muestra de agua a través de varios filtros con diferentes tamaños de poro de 0.5-0.22 micras. La figura 9 muestra los pasos que se siguieron para la construcción, partiendo de la purificación de ADN genómico. El siguiente paso fue la digestión utilizando la enzima *Bam*HI y posteriormente se repararon los extremos de ADN y se hizo la selección de los fragmentos de aproximadamente 35,000pb. Se prosiguió con la ligación de estos

fragmentos en el vector de clonación (Epicentre, 2012a). Posteriormente se hizo el empaquetamiento en el fago lambda y se realizó el escrutinio de células sobre placas de LB y el agente de selección (cloranfenicol). Finalmente se realizó la inducción multicopia y las células se conservaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Se obtuvo un total de 250,000 clonas, trabajo realizado por el grupo de la Dra. Aileen O'Connor Sánchez (Apolinar-Hernández *et al.*, 2016).

Tras la construcción de la biblioteca metagenómica y con la finalidad de buscar lipasas, se realizó el escrutinio de 6,632 clonas sobre un medio de Rodamina B con aceite de olivo. En el trabajo realizado por Sergio Ramos Jiménez en 2013, se obtuvieron 21 clonas con posible actividad lipolítica que mostraron fluorescencia anaranjada. Estas colonias fueron almacenadas posteriormente a  $-80^{\circ}\text{C}$  en 50% de glicerol. Para continuar la búsqueda de las lipasas, en 2013 Jaime Muñoz López reactivó las clonas positivas, recuperándose únicamente 15 de ellas. Adicionalmente se trabajó con algunas de las clonas enviadas a secuenciar por Ion Torrent (Universidad de Utah, USA) por otros colaboradores del proyecto; dichas clonas se enviaron a secuenciar en varios "pools" de 100 colonias cada uno. Se realizaron búsquedas bioinformáticas de los marcos de lectura abiertos en los contigs, encontrando en algunos de ellos posibles marcos de lectura de lipasas (Miguel Marfil, comunicación personal).

Con base en todo lo anterior, en este trabajo se tuvo el interés de obtener algunas de las lipasas de la biblioteca metagenómica del Acuífero de Yucatán.

## **OBJETIVO GENERAL**

Identificar lipasas extracelulares novedosas en una biblioteca metagenómica del Acuífero de Yucatán.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Realizar un escrutinio funcional para la detección de clonas sobreproductoras de lipasas extracelulares en una biblioteca metagenómica generada a partir del Acuífero de Yucatán.

Identificar *in silico* marcos de lectura abiertos de lipasas en las secuencias de insertos de clonas positivas.

Corroborar que el fenotipo lipolítico está dado por los ORFs identificados, mediante su subclonación y expresión en los sistemas pLATE 11, 31 y 52.

Caracterizar *in silico* la secuencia de los ORFs de interés.

## JUSTIFICACIÓN

Las lipasas bacterianas y fúngicas generan una gran cantidad de ingresos a la industria biotecnológica por su alta especificidad en los productos generados debido a la reducción de reacciones secundarias no deseadas (Hasan *et al.*, 2006). Su versatilidad en los procesos de reacción, propiedades regio-enantioselectivas, su estabilidad en disolventes orgánicos, su amplia variedad de sustratos y su habilidad para catalizar reacciones sin necesidad de cofactores despiertan un gran interés en su producción (Casas-Godoy *et al.*, 2012; Sangeetha *et al.*, 2011).

Cabe mencionar que el último censo de mercado realizado en el 2015 se reporta que las lipasas han sido de las pocas enzimas en el área de la salud y la industria, y se tiene una proyección económica de \$590.5 millones de dólares para el 2020 según la tasa de crecimiento anual (Compound Annual Growth Rate), ocupando el primer lugar en consumo en la región Asia-Pacífico, seguida de Norte América (Markets & Markets, 2015). Entre las lipasas más comercializadas en el área de los detergentes (con características importantes para la eliminación de grasas) se encuentra Lipolase™ comercializada por Novo Nordik desde 1994 del hongo *Thermomyces lanuginosus* y expresada en *Aspergillus oryzae*; y de forma consecutiva las siguientes dos lipasas la Lumafast™ a partir de *Pseudomonas mendocina* y Lipomax™ de *Pseudomonas alcaligenes*, introducidas en 1995 y aún producidas por Genencor International (Saxena, 2015). De igual forma las lipasas A y B de *Candida antártica* han resultado ser de suma importancia para la industria por sus capacidades para la resolución cinética, la transesterificación, la polimerización, hidrólisis de una amplia variedad de sustratos, enantioselectividad y su reacción catalítica tanto en sistemas acuosos como orgánicos (Jaeger & Reetz, 1998; Liu *et al.*, 2012).

Estas cualidades de las lipasas han permitido a las empresas Amano y Novozymes obtener importantes ingresos en el área de los detergentes y el control de la brea en el papel (Houde *et al.*, 2004; (Saxena, 2015).

La lipólisis puede ser detectada empleando métodos de fluorimetría, espectrofotometría y colorimetría principalmente, por tanto estas técnicas resultan de gran importancia para el presente trabajo puesto que la detección de lipasas microbianas puede llevarse a cabo mediante el análisis visual de la hidrólisis y en algunos casos mediante la cuantificación del producto en cada reacción (Carissimi *et al.*, 2007).

La metagenómica facilita el camino para la búsqueda de nuevos genes a través de una metodología que no incluye el cultivo de MOs, lo que permite la búsqueda de biomoléculas en un amplio espectro de las comunidades microbianas presentes en ecosistemas complejos mediante el ingreso del ADN ambiental en un sistema que permite la producción de enzimas (Simon & Daniel, 2011); muchos trabajos utilizan como hospedera la cepa de *E. coli*. (Zheng *et al.*,2013). Mediante una biblioteca metagenómica se puede seleccionar microorganismos utilizando dos enfoques importantes: el análisis de funcionalidad por la producción de enzimas extracelulares y el análisis *in silico* que busca la homología de la nueva secuencia con respecto a las secuencias ya reportadas en las bases de datos (Kim *et al.*, 2009).

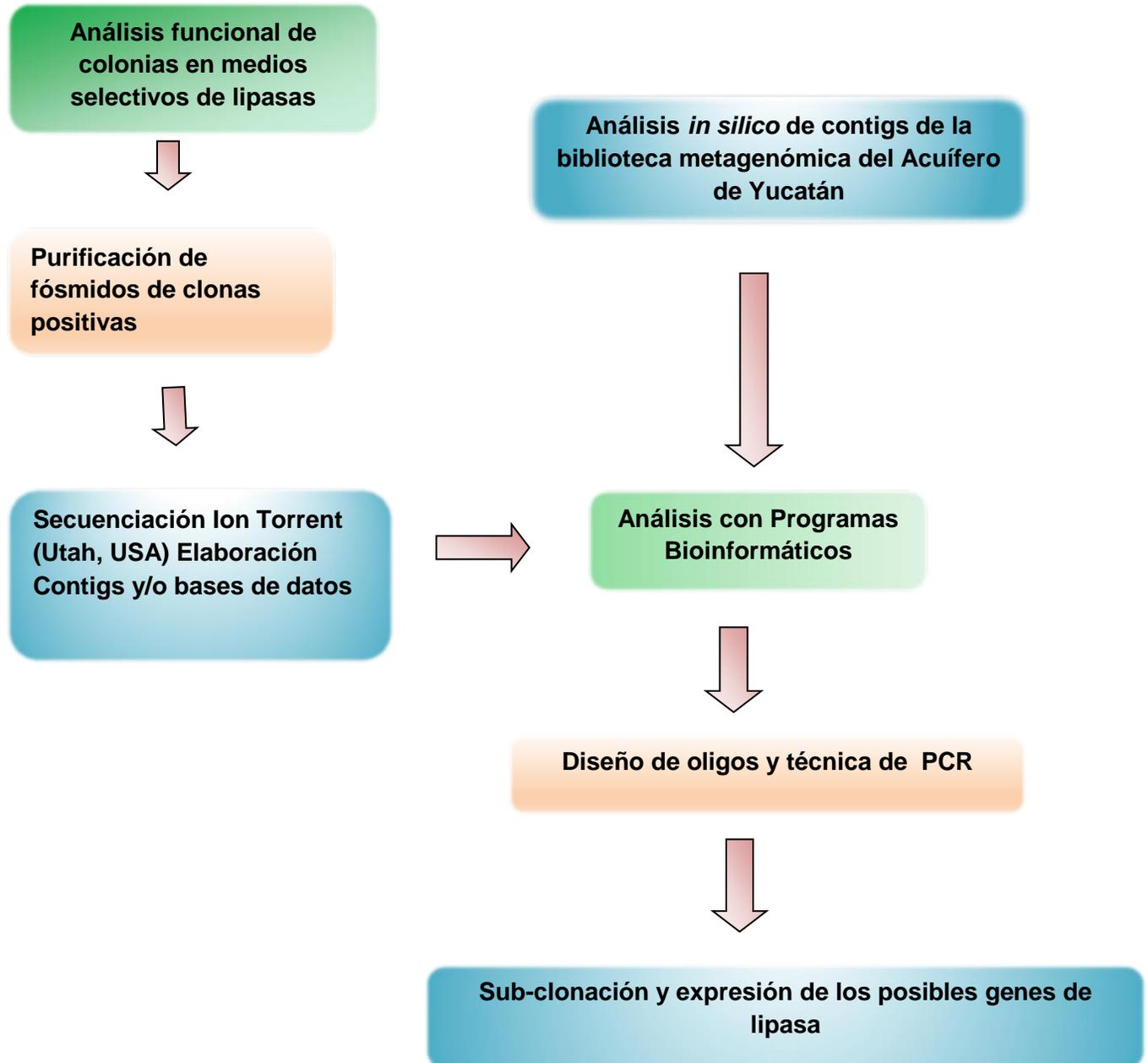
Debido a que la gran variedad de entornos (el suelo, muestras marinas, sedimentos bajo superficies contaminadas, aguas subterráneas, entre otros) ofrece una riqueza distinta de microorganismos con condiciones físico-químicas diferentes, se han obtenido nuevas lipasas de bacterias, hongos, levaduras y actinomicetos como: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rodococcus*, *Staphylococcus*, *Cándida*, *Aspergillus*, entre otros (Aceves-Diez & Castañeda-Sandoval, 2012; Simon & Daniel, 2011).

Los criterios de selección de hábitats para el descubrimiento de nuevas biomoléculas involucran las condiciones de temperatura, pH debido a que estas condiciones del medio externo influyen sobre los microorganismos, resultando en enzimas desconocidas, un claro ejemplo son las enzimas termófilas provenientes de meta genomas de aguas termales (Elend *et al.*, 2006; Lämmle *et al.*, 2007). Por esta razón el Acuífero de Yucatán localizado en el sureste de México se convierte en un lugar propicio para la búsqueda de nuevas

enzimas, al ser una zona kárstica poco explorada con características ambientales únicas en el mundo (Alcocer & Escobar, 1999; Rojas-Herrera *et al.*, 2011). Además, como nuevo hábitat estudiado, este importante reservorio de agua del país puede permitir la búsqueda de organismos alcalófilos, que representan grandes reservorios genéticos para la producción de péptidos señal de secreción y búsqueda de promotores para la sobre producción de enzimas (Hasan *et al.*, 2006).

Utilizando un sistema apto para la clonación y manejo de la información metagenómica se puede realizar la búsqueda de biomoléculas de forma dirigida, y por esa razón en este trabajo se hizo uso del sistema CopyControl® perteneciente a los laboratorios de Szylbalsky, que utiliza fósmidos y BACs como vectores para la expresión de genes, mismos sistemas que permiten controlar la replicación y obtener vectores unicopia a través del factor F. Sin embargo también poseen el OriV que ayuda a generar alto número de copias mediante inducción selectiva. Estos vectores se encuentran comercialmente disponible por la empresa Epicentre como pCC2Fos<sup>TM</sup>, pCC1Fos<sup>TM</sup> y pCC1BAC (Urban & Adamczak, 2008).

## ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



La estrategia involucró la realización de un tamizado de clonas de la biblioteca metagenómica y la detección de la actividad lipolítica sobre medios de detección con Rodamina B y aceite de olivo.

Se seleccionaron las cepas productoras de halos fluorescentes de color naranja, indicador de la hidrólisis del sustrato. Se realizó la extracción de ADN de los fósmidos para su secuenciación. Mediante herramientas bioinformáticas se procesaron las secuencias *in silico* de las colonias de interés y se generaron contigs y/o bases de datos para el rastreo de los genes de interés. Otros contigs generados de clonas secuenciadas de la biblioteca metagenómica del Acuífero de Yucatán con otros fines, fueron también analizados *in silico* para la búsqueda de genes de lipasas. La finalidad de buscar en este material es ampliar el campo de búsqueda de los genes de lipasa, en donde una vez obtenida la secuencia se realizó el diseño de oligonucleótidos sumándose a los contigs procedentes de las pruebas funcionales.

Se realizó la extracción de ADN de los fósmidos que resultaron positivos en de las pruebas de detección funcional y se confirmó por PCR la presencia de los genes. Posteriormente se realizó el análisis de electroforesis y se purificaron las muestras del gel para conservar únicamente los ADNs. Estos se subclonaron en los vectores pLATE 11, 31 Y 52 dependiendo de la presencia o ausencia de un péptido en la secuencia deducida de las lipasas, para la secreción. Finalmente se realizó la transformación en las células BL21 y se tamizó en presencia de IPTG (agente inductor) sobre placas de Rodamina B y aceite de olivo, para la confirmación de la expresión de lipasas.

## CAPÍTULO II

### DETECCIÓN DE CLONAS METAGENÓMICAS CON ACTIVIDAD EXTRACELULAR DE LIPASAS

#### 2.1 INTRODUCCIÓN

La industria enzimática busca la generación de biomoléculas expresadas con bajos costos de producción, y altos rendimientos, lo cual involucra generalmente que las enzimas sean secretadas al medio extracelular tras ser sintetizadas. A las empresas del sector les interesa que el organismo pueda manipularse fácilmente y que pueda ser cultivado en grandes fermentadores industriales; estas características son atribuidas principalmente a los microorganismos como, bacterias, levaduras y hongos (Castillo *et al.*, 2005). El escrutinio funcional basado en indicadores de fluorescencia, ha probado ser un método sensible y efectivo sobre todo para el aislamiento de clonas con actividad de lipasas, esta técnica hace una proyección directa ahorrando el trabajo y costo con un alto rendimiento (Zheng *et al.*, 2013). Para la detección de la actividad lipolítica es necesario crecer las células transformadas en medio LB (Luria-Bertani) con el antibiótico correspondiente y el 1% del sustrato: generalmente tributirina para la detección de esterasas y aceite de olivo para actividad de lipasas (Wang *et al.*, 2010). El análisis usando medio de cultivo con tributirina permite observar halos claros alrededor de las clonas positivas y la hidrólisis en este medio se puede observar en un aproximado de 4 días incubando a 37°C. (Jiménez *et al.*, 2012). Una de las pruebas más empleadas para la detección lipolítica es la que utiliza la Rodamina B al 0.001% como indicador y el aceite de olivo como sustrato, el cual posee en su estructura trioleína: ácido graso de cadena larga (C18) (Zheng *et al.*, 2013). El medio selectivo de lipasas muestra halos con fluorescencia naranja bajo rayos UV a 564nm. se seleccionan aquellas clonas que hayan tenido un halo fluorescente naranja sobre medio con aceite de olivo (Glogauer *et al.*, 2011).

#### 2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

##### 2.2.1 ESCRUTINIO EN MEDIOS SELECTIVOS

Se preparó un medio sólido selectivo de LB estéril al que se le agregó aceite de olivo al 1% como sustrato, cloranfenicol 12.5µg/mL como agente de selección y arabinosa al 0.001%.

Para poder detectar la lipólisis se utilizó el fluoróforo Rodamina B al 0.001%. Las 15 clonas reportadas en un trabajo previo realizado por Sergio Ramos Jiménez (2013), se tamizaron sobre medios de Luria Bertani (LB) y de forma paralela sobre medios indicadores de actividad lipolítica: ambos medios con cloranfenicol como agente de selección. Como control positivo se utilizó una cepa productora de lipasa (*Pseudomona aureoginosa* ATCC27853<sup>TM</sup>) y como control negativo se utilizó la cepa célula hospedera de la biblioteca metagenómica (*E. coli* EPI 300<sup>TM</sup>) tamizados sobre medios sin antibiótico.

### **2.2.2 PURIFICACIÓN DE ADN**

Se realizó una extracción de los fósmidos recombinantes de 4 clonas seleccionadas, con posible actividad de lipasa. Se utilizó el protocolo Fosmid Max<sup>TM</sup> DNA purification kit (Epicentre, 2012b). Las concentraciones de ADN fueron medidas por espectrofotometría en un Nanodrop 2000c.

El análisis de ADNs de los fósmidos extraídos, se realizó a través de un gel de agarosa al 0.8%. Se aplicaron 5µL de las muestras de ADN mezcladas con el buffer de carga de tinción naranja 6x y el marcador 1Kb plus 20,000pb (GeneRuler) y se corrió con el amortiguador TAE 1x durante 40 min a 80 volts con 180 amperes. Al término se realizó la tinción del gel con bromuro de etidio durante 20 min con agitación lenta.

### **2.2.3 DIGESTIÓN DE FÓSMIDOS CON *Bam*HI**

Previo al envío de secuenciación de los fósmidos, se realizó digestión con la enzima *Bam*HI para observar el patrón de restricción en las colonias positivas. La enzima *Bam*HI se utilizó a una concentración de 50U/µL en un coctel de reacción con 2µg de muestra de ADN, 2.5µL de buffer NE 10x, 0.25µL de BSA 100x, 15.75µL de H<sub>2</sub>O y 0.5µL de la enzima. La digestión se incubó durante 2 horas a 37°C y posteriormente se analizó en otro gel de agarosa al 0.8% como se describió anteriormente.

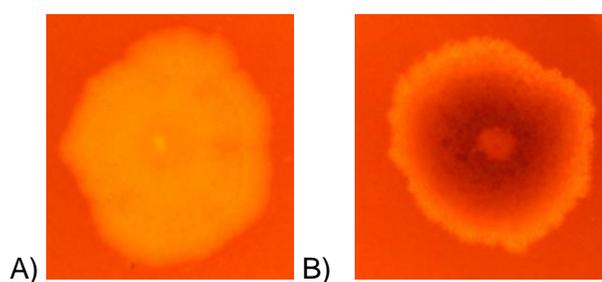
### **2.2.4 SECUENCIACIÓN DE FÓSMIDOS**

Se ajustó la concentración de ADN de cada muestra a 50ng/µL con base en los resultados arrojados por el análisis espectrofotométrico. Cada tubo de muestra se etiquetó para su envío a la Universidad de Utah, USA., para su secuenciación por IonTorrent.

## 2.3 RESULTADOS

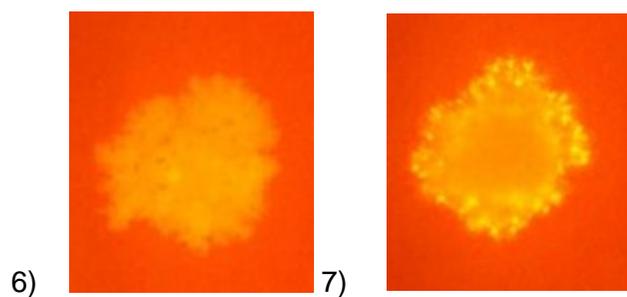
### 2.3.1 CLONAS CON ACTIVIDAD LIPOLÍTICA

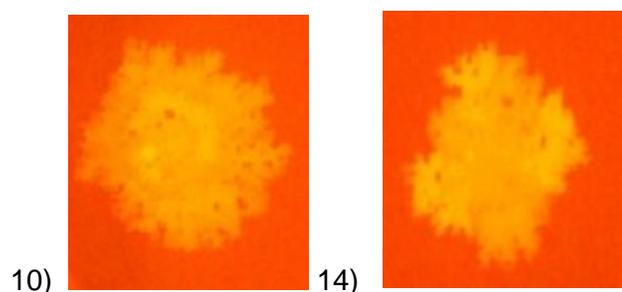
Se comprobó experimentalmente que la cepa utilizada como control positivo de *P. aureoginosa* presentó actividad de lipasa, es decir, forma un halo fluorescente naranja rodeando la colonia. La cepa *E. coli* EPI300™ no generó halo, resultando ser el control negativo. En la figura 2.1 se muestran los controles empleados sobre medios de Rodamina B sin antibiótico.



**Figura 2.1** Controles negativo y positivo para la detección de lipasas en medio de Rodamina B y aceite de olivo. A) Control negativo *E. coli* EPI300™ y B) Control positivo de *Pseudomonas aureoginosa* ATCC27853™. Ambas cepas bacterianas se analizaron a 564nm.

El resultado de las 4 clonas tamizadas sobre el medio selectivo con el indicador Rodamina B se puede observar en la figura 2.2. Se observó un clon (7) con actividad lipolítica; puesto que presentó un halo fluorescente de color naranja bajo luz UV a 564nm. También se eligieron otras 3 clonas adicionales (6,10 y 14) por presentar brillo fluorescente naranja distinto al control negativo.





**Figura 2.2** Clonas metagenómicas con posible actividad lipolítica evaluadas sobre medio LB con Rodamina B y aceite de olivo.

De las 15 clonas previamente identificadas con presunta actividad de lipasa, se observó que el clon número 7 presentó un halo fluorescente de color naranja y las colonias etiquetadas con los números 6, 10 y 14 tuvieron una ligera fluorescencia sobre el medio. El tiempo en el que se pudo apreciar el cambio fue a los 4 días posteriores a la inoculación.

### 2.3.2 PURIFICACIÓN DE ADN LOS FÓSMIDOS POSITIVOS EN MEDIO FUNCIONAL

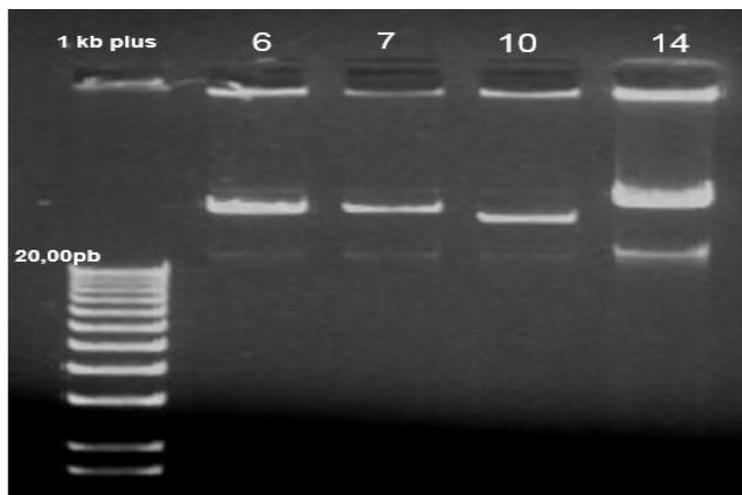
Los resultados de la extracción de los fósmidos de estas clonas se presenta en el cuadro 2.1. Los resultados de concentración de las muestras se obtuvieron con base en los valores espectrofotométricos en Nanodrop 2000c. Todos presentaron concentración de al menos 50ng / $\mu$ L, valor requerido para el servicio de secuenciación.

**Cuadro 2.1** Purificación de ADN de las clonas metagenómicas positivas en el escrutinio de lipasas. El cuadro representa la concentración de cada fósrido obtenido a través de la metodología que propone el kit FosmidMAX™ purification (Epicentre, 2012b).

Clonas	Concentración de ADN ng/ $\mu$ L	Valor mínimo de pureza (260nm/230nm): 1.8-2.2	Valor mínimo de Pureza (260/280): 1.8
6	99.9	2.23	1.90
7	52.2	2.08	1.95
10	78.5	2.12	1.98

14	156.6	2.15	1.96
----	-------	------	------

La figura 2.3 comprueba la purificación de ADN de los fósmidos; observándose para cada muestra bandas por encima del marcador de escalera de 1Kb plus (20,000pb); el tamaño esperado es de aproximadamente 40Kb. La intensidad luminosa de cada fósmino en el gel coincidió con la concentración de ADN determinadas en el Nanodrop 2000c. En la imagen se observan diferentes fragmentos de ADN sobre un mismo carril. Sin embargo se trata de un mismo fragmento, cuya estructura es circular superenrollada y puede verse modificada por la manipulación del ADN. La movilidad electroforética aumentará según el grado de enrollamiento de la estructura.

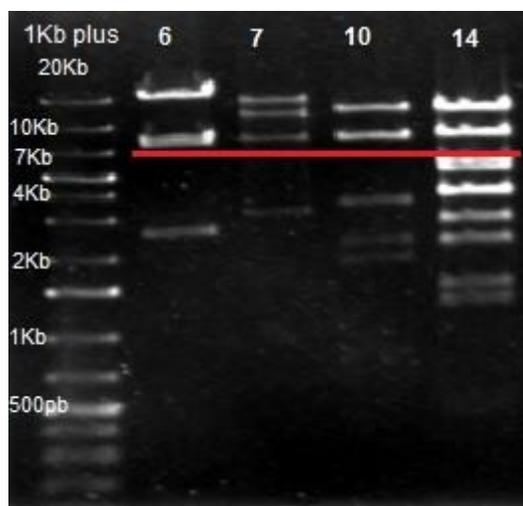


**Figura 2.3** Resultado de electroforesis de los fósmidos aislados de las clonas metagenómicas positivas para el escrutinio funcional de lipasas 6, 7, 10 y 14. Cada fósmino tiene un tamaño aproximado de 40Kb y se analizaron con un marcador de escalera 1Kb plus (20Kb).

### 2.3.3 DIGESTIÓN CON *Bam*HI DE LOS FÓS MIDOS SELECCIONADOS

A través del análisis de restricción con *Bam*HI se pudo observar que el patrón de restricción fue diferente entre sí para cada una de las clonas seleccionadas (Figura 2.4), por lo que se decidió enviar a secuenciar las 4. La enzima *Bam*HI reconoce los sitios GGATCC, localizados en las posiciones 353 y 407 del fósmino pCC2Fos™, permitiendo su

linearización en gel (Epicentre, 2012a). Los cortes también realizaron dentro de las secuencias de los fósmidos recombinantes, lo que produjo diferentes tamaños para cada (Samuelsson, 2012). La banda de los 8,000pb se observa en las cuatro clonas y corresponde a la linearización del fósido pCC2Fos<sup>TM</sup>.



**Figura 2.4** Digestión realizada con la enzima *Bam*HI de los fósidos aislados de las clonas metagenómicas 6, 7,10 y 14. Para el análisis se utilizó el marcador de escalera 1Kb plus (20Kb). La línea roja señala la posición del vector linearizado (8Kb).

#### 2.3.4. SECUENCIACIÓN DE LOS FÓSMIDOS

Las muestras de los fósidos purificados al obtenerse concentradas se ajustaron a un valor de 50ng/ $\mu$ L cada una. Las clonas 7 y 14 se enviaron de manera individual para su secuenciación, y los fósidos 6 y 10 se mandaron mezclados en una sola muestra.

**Cuadro 2.2** Parámetros de purificación para la secuenciación de los fósidos 6, 7,10 y 14. El cuadro representa las características de las muestras de ADN para su secuenciación en la universidad de Utah, USA.

Clona	Etiqueta	Concentración	Volumen
7	JCA7	50ng/ $\mu$ L	25 $\mu$ L

<b>14</b>	JCA14	50ng/ $\mu$ L	25 $\mu$ L
<b>6 y 10</b>	JCA COMB 6 y 10	50ng/ $\mu$ L	25 $\mu$ L

La purificación de ADN obtenida de la extracción fue de alta calidad (limpio e íntegro) para la secuenciación (Okano *et al.*, 2015). La suma de tamaños de cada banda por carril en las digestiones dio en promedio 35Kb. Para explotar si la actividad en nuestras clonas se relaciona con lipasas se realizó un análisis in silico en las secuencias de los insertos en los fósmidos. También se realizó el escrutinio de 5,000 colonias asignadas al grupo de investigación de Miguel Marfil (datos no publicados) con la finalidad de ampliar la búsqueda de lipasas. Sin embargo en los resultados no se observaron clonas con características lipolíticas.

## 2.4 DISCUSIÓN

La clona 7 dio un halo fluorescente naranja: característica reportada en cepas productoras de lipasas. Sin embargo en este trabajo se presentaron algunas colonias con fluorescencia naranja a 564nm “clonas 6,10 y 14” la causa podría ser que estas cepas están produciendo lipasa o que se está formando un complejo entre el agente fluorescente y otra proteína diferente.

Los resultados del presente trabajo son comparables tanto con el reporte de Shu y colaboradores (2009) como con algunos de los primeros reportes de análisis funcional en placas de agar con aceite de olivo y Rodamina B en donde se obtuvieron halos fluorescentes naranjas rodeando a las colonias de *Pseudomonas aureginosa* y *Staphylococcus aureus*, que fueron de los primeros microorganismos en ser estudiados sobre estos medios indicadores (Kouker & Jaeger, 1987; Shu *et al.*, 2009). Trabajos más recientes muestran también la efectividad de esta estrategia en el escrutinio funcional de lipasas (Zheng *et al.*, 2013). La detección es posible a través de un transiluminador con rayos UV a 350nm, ya que sin la irradiación, las clonas presentan un color rosado en la placa y el color naranja fluorescente se presenta por la liberación de ácidos grasos mono o diglicéridos en el medio formando dímeros con la Rodamina B y haciendo soluble al ácido graso (Rajan *et al.*, 2011). Otros reportes proponen que la razón por la cual se da el halo

fluorescente naranja se debe a la formación de complejos de la Rodamina B catiónica con la liberación de iones uranilo por parte de los ácidos grasos; en donde se forman dímeros excitados que absorben a longitud de onda mayor a la de los monómeros base de la Rodamina B (Boonmahome & Mongkoltharuk, 2013). Algunos autores proponen que la fluorescencia en aceite de olivo de organismos productores de lipasas como *Candida antártica* (CALB) es debida a la formación de un conjugado entre los ácidos grasos libres y el agente fluorogénico, y a que la fluorescencia es resultado de una hidrólisis que puede ser observada bajo luz UV (Jarvis & Thiele, 1997; Zisis *et al.*, 2015).

Otras observaciones han demostrado que en algunas cepas productoras de lipasas se forma una coloración oscura en la colonia por la liberación de los grupos éster de los ácidos grasos que se unen a la rodamina al llevarse a cabo la hidrólisis (Jarvis & Thiele, 1997); esto ocurre en el control positivo *P. aureoginosa*. Sin embargo, cabe mencionar que las características en cuanto a fluorescencia no son siempre las mismas, puesto que cada microorganismo se comporta de una manera diferente en el medio de cultivo (Rajan *et al.*, 2011). Por otra parte un estudio realizado de una biblioteca metagenómica de un suelo de la antártica en el 2013 por Bartsun y colaboradores muestra que la proteína metiltioadenosina fosforilasa (RSFP) que liberan algunas cepas de *E. coli* reaccionan con la Rodamina B produciendo fluorescencia que va del rosa al amarillo en una longitud de onda de 200-700nm: esto se debe a que la Rodamina B interacciona con los iones de fosfato y los grupos hidroxilos presentes en 22S y 25Y; además los puentes de hidrogeno formados entre la Rodamina B y algunos de los residuos de aspartato podrían tener un importante papel en la unión de esta molécula a la proteína RSFP (Bartsun *et al.*, 2013). Es decir, otras proteínas además de las lipasas, pueden dar reacción positiva formadora de halo con la Rodamina B.

La comprobación y purificación de fósmidos se realizó siguiendo las estrategias experimentales de otros estudios con base en la elaboración de geles de agarosa, la extracción de ADN de los de los fósmidos y su posterior digestión (Abdel-Fattah & Gaballa, 2008). La observación de las muestras se realizó en luz UV por la reacción que ejerce el bromuro de etidio con los ácidos nucleicos, ya que aproximadamente una molécula de este compuesto se une a 2.5pb de la muestra de ADN por la acción de sus grupos aminobenceno en su estructura tricíclica (Sambrook & Russell, 2001).

Aunque algunos estudios proponen el uso de tributirina como el sustrato base para la identificación de la lipólisis (Glogauer *et al.*, 2011), para este estudio no fue utilizado, debido a que la tributirina es un sustrato de cadena corta (C4) y las lipasas verdaderas hidrolizan los ácidos grasos de cadena larga (LCFA por sus siglas en inglés). Con base en este criterio solo se utilizó el medio de Rodamina B como marcador para observar la lipólisis de forma cualitativa usando aceite de olivo como lípido neutro (Glogauer *et al.*, 2011). El medio con aceite de olivo y Rodamina B es un medio de cribado para la detección de lipasas, que permite la obtención de clonas con halo fluorescente de color naranja como indicador positivo (Shu *et al.*, 2009).

Las lipasas son un grupo de gran importancia para la industria biotecnológica y se ha comprobado que las estrategias que siguen el enfoque metagenómico además de ser confiables y permitir un amplio criterio para la búsqueda de genes, ha sido la forma en la que se han descubierto la mayoría de las hidrolasas disponibles, incluyendo las enzimas lipolíticas (Ma *et al.*, 2015).



## CAPÍTULO III

### ANÁLISIS *in silico* DE LOS FÓSMIDOS DE CLONAS METAGENÓMICAS POSITIVAS DEL ACUÍFERO DE YUCATÁN

#### 3.1 INTRODUCCIÓN

La bioinformática representa una herramienta importante para la solución de problemáticas en aspectos biológicos, implementando algoritmos y herramientas de discusión (Baxevanis & Ouellette, 2004). En el caso del análisis de proteínas, se utilizan para comparar las secuencias de aminoácidos y deducir sus propiedades fisicoquímicas, sus relaciones biológicas y filogenéticas con base en las secuencias homólogas encontradas en las bases de datos de proteínas conocidas, permitiendo predecir el potencial de la actividad funcional de la secuencia propia (De-Sancho & Muñoz, 2011).

Un aspecto importante de la caracterización *in silico* de las secuencias de proteínas es la identificación de los motivos y los dominios, ya que sirven para predecir su estructura y función (Fernández, 2013).

El dominio en una proteína se define como un segmento de una cadena poli-peptídica que puede plegarse de forma independiente en una estructura compacta y estable (Alberts *et al.*, 2006).

Un dominio cumple con una función concreta e incluye regiones no necesariamente contiguas en la secuencia de aminoácidos (Fernández, 2013). En tanto un motivo es un elemento conservado en la secuencia de aminoácidos o nucleótidos que se caracterizan por su forma espacial, es decir son sectores que tienen la misma disposición espacial en diferentes proteínas (Solari, 2004).

Los motivos se generan a partir de alineamientos múltiples de secuencias con elementos funcionales o estructurales similares, por lo que son útiles para predecir la existencia de esos mismos elementos en otras proteínas de función y estructura desconocida (Fernández, 2013).

La búsqueda de secuencias homólogas y programas de interés puede realizarse en la plataforma de National Center for Biotechnology Information (NCBI) (Jiménez *et al.*, 2012). NCBI es un sistema con secuencias, ya sea en nucleótidos o aminoácidos que incorpora la información proporcionada por la plataforma Genbank que reporta las regiones genómicas o codificantes a través de un número de acceso (Baxevanis & Ouellette, 2004). También una manera fácil de encontrar las secuencias ya reportadas, en este caso de lipasas, es por medio de plataformas como la base de datos de ingeniería de lipasas conocida por su nombre en inglés como Lipase Engineering Database (Wang *et al.*, 2010).

Es así como la comparación de la secuencia de interés con las ya reportadas puede realizarse utilizando el programa BLAST, que se encuentra en la plataforma de NCBI; este dará un resultado aproximado de una posible proteína (Zheng *et al.*, 2013). Dentro de esta plataforma también se encuentra el programa “ORF Finder” que permite el análisis de los marcos de lectura abierto de una secuencia nucleotídica, asignando una función putativa basada en BLAST-X (Jiménez *et al.*, 2012).

En este capítulo se analizaron *in silico* las secuencias de las clonas positivas de la biblioteca metagenómica. El análisis informático de lipasas debe ser cuidadoso, debido a la diversidad en la secuencia de aminoácidos; son muy variables en cuanto a dominio y motivos (Kourist *et al.*, 2010).

## **3.2 MATERIALES Y MÉTODOS**

Con las secuencias de ADN (contigs) obtenidas del servicio de secuenciación se realizaron diferentes análisis *in silico*.

### **3.2.1 ANÁLISIS EN VECSCREEN DE NCBI**

Para verificar que cada secuencia estuviera libre de errores y fragmentos de vector que dificultaran los análisis, se utilizó el programa VecScreen de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/vecscreen/>); archivos en formato fasta.

### **3.2.2 REVISIÓN DE SECUENCIAS CRUDAS EN WEBCUTTER 2.0**

Una vez eliminadas *in silico* las secuencias del vector se analizó la integridad de los fósmidos usando el programa web cutter 2.0 (<http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/>) (Heiman, 1997); el análisis se realizó de forma lineal haciendo el mapeo de los sitios de restricción con el uso de la enzima *Bam*HI. También se realizó la digestión en gel de agarosa como se describió en el capítulo 2.

### **3.2.3 ANÁLISIS DE ORFs EN ORFINDER Y BLAST-X EN NCBI**

Se realizó una búsqueda de los posibles marcos de lectura utilizando la plataforma ORFinder en el NCBI, seguida de un análisis BLAST-X en la plataforma de BLAST ® (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Johnson *et al.*, 2008; McGinnis & Madden, 2004). El tamaño asignado para la búsqueda de cada ORFs en cada contig se usó como rango 500pb-1500pb para la búsqueda por homología con el código genético de secuencias de Bacterias y Arqueas. La comparación entre cada secuencia y la base de datos se realizó contra secuencias de proteínas no redundantes con una matriz Blosum 62 y 100 posibles secuencias homólogas.

### **3.2.4 ELABORACIÓN Y ANÁLISIS DE BASES DE DATOS DE LIPASAS**

Se descargaron las secuencias de lipasas reportadas en las plataforma en línea conocida como “the lipase engineering database” (<http://www.led.uni-stuttgart.de/>) (Pleiss *et al.*, 2000). Con esta estrategia se amplió el banco de secuencias para comparar los contigs del presente trabajo. Después se llevó a cabo un análisis en el programa pfectBLAST 2.0 (<https://code.google.com/archive/p/prfectblast/>) (Santiago-Sotelo & Ramirez-Prado, 2012), en donde se crearon 2 bases de datos. Una base de datos con la secuencias de lipasas representativas de cada familia y la otra se creó con las secuencias recibidas de la secuenciación en Utah, USA. Las bases de datos se crearon con la opción “makeblastdb” para aminoácidos y se realizó el alineamiento de forma automática. Esta herramienta permitió hacer análisis BLAST entre las bases de datos y facilitar la búsqueda de genes de lipasa.

### **3.2.5 ANÁLISIS DE ORFs EN GLIMMER**

Se utilizó el programa GLIMMER (Gene Locator and Interpolated Markov ModelER) del paquete Geneious Pro trial 5.4.7 para realizar la búsqueda de genes en los contigs en

estudio. Para ello se ingresaron las secuencias en formato fasta con los mismos criterios de búsqueda para los ORFs asignados anteriormente. El programa GLIMMER esquematiza los ORFs de tal manera que su procesamiento en BLAST-X resulta más sencillo. Además permite obtener información de los ORFs a través de sus ordenamiento en hojas de Excel, organizando los ORFs de estos archivos con el signo ">" más un nombre o numeración antecedendo a cada secuencia de nucleótidos. Como paso final se realizó un MegaBLAST-X ingresando todos los ORFs de cada contig de manera conjunta.

Los nombres de cada ORF en el programa Geneious 5.4.7 fueron asignados con base en el resultado obtenido en cuanto a los valores más altos en identidad, cobertura y valor E (<http://www.geneious.com/basic>) (Kearse *et al.*, 2012).

Así mismo la conversión de nucleótidos a aminoácidos de los ORFs obtenidos por el programa Geneious Pro trial 5.4.7., fue realizada por el programa Translate Expasy, ExPASy (<http://web.expasy.org/translate/>) (Artimo *et al.*, 2012), utilizando el código genético estándar en un formato sin espacios.

### **3.2.6 BÚSQUEDA DE DOMINIOS CON HMMs DE LIPASAS**

Se utilizó Pfam 27.0 para comparar los ORFs con los modelos ocultos de Markov (HMM por sus siglas en inglés) disponibles en la plataforma (<http://pfam.xfam.org/>) (Finn *et al.*, 2015). El análisis se realizó ingresando la secuencia de aminoácidos deducidos de cada ORF, debido a que los modelos en esta plataforma se hicieron con base en proteínas. Fue importante ingresar los ORFs de forma individual para poder llevar a cabo en análisis; puesto que esta base de datos surgió de modelos producidos por el alineamiento de las proteínas registradas de UniProt (UniProtKB).

Se utilizó Superfamily 1.75 para la búsqueda de dominios de lipasas a nivel de súper familias. Este programa utiliza un método de búsqueda de secuencia: que abarca a todas las proteínas de estructura conocida (<http://supfam.org/SUPERFAMILY/>) (Gough *et al.*, 2001). Como cada superfamilia está representada por un grupo de modelos de ocultos de Markov: estos análisis parten de un alineamiento que se hace a nivel de los dominios de un grupo de una superfamilia que tienen una relación evolutiva. Para la realización de este

estudio se dividió cada contig en tamaños de 5Kb para poder efectuar los análisis comparativos.

### 3.3 RESULTADOS

El cuadro 3.1 presenta el tamaño de los contigs ensamblados en las clonas secuenciadas en la universidad de Utah, USA.

**Cuadro 3.1** Tamaño de cada contig por clona.

Clona	Tamaño del contig
6	32968pb
7	33224pb
10	28156pb
14	37783pb

#### 3.3.1 ANÁLISIS BLAST-X DE LOS CONTIGS

Los resultados obtenidos con el BLAST-X en la plataforma de ORFinder con el análisis de cada ORF de los 4 fósmidos de interés fueron negativos para la identificación de proteínas homólogas de lipasa; se predijeron *in silico* proteínas hipotéticas y sin similitud en marcos de lectura menores a los 200pb.

#### 3.3.2 ANÁLISIS EN prfectBLAST DE LOS CONTIGS

Al no tener resultados positivos se optó por el uso del programa prfectBLAST para la elaboración de bases de datos con secuencias reportadas. De nuevo el resultado de identificación de lipasas fue negativo para los 4 fósmidos.

#### 3.3.3 DIGESTIÓN *in silico* DE LOS CONTIGS

Adicionalmente, como una forma de comprobar la calidad de la secuenciación, se realizó una digestión *in silico* de los fósmidos secuenciados con la enzima *Bam*HI y se comparó con los patrones de digestión obtenidos experimentalmente (capítulo anterior). Los resultados de digestión *in silico* y experimentalmente coincidieron, descartando que hubiera habido confusión y se hubiera enviado a secuenciar fósmidos de clonas equivocadas.

**Cuadro 3.2** Digestión *in silico* de los 4 fósmidos recombinantes. El cuadro muestra las características de la digestión *in silico* con *Bam*HI en el programa webcutter2.0.

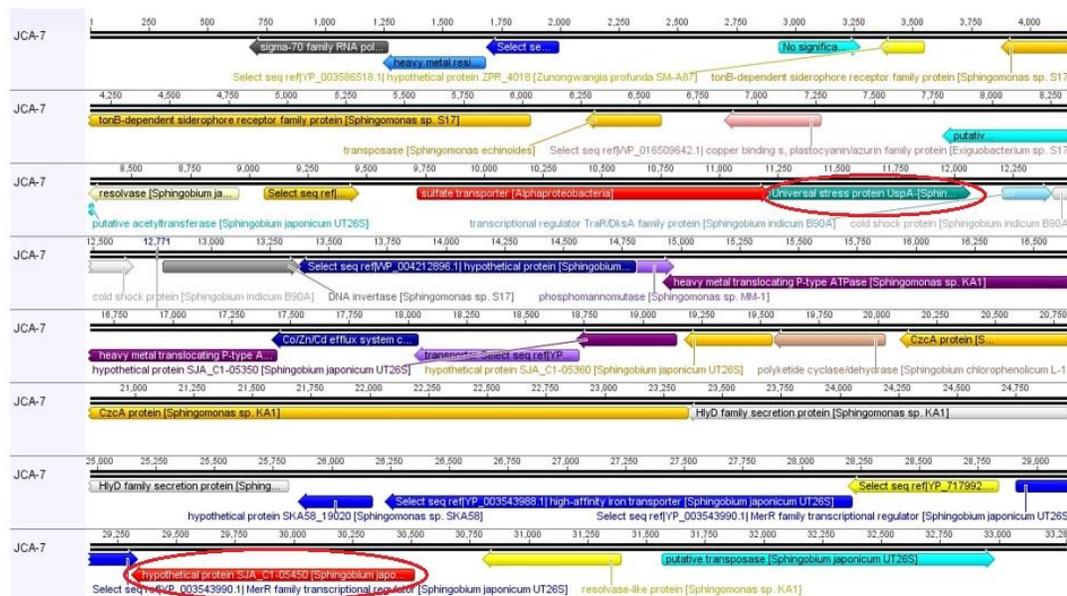
Clonas	Características <i>in silico</i> de cada fósrido	Fragmentos generados en la digestión
6	Tamaño total del inserto 32,968pb con 2 sitios <i>Bam</i> HI; se generó 3 insertos.	7,500pb, 2,474pb, 22,992pb
7	Tamaño total del inserto 33,224pb con 3 sitios <i>Bam</i> HI; se generó 4 insertos.	17,625pb, 3,075pb, 600pb, 11,924pb
10	Tamaño total del inserto 28,156pb con 5 sitios <i>Bam</i> HI; se generó 6 insertos.	1,275pb, 674pb, 2,099pb, 3,449pb, 7,874pb, 12,780pb
14	Tamaño total del inserto 37,783pb con 9 sitios <i>Bam</i> HI; se generó 10 insertos.	1,332pb, 374pb, 2624pb, 12,224pb, 3,675pb, 2024pb, 3,674pb, 1,124pb, 5,099pb

También se prosiguió con el análisis de 375 contigs de la biblioteca metagenómica pertenecientes a clonas secuenciadas por el grupo de trabajo de la doctora Aileen O'Connor Sánchez en el laboratorio de metagenómica; esas clonas no fueron seleccionadas por escrutinio.

### 3.3.4 ANÁLISIS DE LOS CONTIGS EN GLIMMER DE GENIOUS PROT 5.4.7

El análisis *in silico* se realizó con BLAST-X y Glimmer de la plataforma de Genious Prot 5.4.7; estos programas permitieron descartar ORFs de tamaños menores a los 500pb que entorpecían los análisis. El programa facilitó el resultado esquematizando la posición de cada una de las proteínas predichas en los contigs mediante BLAST-X. El concentrado de

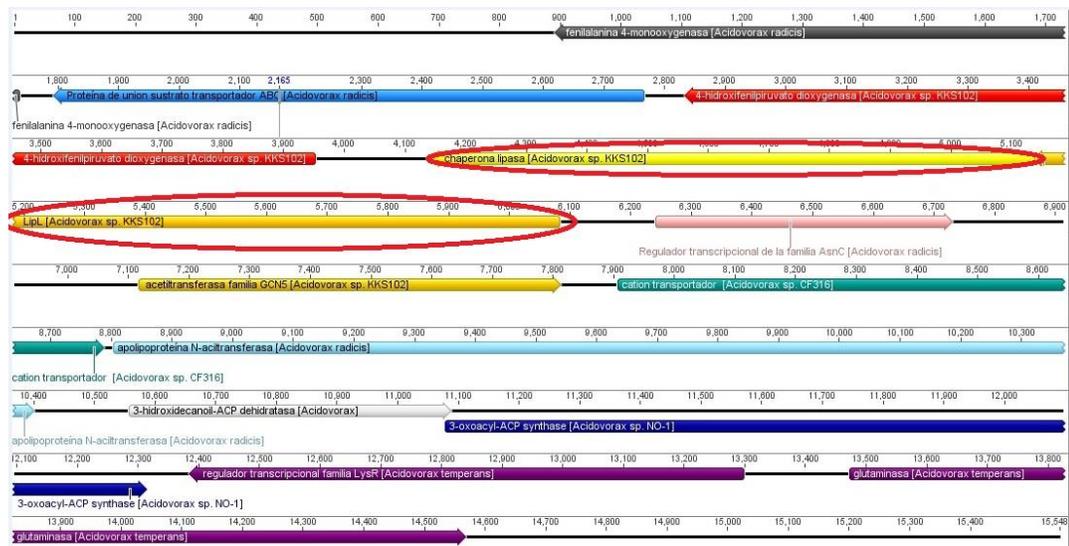
los análisis llevó a encontrar ORFs con identidad de lipasa en los contigs 40 (15548pb) y 99 (6721pb): los resultados se muestran en las figuras 3.2 y 3.3. En cuanto a los resultados para el fósmdo 7 en el que se había observado la mayor actividad lipolítica en el análisis funcional, no se encontraron genes de lipasas, como lo muestra la figura 3.1, y los resultados de los fósmdos 6,10 y 14 se muestran en el anexo 5.3.1. En el contig 7 se encontraron dos proteínas con identidad a hidrolasas; una de ellas con identidad a la proteína hipotética SJA\_C1-05450 [*Shingobium japonicum* UT26S], dominio característico de proteasa, con identidad del 100%, cobertura del 100% y Valor E 0.0. El otro ORF tuvo identidad con la proteína universal de estrés de *Shingomonas hankookensis* (UspA), con 100% de cobertura, un valor E de 0.0 y una identidad del 97%. La figura 3.1 muestra la posición de estos genes en el contig 7.



**Figura 3.1** Análisis del contig 7 en el programa Geneious 5.4.7. La imagen muestra en círculos rojos dos posibles hidrolasas, una con homología con la proteína universal de estrés de *Shingomonas hankookensis* (UspA) y la otra homología con la proteína hipotética SJA\_C1-05450 de *Shingobium japonicum* UT26S.

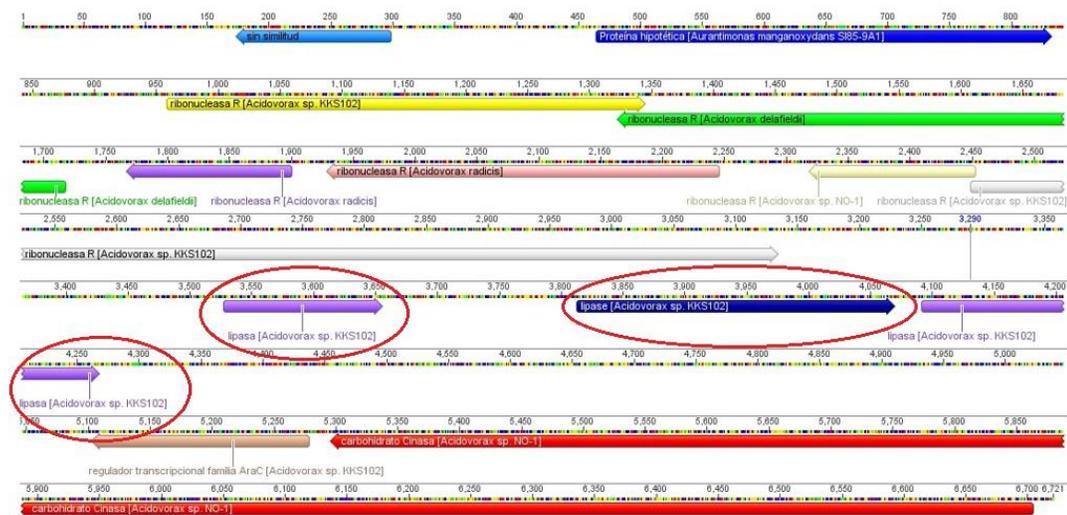
En la figura 3.2 en el contig 40 se identificó una posible lipasa que tuvo homología (97% de identidad, 83% de cobertura y un valor E  $3e^{-167}$ ) en BLAST-X con una lipasa de *Acidovorax* sp. KKS102, que transesterifica y lactoniza intramolecularmente ésteres omega-hidroxiados de ácidos grasos (González-Martínez *et al.*, 2015). Curiosamente cerca de la

lipasa predicha se identificó un ORF con homología de una chaperona de lipasa de *Acidovorax* sp. KKS102 (92% de identidad, 84% de cobertura y un valor E de  $1e^{-126}$ ).



**Figura 3.2** Análisis con el programa Genious 5.4.7 del contig 40. La imagen muestra la identidad de cada ORF dentro del contig y en círculos rojos se muestra una lipasa con homología *LipL* de *Acidovorax* sp. KKS102 y una proteína con homología con una chaperona de lipasa de *Acidovorax* sp. KKS102.

En el contig 99 se predijeron 3 ORFs (2, 3 y 6) con homología con lipasas de *Acidovorax* sp. KKS102. Los genes se muestran en la figura 3.3 y los porcentajes de identidad, cobertura y valor E, se muestran en el cuadro 3.3.



**Figura 3.3** Análisis del Contig 99 en el programa Geneious 5.4.7. En la imagen se muestran en círculos rojos tres genes que presentaron homología con lipasas de *Acidovorax* sp. KKS102.

En resumen, en el análisis *in silico* de los contigs 40 y 99 se encontraron un gen de lipasa posiblemente ligado a una chaperona para el primer caso, y 3 genes de lipasas de forma independiente en contig 99. La búsqueda de ORFs en el análisis Genious Prot 5.4.7 se manejó con un parámetro mínimo de 500pb utilizando el código genético de bacterias con todos los posibles marcos de lectura.

Los análisis *in silico* se continuaron sobre las secuencias de los contigs 7, 40 y 99; el primero por corresponder a una clona que genera un halo naranja fluorescente como lo describe la literatura y los otros dos por contener genes con homología con lipasa. Los resultados de homología obtenidos por BLAST-X se muestran en el cuadro 3.3 junto al resultado proporcionado por los softwares de TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) (Krogh et al., 2001) y SignalP 4.0; este último permite la predicción de péptido señal con base en las regiones transmembranales (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-4.0/>) (Petersen et al., 2011). A los genes de hidrolasa del contig 7 se les asignó la etiqueta de HidJ1 e HidJ2. Así mismo los ORFs de los contigs con posible identidad a lipasa se etiquetaron como LipJ4 para el contig 40 y como LipJ1, 2, y LipJ3 para el contig 99. La chaperona se identificó con la etiqueta ChapJ4.

**Cuadro 3.3** Características de los ORFs analizados en los programas BLAST-X, SignalP 4.0 y TMHMM 2.0. El cuadro muestra las características de homología en BLAST-X (cobertura, valor E e

identidad). También se utilizó el programa TMHMM 2.0 para predecir dominios transmembranales y el programa SignalP 4.0 para predecir péptidos señal.

Contig y ORF	Nombre y tamaño	Descripción	Cobertura, Valor E e Identidad	Péptido señal	TMHMMs
7-10	<i>HidJ1</i> (858pb)	Proteína universal de estrés UspA [ <i>Sphingomonas</i> sp. RIT328]	97%, $4e^{-171}$ y 92%	no	Proteína soluble
7-1	<i>HidJ2</i> (1290pb)	Proteína hipotética SJA_C1-05450 [ <i>Sphingobium japonicum</i> UT26S]	93%, 0 y 99%	no	Proteína soluble
40-28	<i>ChapJ4</i> (990pb)	Chaperona de lipasa [ <i>Acidovorax</i> sp. KKS102]	84%, $1e^{-126}$ y 92%	no	Con dominio transmembranal
40-27	<i>LipJ4</i> (1,125pb)	LipL [ <i>Acidovorax</i> sp. KKS102]	83%, $3e^{-167}$ y 97%	no	Proteína soluble
99-3	<i>LipJ1</i> (657pb)	Lipasa [ <i>Acidovorax</i> sp. KKS102]	79%, $8e^{-108}$ y 91%	no	Proteína soluble
99-15	<i>LipJ2</i> (879pb)	Lipasa [ <i>Acidovorax</i> sp. KKS102]	94%, 0 y 92%	no	Proteína soluble
99-6	<i>LipJ3</i> (810pb)	Lipasa [ <i>Acidovorax</i> sp. KKS102]	44%, $6e^{-67}$ y 88%	no	Proteína soluble

### 3.4.5 BÚSQUEDA DE DOMINIOS CONSERVADOS DE LIPASA POR HMMs

Se realizaron análisis de las secuencias comparado con las bases de datos del Pfam y de Superfamily, plataformas encargadas de realizar alineamientos con modelos ocultos de markov (Hidden Markov Models “HMMs”) prediseñados. Los resultados obtenidos se presentan en los cuadro 3.4 y 3.5 respectivamente.

En ambas plataformas el contig 7 no tuvo ORFs con dominios de lipasa, sin embargo se encontraron 2 ORFs con dominios de hidrolasas (Cuadro 3.4). Para el contig 40 se encontraron 2 ORFs: uno de ellos presentó un dominio a una chaperona de lipasa y el otro fue un dominio abyhidrolasa (Cuadro 3.4). En el contig 99 se identificó un solo dominio de abyhidrolasa 6 en sólo uno de los tres ORFs identificados previamente con Genius Prot 5.4.7.

**Cuadro 3.4** Resultados del análisis en Pfam 27.0 de los ORFs presentes en los contigs (7, 40 y99). El análisis muestra los ORFs en estudio, la descripción del dominio que presentan, el tamaño del HMM y el valor E.

Contig 7	Familia	Descripción (Dominio)	Tamaño de HMM	Valor E
ORF11	Asp proteasa_2	Aspartil proteasa	90aa	1.3e <sup>-07</sup>
	Asp proteasa_2	Aspartil proteasa	90aa	1.4e <sup>-06</sup>
	PDZ_2	PDZ	82aa	1.9e <sup>-07</sup>
ORF 10	USP	Proteína universal a estrés	140aa	3.8e <sup>-13</sup>
	USP	Proteína universal de respuesta a estrés	140aa	1.1e <sup>-11</sup>
Contig 40	Familia	Descripción (Dominio)	Tamaño HMM	Valor E

ORF5	Lipase_chap	Chaperona de lipasa protobacterial	195aa	2.5e <sup>-37</sup>
ORF6	Abhydrolasa	Plegamiento alfa/beta hidrolasa	230aa	4.9e <sup>-12</sup>
<b>Contig 99</b>	<b>Familia</b>	<b>Descripción (Dominio)</b>	<b>Tamaño aa</b>	<b>Valor E</b>
ORF 2	Sin valor	Sin valor	Sin valor	Sin valor
ORF 3	Abhydrolasa_6	Plegamiento alfa/beta hidrolasa	228aa	1.3e <sup>-29</sup>
ORF 6	Sin valor	Sin valor	Sin valor	Sin valor

Los resultados de Pfam se compararon con el resultado obtenido en la plataforma de Superfamily 1.75. Los dominios “abhydrolasa” son característicos en los genes de lipasas.

**Cuadro 3.5** Análisis de ORFs con Superfamily 1.75. El cuadro muestra los dominios obtenidos a través de los modelos ocultos de Markov en los contigs 7,40 y 99 utilizando la plataforma de superfamily 1.75. También se muestra el valor E.

<b>Contig 7</b>	<b>Dominio de superfamilia</b>	<b>Valor E</b>
ORF 10	Adenin nucleótido alfa hidrolasa	1.42e <sup>-18</sup>
ORF11	Dominio PDZ	3.81e <sup>-11</sup>
<b>Contig 99</b>	<b>Dominio de superfamilia</b>	<b>Valor E</b>
ORF 2	Alfa/beta hidrolasa	1.89e <sup>-39</sup>
ORF 3	Alfa/ beta hidrolasa	3.65e <sup>-55</sup>
ORF6	Alfa/beta hidrolasa	2.63e <sup>-17</sup>
<b>Contig 40</b>	<b>Clasificación superfamilia</b>	<b>Valor E</b>
ORF1	Alfa/beta hidrolasa	1.53e <sup>-43</sup>

ORF2	Chaperona de lipasa	1.83e <sup>-48</sup>
------	---------------------	----------------------

### 3.4 DISCUSIÓN

A pesar de no obtener resultado de homología en el fósido 7, no se descarta la posibilidad que en algunos de los ORFs con identidad de hidrolasa se encuentre un gen de lipasa no canónica, que difiera de las secuencias ya conocidas. Cabe mencionar que en el escrutinio funcional el halo fluorescente naranja solo se detectó en la clona 7, por tanto las colonias 6,10 y 14 podrían ser negativas, lo que explica los resultados *in silico*. También existe la posibilidad que los contigs no correspondan al inserto completo y las lipasas estén en la región no ensamblada de la secuencia del inserto.

Jiménez y colaboradores (2012) tuvieron dificultades en encontrar su gen de lipasa, puesto que sus ORFs no presentaron homología con hidrolasas en BLAST-X, y recurrieron a la transposición, identificando el gen responsable de la lipólisis por pérdida de función. Observaron que el gen que buscaban, presentó 25% de identidad con una peroxidasa en BLAT-X (Jiménez *et al.*, 2012).

En otro estudio Chow y colaboradores (2012) agruparon las enzimas lipolíticas reportadas de 40 metagenomas y lograron demostrar que sus genes de lipasa (*LipS* y *LipT*) pertenecen a dos familias nuevas que se agrupan de manera independiente de las propuestas por Arpigny y Jaeger en 1999. A pesar de la dificultad para la construcción de este árbol filogenético por la carencia de regiones conservadas en las secuencias de las 8 familias conocidas, estos autores toman como criterio, los “scores” proporcionados por el programa T-coffe y una inspección visual de aminoácidos conservados que coloca a *LipS* y *LipT* junto a otros de sus homólogos, en clados separados dentro de su árbol filogenético (Chow *et al.*, 2012).

En BLAST-X, *LipS* reveló una identidad del 100% con la esterasa de *Symbiobacterium thermophilus* (YP\_075874) y *LipT* mostró una identidad del 97% con la esterasa de *Thermus scotoductus* (YP\_004201971.1) (Chow *et al.*, 2012).

La disponibilidad de las secuencias de los fósmidos hizo posible la realización del análisis *in silico* para la búsqueda de enzimas lipolíticas por homología de secuencia y/o por búsqueda de dominios en los modelos ocultos de Markov. Los modelos ocultos de Markov permiten realizar un análisis más amplio y así llegar fácilmente a los dominios catalíticos, como el dominio abyhidrolasa que se encuentra en las enzimas lipolíticas (Okano *et al.*, 2015). También fue posible explorar el mecanismo de secreción extracelular por la presencia o ausencia del péptido señal, el cual indica que la proteína es citoplasmática o predecir que su mecanismo de secreción es independiente del péptido señal (Okano *et al.*, 2015). Con el programa SignalP 4.0 de la plataforma de Expasy no se encontraron lipasas con péptido señal: por lo que la mayoría de los ORF en estudio fueron clonados con la etiqueta de 6-His en la posición N-terminal, similar al descrito por, Ma y colaboradores (2015). El uso de herramientas bioinformáticas para la identificación de genes de lipasas por homología (BLAST) u otras herramientas para la identificación de secuencias motivo, amplió substancialmente los resultados de los escrutinios funcionales, y permitió un mayor acercamiento a la identificación de posibles lipasas, puesto que no todas se expresan con facilidad en los organismos (Levisson, 2009).

Con los análisis de homología de BLAST-X y Pfam se pudo encontrar ORFs con identidades con lipasa en los contigs 99 y 40 con dominios catalíticos abyhidrolasa, característico de lipasas con plegamiento  $\alpha/\beta$  hidrolasa. Los estudios de Pfam son utilizados para la búsqueda de ORFs que por su baja homología no dieron resultados exitosos en BLAST-X o para respaldar el resultado de identidad a través de los modelos ocultos de Markov que permiten encontrar dominios de familias de lipasas.

Kim y colaboradores (2008) describieron lipasas *LipA1*, *LipA2* y *LipA3*, y una chaperona (*LipB*) de *Acinetobacter* sp. DY129 Sin embargo con la plataforma de Pfam determinaron los dominios de lipasa presentes en algunos de los genes: “Abhidrolasa\_1”, “Lipasa\_2” y “*LipA*”.

## CAPÍTULO IV

### SUB-CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DE GENES DE LIPASAS DEL METAGENOMA DEL ACUÍFERO DE YUCATÁN

#### 4.1 INTRODUCCIÓN

La manipulación genética es una herramienta usada para la producción enzimática, ya sea utilizando la enzima original o modificándola para aumentar su actividad catalítica sobre los sustratos; la enzima puede ser expresada de manera constitutiva o inducible bajo condiciones controladas. Una expresión óptima depende no solo de las fuentes de nitrógeno, carbono y lípidos, sino también de condiciones de pH, temperatura y oxígeno disuelto (Christopher, *et al.*, 2014). Una gran cantidad de reportes indican que las lipasas son altamente inducibles y que su sobre-expresión es una ventaja para la industria en la transformación de los lípidos (Christopher *et al.*, 2014; Hasan *et al.*, 2006).

La alta producción de lipasas depende de la eficiencia en la expresión y la comprensión de los mecanismos moleculares que regulan la secreción y el plegamiento de la misma (Hasan *et al.*, 2006). Los dos sistemas de secreción de lipasas están dados por dos vías diferentes, el primero que involucra la ruta de secreción de tipo II, que necesita de un péptido señal. La segunda vía está dada por la participación de chaperonas que permiten el plegamiento y secreción de las proteínas (Kim *et al.*, 2008). En este caso el buen funcionamiento de esas lipasas está dado por el acompañamiento postraduccional de las proteínas encargadas de su plegamiento (Martini *et al.*, 2014).

*E. coli* se ha utilizado como organismo hospedero de expresión lipolítica, en numerosos trabajos de prospección de lipasas en metagenomas ya que la cepa silvestre no interfiere en los escrutinios funcionales y las grandes cantidades de enzima que se produce permite la fácil visualización de la desesterificación de los ácidos grasos de los sustratos artificiales como la trioleína o el p-nitrofenil palmitato (Hasan *et al.*, 2006; Tian *et al.*, 2015).

En el presente estudio se realizó la sub-clonación de los ORFs de las hidrolasas encontradas en el contig 7 para explorar si manifiestan la actividad de lipasas sobre medios de escrutinio funcional, de tal manera que se les pudiera identificar funcionalmente, ya que

*in silico*, no fue posible encontrar homología con lipasas. Así mismo, se realizó la sub-clonación de los ORFs con identidad de lipasa de los contigs 40 y 99. Cabe mencionar que estos dos contigs pertenecen al trabajo del C. de Dr. Miguel, donde fueron secuenciadas 7200 clonas en pool de la biblioteca metagenómica del Acuífero de Yucatán (72 muestras con 100 CFU dentro de cada una).

Los resultados de la identificación de lipasas corresponden a los contigs 40 y 99 ensamblados en los análisis bioinformáticos, pero no se sabe a qué clona de la biblioteca metagenómica corresponden.

La tecnología empleada para la sub-clonación fue el sistema aLICator™ LIC que consiste en una clonación y expresión génica rápida en *E. coli* BL21 (Thermo Scientific, Cat. No. K1291, USA). Este sistema permite optimizar la clonación en un 95% sin necesidad de emplear el proceso de ligación o la digestión enzimática. Utiliza los vectores pLATE (Figura 5.1) que son de alto nivel de expresión, con un mínimo de inducción. El sistema requiere el uso de la T4 ADN polimerasa que permite crear extremos cohesivos (12-14pb) entre el vector y el inserto de ADN y la ligación se lleva a cabo por recombinación homóloga.

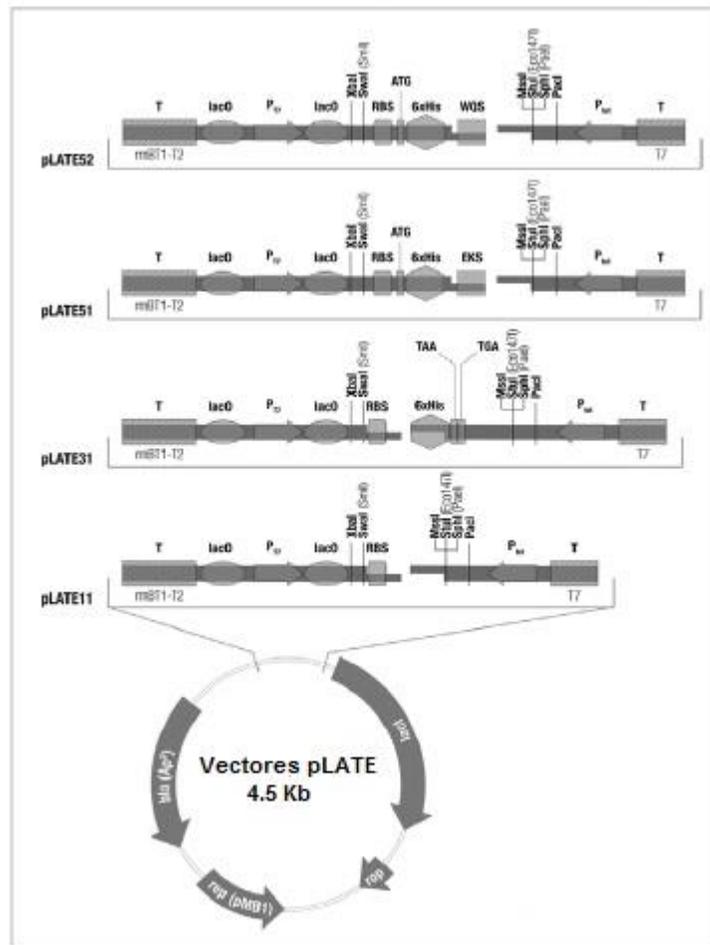
En el cuadro 4.1 se muestran las características de los vectores (pLATE 11, 31 y 52), donde se puede observar que el sistema de purificación cambia según el tipo de vector. El pLATE 31 y 52 emplean una etiqueta de polihistidina que permite la purificación de proteínas por afinidad en columnas de zinc, con la diferencia que el vector pLATE 52 permite la remoción de la etiqueta de polihistidinas con la proteasa WELQut (Thermo Scientific, Cat. No. K1291, USA).

La posición de la etiqueta cambia en las diferentes versiones del vector, río arriba o río abajo del sitio de clonación, quedando el péptido señal en los extremos N-terminal o C-terminal respectivamente en la proteína expresada. El otro vector (pLATE 11) permite la clonación de insertos que no se van a secretar. El cuadro 4.1 muestra las características de cada vector nos para la clonación y purificación de los genes de interés.

**Cuadro 4.1** Características de los vectores pLATE 11,31 y 52 (Thermo Scientific, Cat. No. K1291, USA). Se indica la posición de la etiqueta de histidina, el sitio de corte por proteasas, y los adaptadores requeridos en los oligonucleótidos para amplificar los insertos para su clonación.

Vector LIC	Etiqueta de purificación (6x-His)	Sitio de reconocimiento por proteasa	Adaptadores para el diseño de oligonucleótidos
<b>pLATE 11</b>	-----	-----	<p>pLATE 11 primer forward: 5'-AGAAGGAGATATAACT<b>ATG</b>-3'</p> <p>pLATE 11 primer reverse: 5'-GGAGATGGGAAGTC<b>ATTA</b>-3'</p>
<b>pLATE 31</b>	C-terminal	-----	<p>pLATE 31 primer forward: 5'-AGAAGGAGATATAACT<b>ATG</b>-3'</p> <p>pLATE 31 primer reverse: 5'-GTGGTGGT<b>GATGGT</b>GATGGCC-3'</p>
<b>pLATE 52</b>	N-terminal	WELQut (WELQ)	<p>pLATE 52 primer forward:5'-GGTTGGGAATTGCAA - 3'</p> <p>pLATE 52 primer reverse: 5' GGAGATGGGAAGTC<b>ATTA</b>-3'</p>

La T4 ADN polimerasa restaura la cadena de ADN de 5' a 3' incorporando dNTPs y en sentido contrario de 3' a 5' expone una actividad exonucleasa: ambas reacciones son equilibradas por la presencia de dGTP en la reacción. Los vectores de pLATE controlan la transcripción del gen clonado a través del promotor T7 ARN polimerasa, la expresión génica es regulada por dos operadores lac0 (Thermo Scientific, Cat. No. K1291, USA). El vector incluye 2 promotores que regulan la expresión basal; el promotor  $P_{tet}$  produce la expresión basal del promotor T7 y el represor lacI lo controla. El gen  $\beta$ -lactamasa confiere a la cepa *E. coli* BL21 (DE3) resistencia a ampicilina. En la figura 4.1 se puede apreciar cada uno de los componentes de los vectores de pLATE y su distribución a lo largo de la secuencia.



**Figura 4.1** Estructura de los vectores pLATE. La figura muestra los promotores “P<sub>tet</sub>” y “P<sub>T7</sub>.” TrnBT1-T2” que es el terminador del proceso de transcripción y “T7” es el terminador del promotor T7. El símbolo “lac0” es el operador lac y su represor se identifica por la abreviación “lacI”. “RBS” es el sitio de unión al ribosoma. “EKS” es la secuencia de reconocimiento de la enteroquinasa y “WQS” es la secuencia de reconocimiento de la proteasa WELQut. El origen de replicación del plásmido “rep (pMB1)”. “6X-His” representa la etiqueta de polihistidina y “bla” el gen de β-Lactamasa. El número de copias del plásmido es regulador por la proteína rob (modificado de Thermo Scientific, Cat. No. K1291, USA).

En este trabajo se optó por utilizar los 3 vectores que propone el kit. Los dos genes que se encontraron juntos en el contig 40 (*LipJ4-ChapJ4*) se subclonaron en el sistema pLATE 11.

Para el inserto de la chaperona se utilizó el vector pLATE 31 que tiene su etiqueta en C-terminal y para los ORFs que no tienen péptido señal se utilizó el vector pLATE 52 que tiene la etiqueta de 6His en N-terminal.

## 4.2 MATERIALES Y METODOLOGÍA

### 4.2.1 ELABORACIÓN DE OLIGONUCLEÓTIDOS

El diseño de oligonucleótidos se realizó de manera manual, y posteriormente se verificaron con el programa oligo analyzer, para determinar porcentaje de GC y Tm de cada alineamiento y para descartar la formación de posibles estructuras secundarias (<http://www.idtdna.com/calc/analyzer>) (Owczarzy *et al.*, 2008).

El diseño de oligonucleótidos se realizó para hacer la sub-clonación independiente de ligación del sistema LIC de Thermo scientific en los vectores de pLATE. Estos vectores tienen una secuencia río arriba y río abajo del sitio de clonación que permite ligar el fragmento de interés en él, por medio de adaptadores que se agregaron a cada ORF y permiten la recombinación homóloga. El cuadro 4.2 muestra los oligonucleótidos de cada hidrolasa y lipasa junto a su respectivo adaptador de nucleótidos (rojo).

Del contig 7 se eligieron los marcos de lecturas correspondientes a la *HidJ1* y *HidJ2*. Para los 2 ORFs de interés del contig 40 (*LipJ4* y *ChapJ4*), se diseñaron tres juegos de oligonucleótidos: un juego para cada ORF por separado y un juego de oligonucleótidos para amplificar la secuencia de los 2 ORFs juntos.

El diseño se realizó también para el contig 99 que posee de lipasas: *LipJ1*, *LipJ2* y *LipJ3*. Los resultados del diseño de oligonucleótidos para cada ORF se muestran en el cuadro 4.2. Los oligos se sintetizaron en el Parque de Innovación AgroBioTeq, Guanajuato, México.

**Cuadro 4.2** Oligonucleótidos con los adaptadores (cursiva) del sistema pLATE para la sub-clonación en los vectores de pLATE 11, 31 y 52.

Oligos para el sistema LIC Thermo scientific.			pLATE
ORF	Oligo forward	Oligo reverse	
<i>LipJ1</i>	5'GGTTGGGAATTGCAAATGG GGCGCGCCGATG	3'GGAGATGGGAAGTCATC AGGGTGTTCGCGCGC	52
<i>LipJ2</i>	5'AGAAGGAGATATAACTATG GAAGAAAAACCATCACTGC CG	3'GTGGTGGTGATGGTGAT GGCCTTTTTGTGAATTTT CTGGGGCGC	31
<i>LipJ3</i>	5'AGAAGGAGATATAACTATG GCC GCACGCGCC	3'GTGGTGGTGATGGTGAT GGCCGGCTGGTCGTCCAG CCGC	31
<i>LipJ4</i>	5'GGTTGGGAATTGCAAATGC GTCAAAAGCTTTCATGGCG	3'GGAGATGGGAAGTCATT ACAGGCCTTGCTGCTTGA GG	52
<i>ChapJ4</i>	5'AGAAGGAGATATAACTATG GCCCAACCCTTGCGC	3'GTGGTGGTGATGGTGAT GGCCGGAGCCCGAAGCG CCC	31
<i>LipJ4- ChapJ4</i>	5'AGAAGGAGATATAACTATG CGTCAAAAGCTTTCATGGCG	3'GGAGATGGGAAGTCACT AGGAGCCCGAAGCGCC	11
<i>HidJ1</i>	5'GGTTGGGAATTGCAACTGA GGAGAGGGCTTATGAACCG	3'GGAGATGGGAAGTCATC AGCGTACCAACAGTACCG G	52
<i>HidJ2</i>	5'GGTTGGGAATTGCAAGTGG CTGGAGCATGTAACCG	3'GGAGATGGGAAGTCATC AATAATAATCGGCCAGCCT GAGC	52

#### 4.2.2 SUB-CLONACIÓN *in silico*

Previo a la síntesis de Oligonucleótidos se realizó una sub-clonación *in silico* con el software de SnapGene (de GSL Biotech; disponible en <http://www.snapgene.com/>), para verificar que el ORF ingresara en el marco de lectura correcto. Se ingresaron dentro del software las secuencias de lipasas y de los vectores pLATE 11, 31 y 52, y se marcaron las secuencias de los extremos para utilizarse como adaptadores en los oligonucleótidos. En otro archivo se ingresaron los oligos diseñados manualmente con los adaptadores y se realizó la clonación *in silico* del posible amplicón de la secuencia de interés con el vector de pLATE correspondiente. Los programas de apoyo para el análisis fueron MEGA 6.0 (Tamura *et al.*, 2013), ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) de The European Molecular Biology Laboratory (EMBL) y la plataforma de Translate ExpASY.

#### 4.2.3 AMPLIFICACIÓN POR PCR DE FÓSMIDO

Para realizar la amplificación cada muestra de fósido se usó a 50ng/μL. Posteriormente se realizó un coctel de reacción (buffer 10x, MgSO<sub>4</sub> a 50mM, dNTPs a 10mM, oligos con adaptadores forward y reverse a 10μM, Platinum Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity a 5U/μL, ADN y agua ultrapura) para las muestras de ADN de *HidJ1* e *HidJ2*, preparando 3 reacciones que incluyen un blanco (agua ultrapura). La concentración final para cada elemento del coctel de reacción fue, buffer, 1x, MgSO<sub>4</sub>, 2mM, Mix Nucleotide, 0.2mM para cada dNTP, oligos con adaptadores forward y reverse, 1μM, Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity a 1U/rxn (Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity, Invitrogen, No. Cat. 11304-011).

Los parámetros para el termociclador fueron los siguientes: 95°C 3min, 95°C 30seg, la temperatura de alineamiento varió con cada hidrolasa por su valor de T<sub>m</sub> (*HidJ1* 57°C e *HidJ2* 56.3°C), 72°C 1min, 30X, 72°C 5min.

#### 4.2.4 PURIFICACIÓN DE ADN EN GEL DE ELECTROFORESIS

Una vez corroborado el resultado en gel, se realizó el corte sobre un transiluminador con luz UV de las bandas de ADN de interés y posteriormente se purificó cada uno empleando la técnica de Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Cat. No. A9282, USA).

Finalmente se realizó la medición de ADN por espectrofotometría a D.O. de 280/260 y 260/230. Las muestras purificadas se almacenaron a -20°C hasta su uso.

#### **4.2.5 AMPLIFICACIÓN POR PCR DE POOLS DE FÓSMIDOS**

Se realizó la amplificación por PCR de las *LipJ1*, *LipJ2*, *LipJ3* (contig 99) y *LipJ4*, la chaperona de lipasa *ChapJ4* y el complejo *LipJ4-ChapJ4* (contig 40) en 18 pools de 400 colonias cada uno. Las mezclas de cada pool se crecieron en 10mL de medio LB con cloranfenicol y arabinosa durante 12horas a 180rpm y 37°C. Después se extrajo el ADN de cada muestra con el kit “FosmidMAX-DNA purification” y la concentración se ajustó a 50ng/μL con agua libre de nucleasas. Para optimizar el tiempo y el reactivo se realizó la amplificación de las 18 muestras de ADN únicamente con los oligos correspondientes al inserto fusionado *LipJ4-ChapJ4* (2118pb). La amplificación se realizó utilizando la enzima GoTaq® DNA Polymerase, 5U/μL, Green GoTaq® reaction buffer, 5x, MgCl<sub>2</sub>, 7.5mM, y PCR Mix Nucleotides, 10mM para cada dNTP (GoTaq® DNA Polymerase, No. Cat M3001). Con una concentración final de la enzima GoTaq® DNA Polymerase, 0.75U/μL, Green GoTaq® reaction buffer, 1x, MgCl<sub>2</sub>, 1.5mM, y PCR Mix Nucleotides, 0.2mM para cada dNTP.

Para evaluar los tamaños de los productos de amplificación, estos se analizaron en geles de agarosa y se compararon con los tamaños de las bandas del marcador 1Kb plus geneRuler™. Los parámetros de amplificación fueron los mismos a los utilizados en el apartado 4.2.3., con excepción de las temperaturas de alineamiento: *LipJ1*, 60°C, *LipJ2*, 57°C, *LipJ3*, 62°C, *LipJ4* 57°C, *LipChapJ4*, 62°C y *LipJ4-ChapJ4* 57°C. La purificación se realizó utilizando el kit de wizard Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Cat. No. A9282, USA).

#### **4.2.6 SUB-CLONACIÓN Y SECUENCIACIÓN**

La clonación de los fragmentos se llevó a cabo en los vectores pLATE 11, 31 Y 52 del kit aLICator™ LIC Cloning and Expression System (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las especificaciones del proveedor. Se realizó la transformación introduciendo cada plásmido por choque térmico dentro de células quimiocompetentes de TOP10 (Invitrogen). La verificación de los constructos se realizó por PCR en colonia, utilizando los oligonucleótidos LIC proporcionados por el kit que flanquean el gen de interés en el sitio de clonación.

Posteriormente se enviaron a secuenciar los insertos clonados en el Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LAMBAMA) del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C. (IPICYT) por el método de Sanger.

#### **4.2.7 TRANSFORMACIÓN Y SOBRE-EXPRESIÓN EN CÉLULAS BL21 (DE3)**

Se llevó a cabo una extracción del ADN plasmídico (TOP10) siguiendo la metodología del protocolo QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN, Cat. No. 27106). Una vez obtenido el plásmido, la concentración se ajustó a 50ng/ $\mu$ L para posteriormente introducirlo por choque térmico en *E. coli* BL21 (DE3) siguiendo las instrucciones de manufactura de Thermo Fisher Scientific. Al término se indujo cada cepa con Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración de 0.1mM por litro de medio funcional.

#### **4.2.8 LISIS CELULAR**

Como la secreción de lipasa no se observó, se optó por lisar las células. Las células transformadas fueron colectadas por centrifugación y se transfirieron a 600mL de medio Luria Bertani (LB), con 100mg mL<sup>-1</sup> de ampicilina, y se incubaron a 37°C con 180rpm hasta alcanzar un valor de 0.5 a D.O. de 600nm. Después se agregó 0.1mM L<sup>-1</sup> de IPTG y se continuó el cultivo por 14h a 25°C. Consecutivamente se centrifugó a 4°C, 4,000 rpm durante 15min y al término el sobrenadante se descartó y el precipitado se resuspendió en 15mL de amortiguador (2.5mM L<sup>-1</sup> Tris-HCl, 4mM CaCl<sub>2</sub>, 1% (V/V) Triton X-100, 150mM L<sup>-1</sup> NaCl) y para aquellos casos en los que la clona tuviera la etiqueta de polihistidina se agregaron 50mM imidazol. Las células fueron sonicadas en baño de ultrasonidos por 10 min. Después se centrifugó a 14000rpm, 4°C por 15min y se filtró el sobrenadante en condiciones asépticas de campana. Al final las muestras filtradas se almacenaron a -80°C con glicerol al 50%.

#### **4.2.9 ENSAYO DE ACTIVIDAD LIPASA**

El ensayo funcional para detectar la actividad lipolítica se realizó colocando discos de papel filtro sobre placas con medio LB conteniendo 0.001% de Rodamina B, 1% de aceite de olivo y ampicilina (100 $\mu$ g/mL). El extracto crudo (10 $\mu$ L, 20 $\mu$ L, 30 $\mu$ L) se aplicó sobre los filtros y las placas se incubaron a 37°C durante 1 día. Los resultados positivos se observaron a

564nm en un fotodocumentador por la presencia de un halo fluorescente naranja alrededor de cada filtro.

#### **4.2.10 ANÁLISIS DE SECUENCIA Y ESTUDIO FILOGENÉTICO DE *LipJ4***

La predicción de la estructura secundaria ( $\alpha/\beta$  hidrolasa) del gen *LipJ4* se realizó en la plataforma Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/Phyre2/html/page.cgi?id=index>) y la estructura 3D se predijo a través del programa I-TASSER (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>). La observación de la estructura 3D fue posible mediante la utilización del programa PYMOL 0.99rc6 de Schrodinger (<https://www.pymol.org/>) por medio de una base de datos PDB. La información sobre las posibles funciones de las secuencias analizadas se obtuvo de las familias de lipasas en el GenBank NCBI.

El alineamiento de secuencia se realizó a través de Mega 6.0 y ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Posteriormente el alineamiento se editó con ayuda de BoxShade ([http://www.ch.embnet.org/software/BOX\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html)).

Los análisis filogenéticos llevados a cabo por el método de Neighbor-Joining (NJ), Bootstrap de 1000, y el método de Maximun-Likelihood (ML), Bootstrap 1000.

#### **4.2.11 ESPECIFICIDAD DE SUSTRATOS**

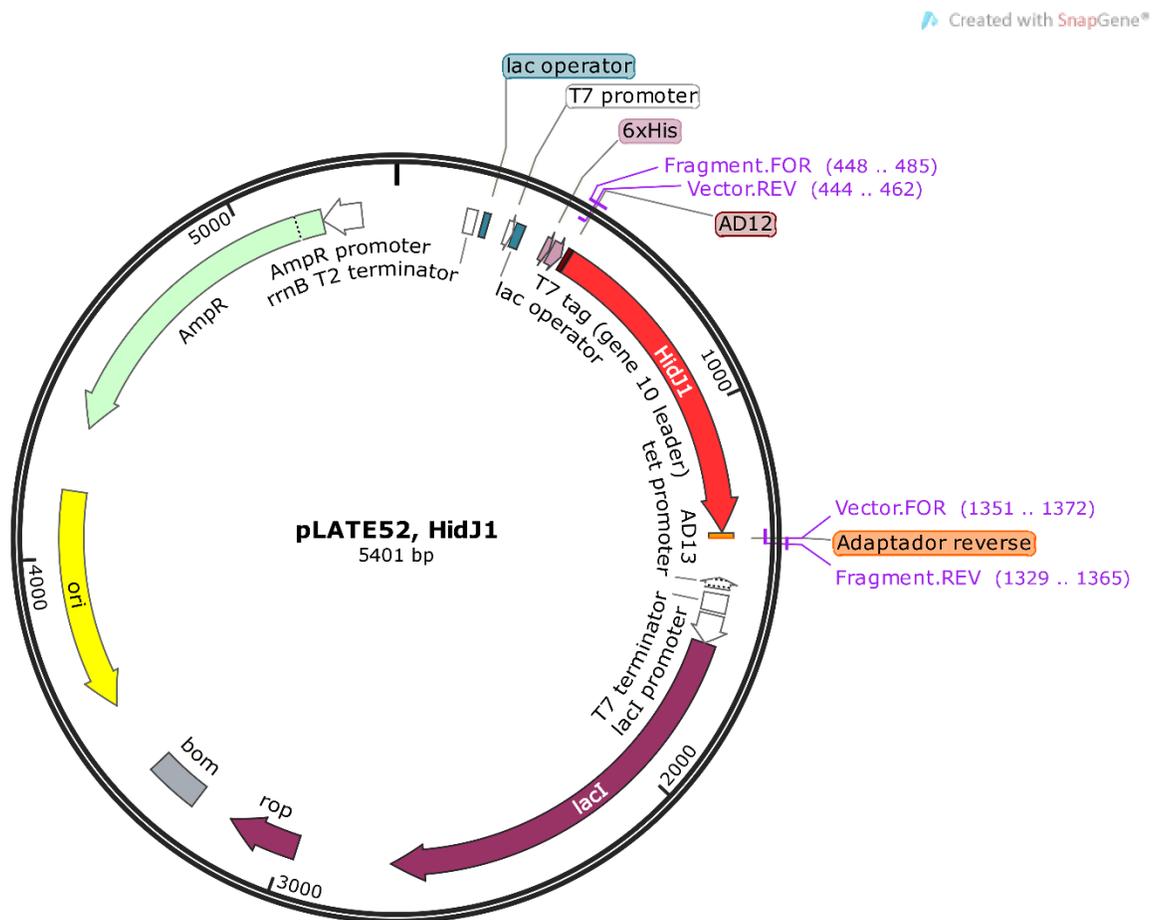
La especificidad de sustrato fue estudiada utilizando 10mM de cada p-nitrofenil éster disuelto en 2-propanol. Los sustratos empleados fueron p-nitrofenil butirato (C4), p-nitrofenil caprilato (C8), p-nitrofenil decanoato (C10), p-nitrofenil dodecanoato (C12), p-nitrofenil miristato (C14), p-nitrofenil palmitato (C16) y p-nitrofenil esterato (C18.) (Sigma-Aldrich), en 50mM de buffer Tris-HCl (se disolvió 0.4g de Tritón X-100 en 90mL de buffer) a pH 8. La prueba se llevó a cabo a 410nm en un espectrofotómetro a 45°C, con mediciones cada 2 min durante 30 min.

El ensayo se realizó a 45° C puesto que anteriormente ya se había realizado una prueba con p-nitrofenil palmitato (anexo 5.3.4).

### **4.3 RESULTADOS**

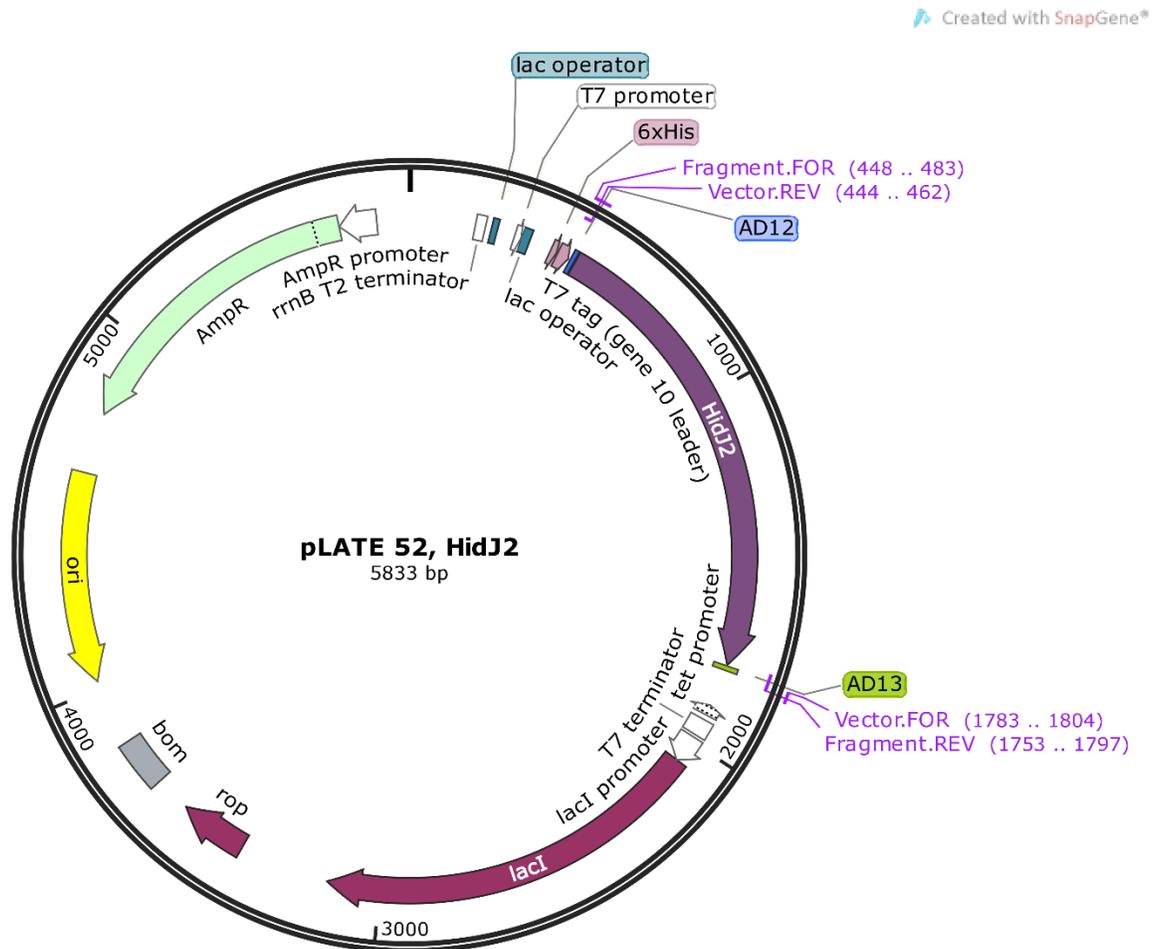
### 4.3.1 SUB-CLONACIÓN *in silico* DE LOS ORFs DE LIPASAS E HIDROLASAS

En los resultados de la clonación *in silico* utilizando el programa de SnapGene (Copyright © 2015 GSL Biotech LLC) se encontró que la unión entre el inserto de interés y los vectores pLATE 11,31 y 52 se realizarían de la manera correcta. Las figuras 4.2-4.9 muestran la posición de cada inserto clonado con su vector respectivo. Así también se pueden observar otras características como la etiqueta de 6His, el promotor T7, el origen de replicación y el gen marcador de resistencia a ampicilina.

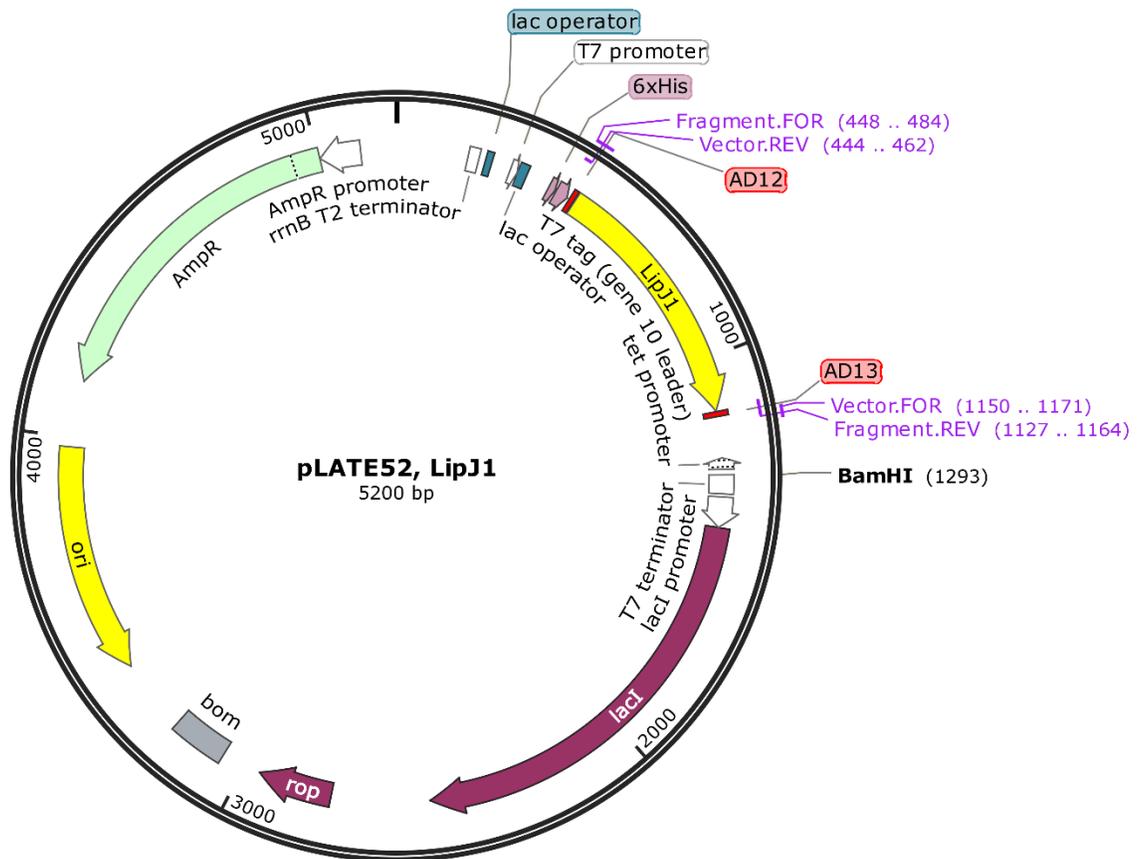


**Figura 4.2** Mapa esquemático mostrando la localización del ORF *HidJ1* ligado al vector pLATE 52. AD13 y AD14 representan los adaptadores entre el fragmento y el vector para la clonación específica. AmpR hace referencia al gen de resistencia a ampicilina (color verde), *lacI* es el represor del operador

lacO (color guinda). Ori es el origen de replicación (color amarillo). El gen se representa en color rojo. También se muestra la etiqueta de histidina “6x-His”.

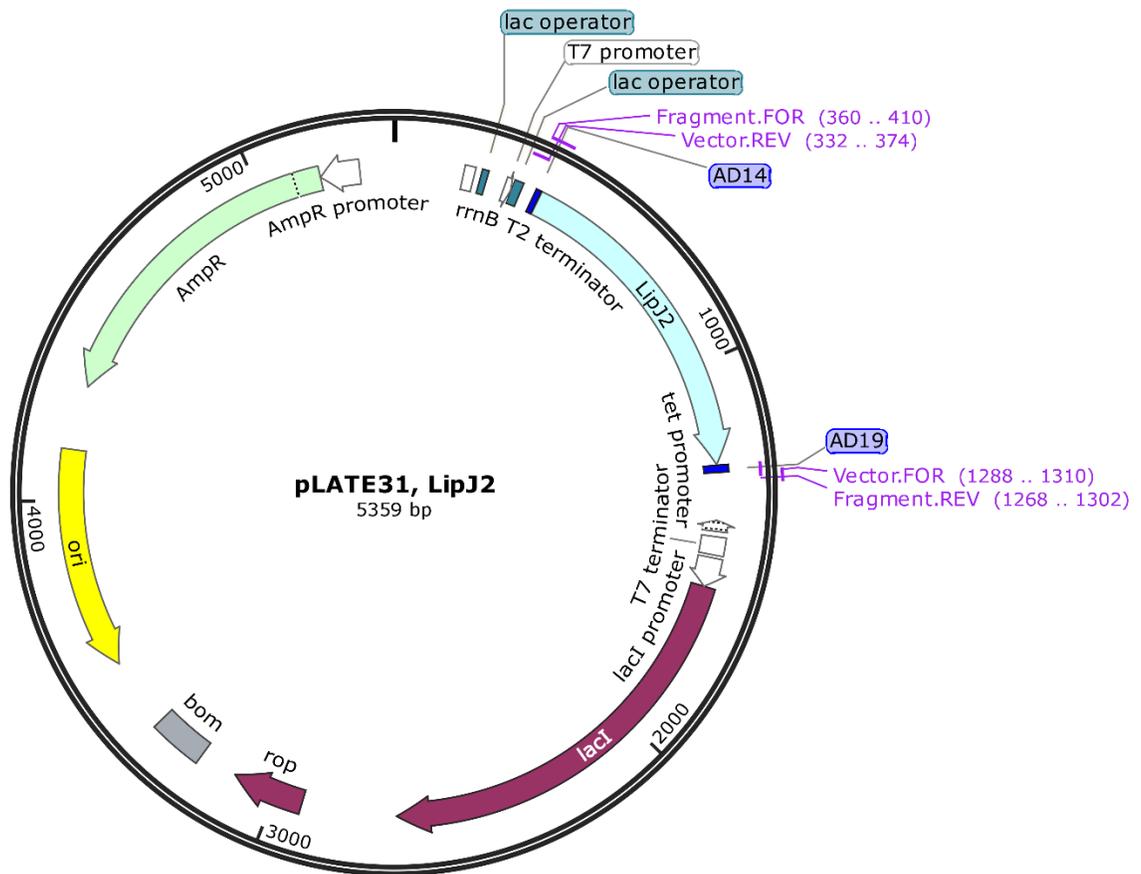


**Figura 4.3** Mapa esquemático mostrando la localización del ORF *HidJ2* ligado al vector pLATE 52. AD13 y AD14 representan los adaptadores entre el fragmento y el vector para la clonación específica. AmpR hace referencia al gen de resistencia a ampicilina (color verde), lacI es el represor del operador lacO (color guinda). Ori es el origen de replicación (color amarillo). El gen está representado en color púrpura. La etiqueta de Histidina se muestra en la posición del N-Terminal.

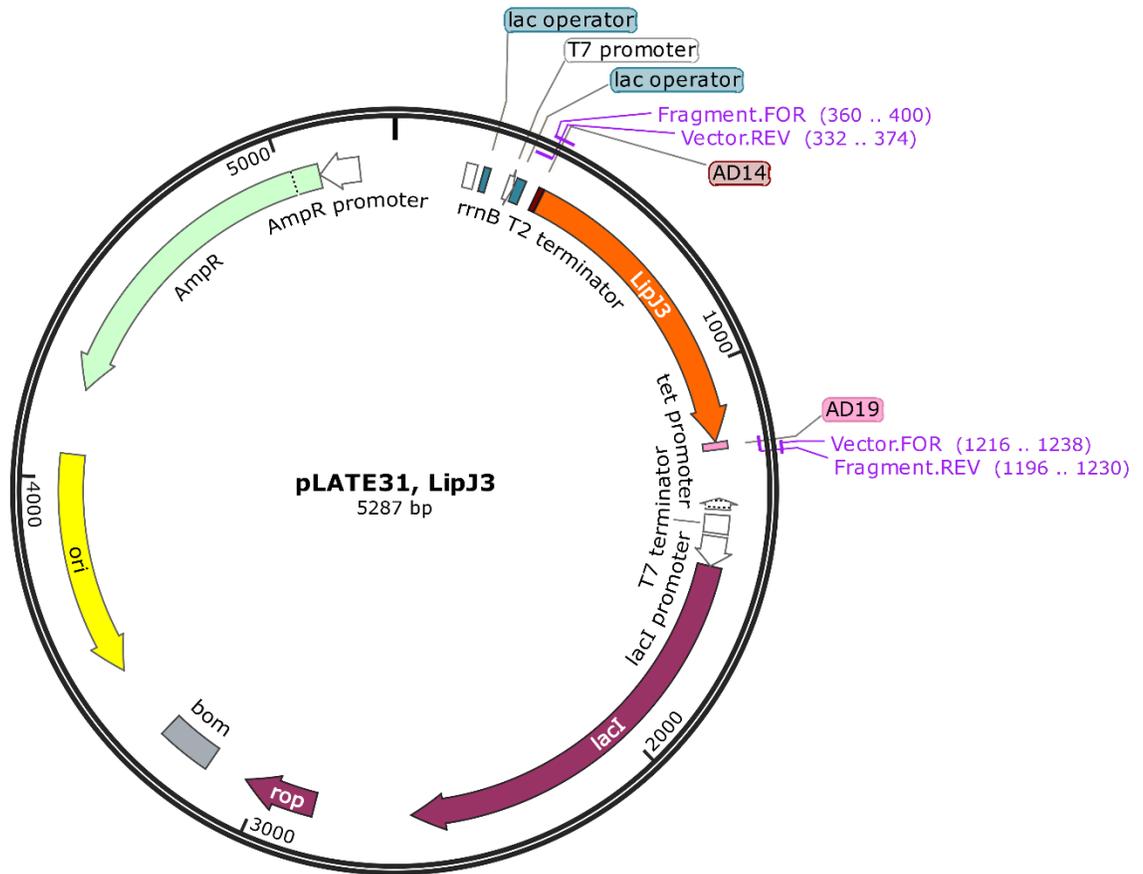


**Figura. 4.4** Mapa esquemático mostrando la localización del ORF *LipJ1* ligado al vector pLATE 52. AD13 y AD14 representan los adaptadores entre el fragmento y el vector para la clonación específica. AmpR hace referencia al gen de resistencia a ampicilina (color verde), lacI es el represor del operador lacO (color guinda). Ori es el origen de replicación (color amarillo). El gen se representa en color amarillo. La etiqueta de Histidina se muestra en la posición de N-Terminal.

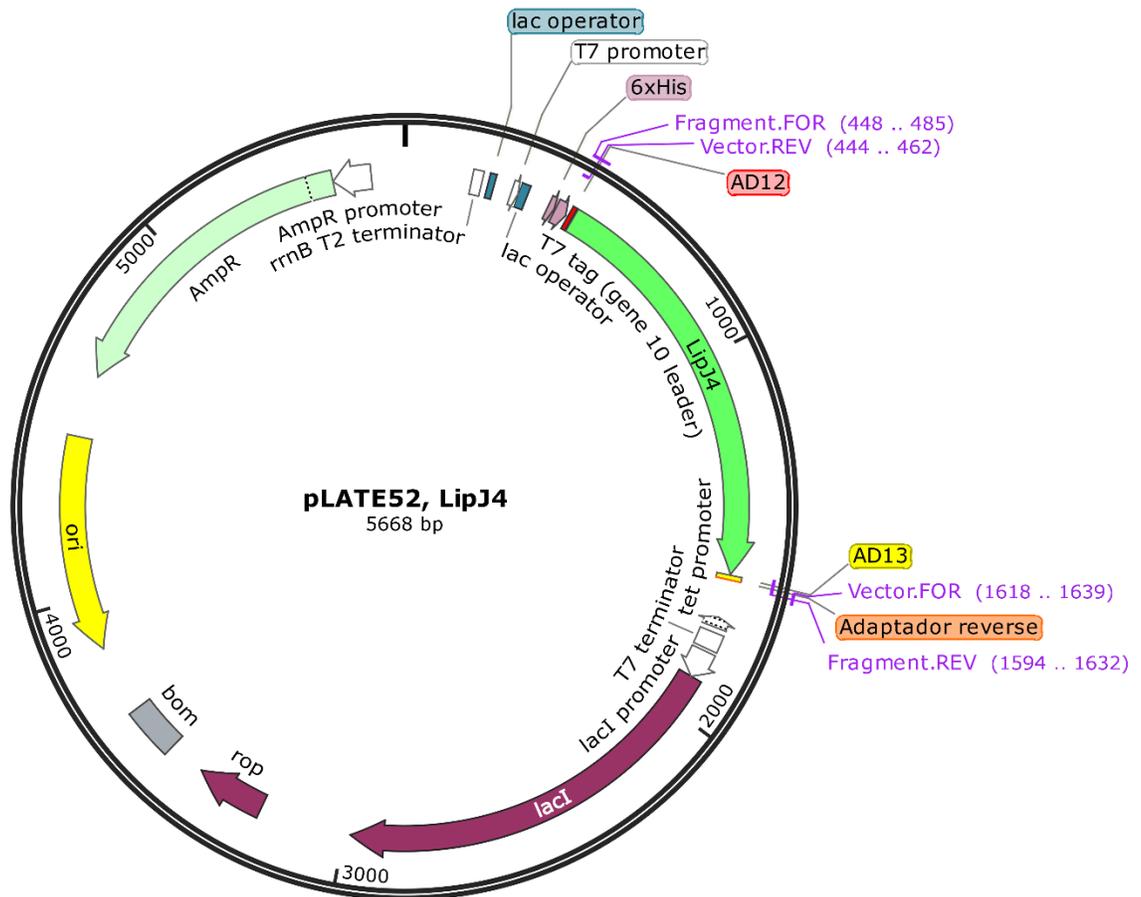
Debido a que las proteínas codificadas por los genes *LipJ1*, *LipJ4*, *HidJ1*, *HidJ2* no poseen péptido señal, se decidió colocarlos en el pLATE 52 que posee la etiqueta de histidina en N-terminal. En tanto los genes de *Lip2*, *LipJ3* y *ChapJ4* se colocaron en pLATE 31 a pesar que *LipJ2* y *LipJ3* no tuvieron péptido señal aparente.



**Figura 4.5** Mapa esquemático del ORF *LipJ2* ligado al vector pLATE 31. AD13 y AD14 representan los adaptadores entre el fragmento y el vector para la clonación específica. AmpR hace referencia al gen de resistencia a ampicilina (color verde), lacI es el represor del operador lacO (color guinda). Ori es el origen de replicación (color amarillo). El gen se representa en color azul.

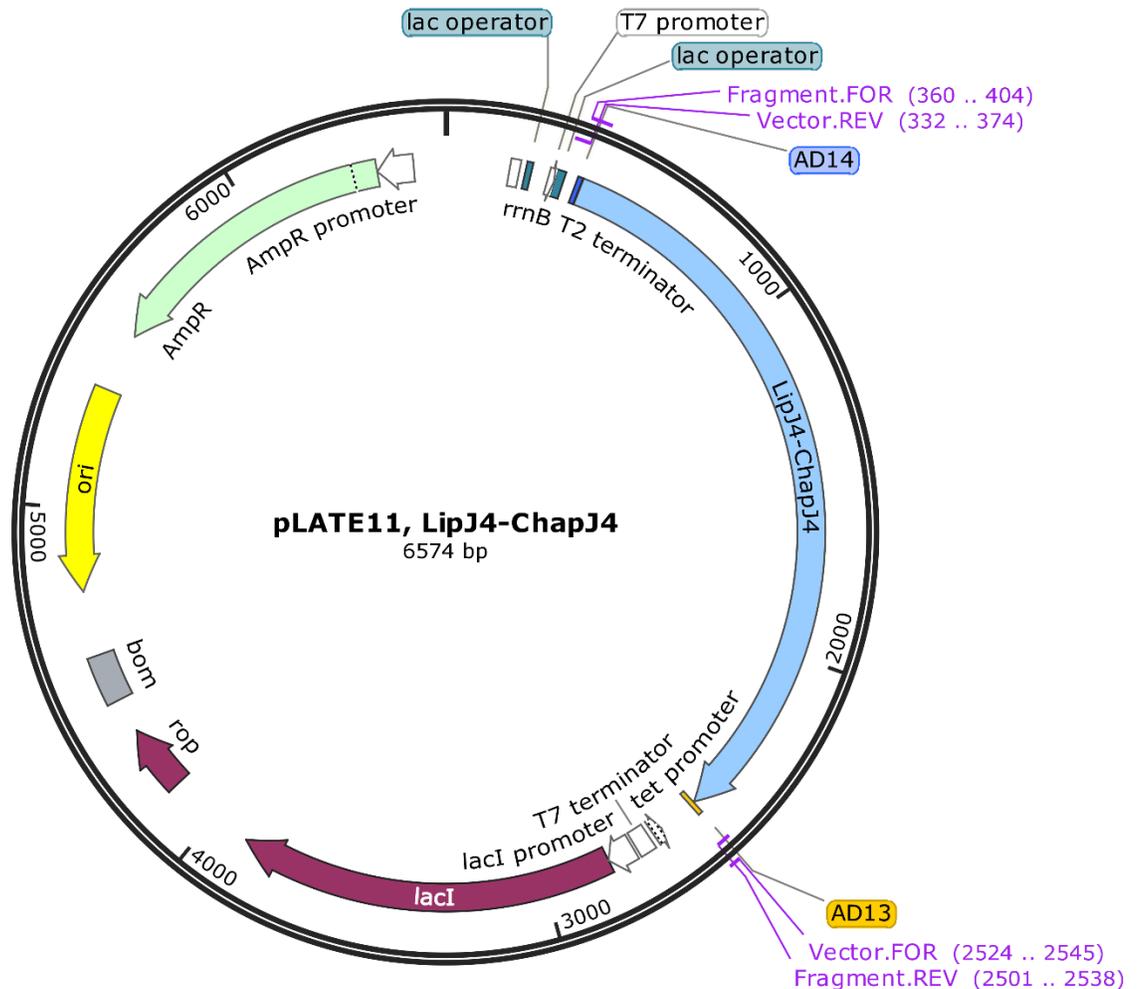


**Figura 4.6** Mapa esquemático del ORF *LipJ3* ligado al vector pLATE 31. AD13 y AD14 representan los adaptadores entre el fragmento y el vector para la clonación específica. AmpR hace referencia al gen de resistencia a ampicilina (color verde), lacI es el represor del operador lacO (color guinda). Ori es el origen de replicación (color amarillo). El gen se representa en color anaranjado.



**Figura 4.7** Mapa esquemático mostrando la localización del ORF *LipJ4* ligado al vector pLATE 52. AD13 y AD14 representan los adaptadores entre el fragmento y el vector para la clonación específica. AmpR hace referencia al gen de resistencia a ampicilina (color verde), lacI es el represor del operador lacO (color guinda). Ori es el origen de replicación (color amarillo). El gen se representa en color verde.





**Figura 4.9** Mapa esquemático mostrando la localización de los ORFs de la lipasa 4 y su chaperona (*LipJ4-ChapJ4*) ligados dentro del vector pLATE 11. AD13 y AD14 representan los adaptadores entre el fragmento y el vector para la clonación específica. AmpR hace referencia al gen de resistencia a ampicilina (color verde), lacI es el represor del operador lacO (color guinda). Ori es el origen de replicación (color amarillo). Los genes de *LipJ4* y *ChapJ4* se representan en color azul.

#### 4.3.2 AMPLIFICACION POR PCR EN EL FÓSMIDO 7 Y POOLS DE FÓSMIDOS

El resultado de amplificación de las 2 hidrolasas (*Hid1* e *Hid2*) fue positivo utilizando la enzima Platinum Platinum® *Taq* DNA Polymerase High Fidelity (Resultados no mostrados). También fue posible identificar los genes de *LipJ1*, *LipJ2*, *LipJ3*, *LipJ4*, *ChapJ4* y *LipJ4*

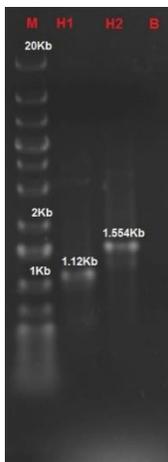
*ChapJ4*, a través de la amplificación con GoTaq® DNA Polymerase, el producto de amplificación del pool “61” (resultados no mostrados).

#### 4.3.3 SUB-CLONACIÓN DE LOS ORFs EN CÉLULAS TOP10

Los resultados de la sub-clonación de los genes de interés se pudieron comprobar a través de una amplificación por PCR realizada en los vectores de pLATE 11, 52 y 31 (resultados no mostrados). Los amplicones se obtuvieron utilizando los oligos LIC Forward y LIC Reverse a una temperatura de alineamiento de 57°C. Los resultados de secuenciación de estos amplicones, recibidos del IPICYT, tuvieron un 97% de identidad con la secuencia obtenida *in silico* de los genes *HidJ1* e *HidJ2*, y de 100% para la *LipJ4*. Con respecto al complejo *LipJ4-ChapJ4* no se obtuvieron secuencias de calidad.

#### 4.3.4 SUB-CLONACIÓN DE LOS ORFs EN CÉLULAS DE BL21

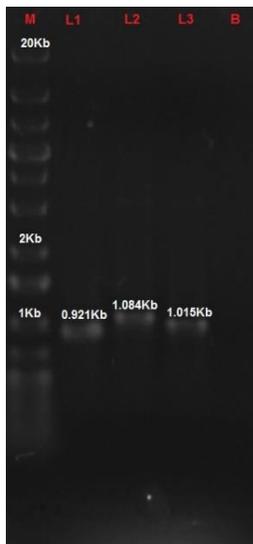
El resultado de sub-clonación en BL21 de *HidJ1*, *HidJ2*, *LipJ1*, *LipJ2*, *LipJ3*, *LipJ4*, *ChapJ4* y *LipJ4-ChapJ4* se muestra en las figuras 4.10-4.14. Los fragmentos de *HidJ1* (H1) de 858pb e *HidJ2* (H2) de 1290pb fueron identificados en el gel de electroforesis con un tamaño adicional atribuido a los 564pb correspondientes a las regiones del vector pLATE 52 que flanquean a los fragmentos clonados (figura 4.10). La amplificación se realizó con los oligos LIC Forward y LIC Reverse del kit aLICator™ LIC Cloning and Expression System.



**Figura 4.10** Gel mostrando los fragmentos amplificados de las hidrolasas *HidJ1* e *HidJ2* en BL21 (DE3). Las hidrolasas 1 y 2 se representan por “H1” y “H2” en el gel respectivamente. El blanco (PCR

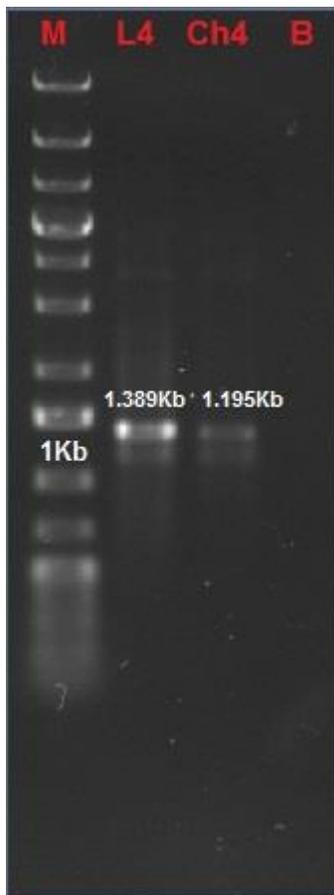
sin templado) se representa con “B” y el marcador de escalera de 1 Kb plus Gene Ruler con “M” (Thermo Scientific).

Los resultados de la amplificación por PCR de las lipasas del contig 99 se pueden observar en la figura 4.11. Dichos amplicones se obtuvieron con los oligos que flanquean al inserto de *LipJ1* (657pb), más los 564pb del vector pLATE 52 y con 205pb adicionales para las *LipJ2* (879pb) y *LipJ3* (810pb) en el vector pLATE 31.



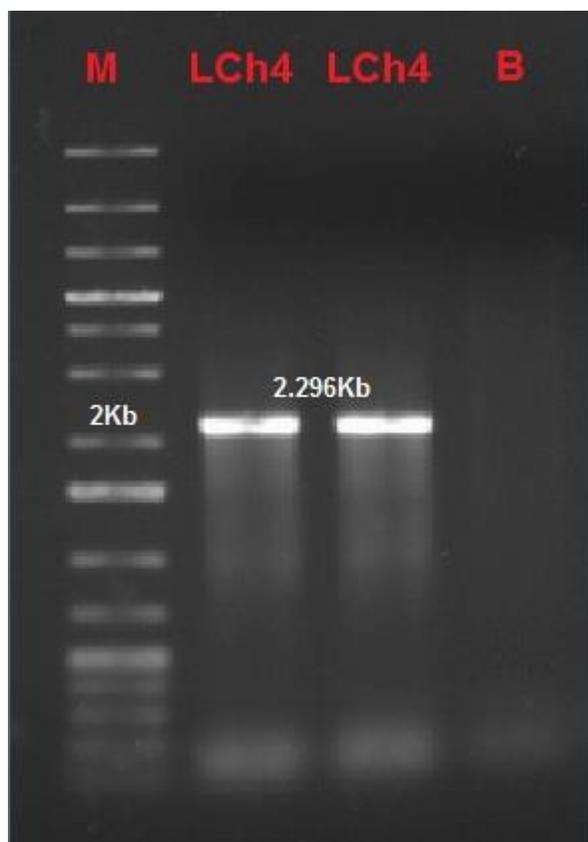
**Figura 4.11** Gel mostrando los fragmentos amplificados de los insertos de *LipJ1*, *LipJ2* y *LipJ3* en células de BL21 (DE3). Las lipasas 1, 2 y 3 están representadas por “L1”, “L2” y “L3” respectivamente. “B” representa el blanco (agua ultrapura) y “M” representa el marcador de 1Kb plus Gene Ruler (Thermo Scientific).

En la figura 4.12 se puede observar el fragmento amplificado de *LipJ4* con su presunta chaperona (*ChapJ4*) encontrados en el contig del fósido 40.



**Figura 4.12** Fragmentos amplificados de *LipJ4* y *ChapJ4* en BL21 (DE3). “L4” representa a *LipJ4*, “Ch4” representa a la chaperona a *ChapJ4* y “B” representa el blanco (agua ultrapura). También se utilizó el marcador 1Kb plus GeneRuler “M” (Thermo Scientific).

Se logró la sub-clonación del complejo *LipJ4-ChapJ4* (LCh4), con un tamaño de 2118pb sumado a los 178pb que flanquean al inserto en el vector de pLATE 11 (resultado mostrado en la figura 4.13).



**Figura 4.13** Resultado de la amplificación del complejo *LipJ4-ChapJ4* en BL21 (DE3). “LCh4” representa a la lipasa 4 con su chaperona, “B” representa el blanco (agua ultrapura) y “M” es el marcador de escalera de 1KBplus GeneRuler. Para la realización de esta prueba se utilizó un duplicado de la muestra.

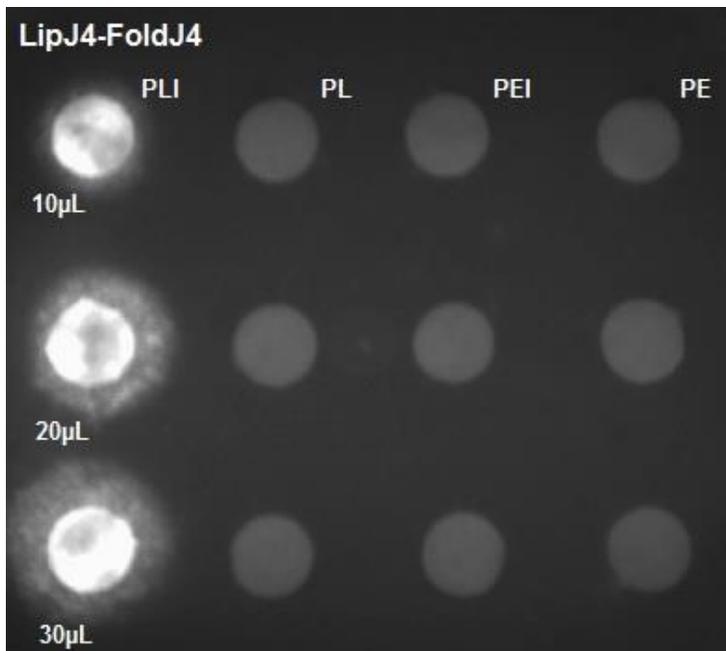
Las pruebas de actividad lipolítica (ensayo en papel filtro) para los extractos inducidos de *HidJ1*, *HidJ2*, *LipJ1*, *LipJ2*, *LipJ3* resultaron negativas; igualmente fueron negativos los extractos de la expresión independiente de *LipJ4* y *ChapJ4*, incluso en presencia de IPTG (Anexo 5.3.2).

Así mismo, el secretoma de la clona BL21 expresando *LipJ4-ChapJ4* fue negativo aún en presencia de IPTG (Figura 4.14).

#### 4.3.5 SOBRE-EXPRESIÓN DE LOS GENES DE LIPASA

Se realizó la lisis celular y la actividad de lipasa se detectó en el extracto soluble del complejo *LipJ4-ChapJ4*, bajo luz UV en un fotodocumentador de Bio-Rad XR Gel Doc. En

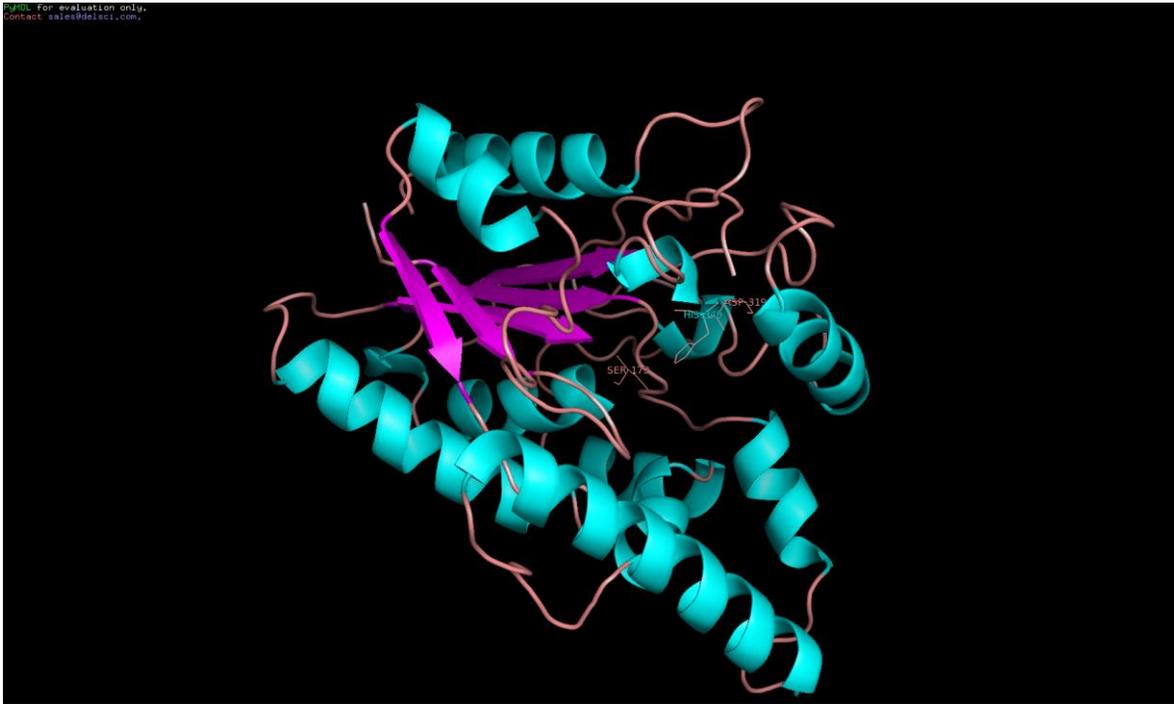
los discos que resultaron positivos se formó un halo fluorescente de color naranja a 564nm por acción de la lipasa (Figura 4.14).



**Figura 4.14** Esquema mostrando el ensayo de actividad de lipasa en papel filtro sobre medio de Rodamina B y aceite de olivo de la clona expresando *LipJ4-ChapJ4* en la célula hospedera de BL21. La imagen muestra los análisis de los extractos proteicos del secretoma y de la lisis. En las primeras 2 columnas de la placa se muestra el extracto producto de la lisis inducido con IPTG (PLI) y sin inducir (PL) respectivamente. Las últimas 2 columnas corresponden al producto extracelular de la célula inducida (PEI) y sin inducir (PE). Las muestras se agregaron en volúmenes de 10µL, 20µL y 30µL.

#### 4.3.6 ANÁLISIS *in silico* LipJ4

El plegamiento  $\alpha/\beta$  hidrolasa en *LipJ4* se predijo con su alineamiento con sus homólogos cercanos utilizando la plataforma de Phyre2; el resultado se muestra en el anexo 5.3.3. La estructura  $\alpha/\beta$  hidrolasa en 3D se visualiza con el programa PYMOL 0.99rc6 en la figura 4.15. En esta estructura alfa/beta hidrolasa se observan las 5 cadenas beta características de muchas lipasas (Casas-Godoy *et al.*, 2012).



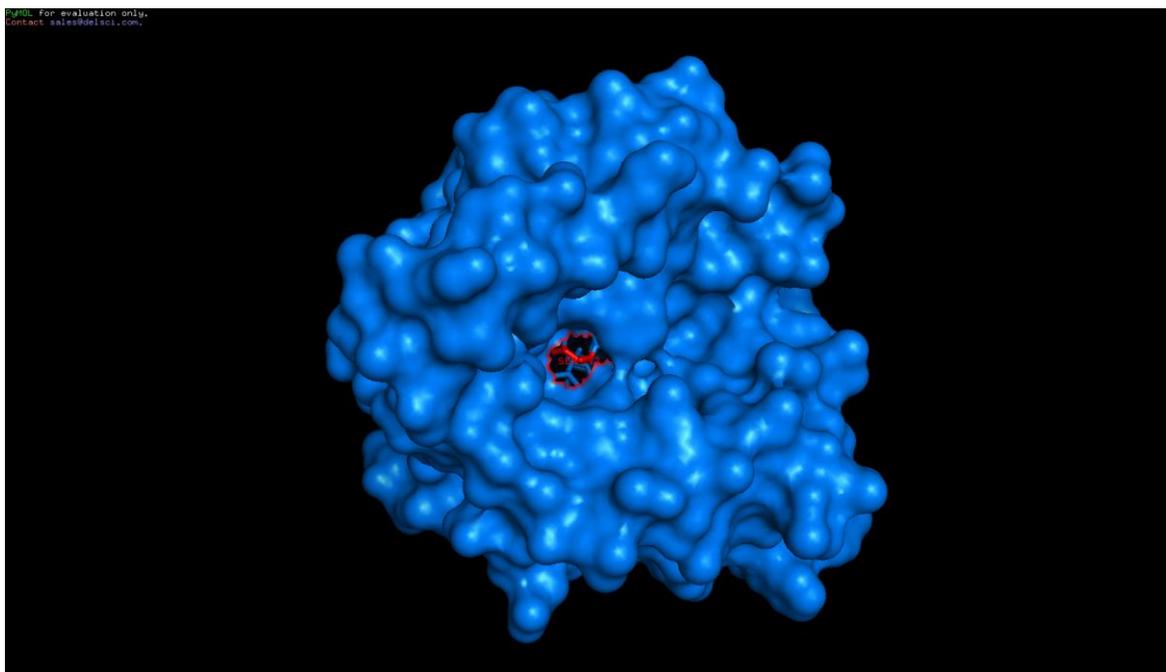
**Figura 4.15** Estructura tridimensional  $\alpha/\beta$  hidrolasa de *LipJ4*. La imagen muestra en rosa las 5 cadenas beta ( $\beta$ ) y en color verde las 12 estructuras alfa ( $\alpha$ ) predichas.

La posición de la triada catalítica de *LipJ4* se dedujo a partir de la estructura 3D modelada con el programa I-TASSER, y el resultado se observó a través de PYMOL 0.99rc6 se muestra en la figura 4.16.



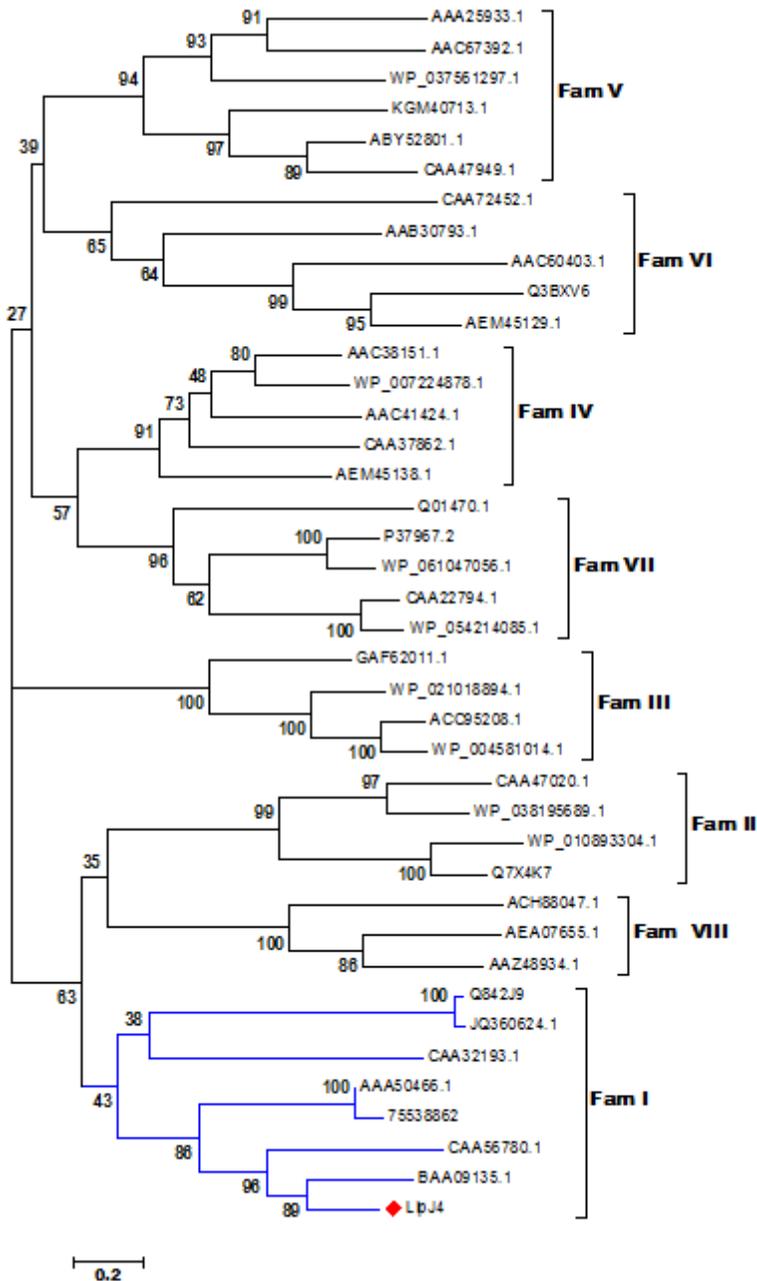
**Figura 4.16** Estructura 3D de *LipJ4* en la que se observa la triada catalítica en color amarillo (Ser<sup>173</sup>, Aspa<sup>319</sup> y His<sup>340</sup>).

La zona de reconocimiento del sitio activo se puede apreciar en la figura 4.17.



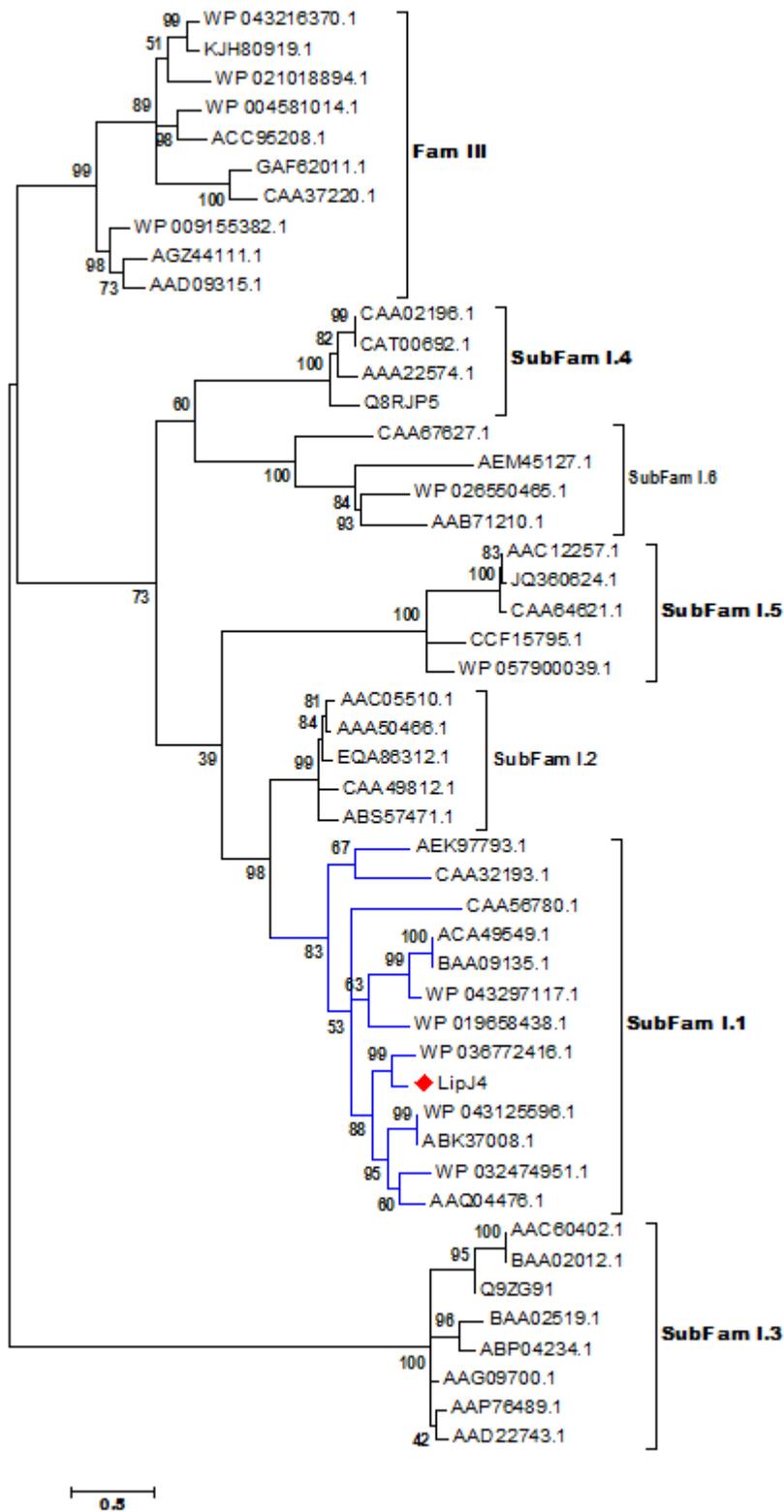
**Figura 4.17** Estructura 3D de *LipJ4* que muestra el sitio de unión del sustrato. La triada catalítica está representada en color rojo.

*LipJ4* presentó 97% de identidad con lactonizing lipase (*LipL*) de *Acidovorax* sp. KKS102. Esta secuencia se ubicó en la familia I de lipasas verdaderas. En el árbol filogenético realizado por el método NJ en Mega 6.0. El resultado se muestra en la figura 4.18.



**Figura 4.18** Árbol filogenético por NJ de las VIII familias de lipasas. La escala indica el número de eventos de sustitución. El rombo color rojo indica la posición de *LipJ4*. Cada familia está indicada con una etiqueta en negro (Fam I-VIII). Las ramas del clado en el que se agrupa *LipJ4* se representan en azul marino. Cada nodo indica el porcentaje de réplica resultado del Bootstrap (1000).

El porcentaje de réplica que sostiene la posición de *LipJ4* en su clado, permite inferir que es un resultado confiable. Se realizó un segundo análisis filogenético con secuencias de lipasas de subfamilias de la familia I y se anexaron las secuencias de la familia III, para observar la posición de *LipJ4*. El modelo ML aplicado en este segundo análisis mejoró el sustento de los clados por encima del 50% para la mayoría de los casos. Los resultados se muestran en la figura 4.19. La razón por la cual se emplearon las secuencias de la familia III, fue a causa del posicionamiento de la secuencia de *LipJ4* dentro de este grupo. Sin embargo su posicionamiento dentro de la sub-familial.1 de la familia I de lipasas, fue más evidente al aumentar el número de sus homólogos. Las características de los números de accesión de lipasas que se representan en la figura 4.19, se muestran en el anexo 5.3.5.



**Figura 4.19** Esquema mostrando el análisis filogenético mediante ML de *LipJ4* y la familia I y III de lipasas. En la figura se indica la distribución de las 6 subfamilias de lipasas que conforman a la familia I. La escala indica el número de eventos de sustitución. El rombo color rojo indica la posición de *LipJ4*. Las ramas del grupo de la sub-familial.1 se indican en color azul. En cada nodo se representa el porcentaje del Bootstrap (1000) para las ramas.

De acuerdo al análisis filogenético, *LipJ4* es un miembro de la sub-familial.1 de lipasas y por lo tanto debería presentar características bioquímicas y estructura similares a los otros miembros de este grupo. Para profundizar el entendimiento de *LipJ4* se realizó un alineamiento con los homólogos cercanos de la lipasa, algunos miembros de la familia I (Sub-familial.1 y Sub-familial.2) (Figura 4.20).

```

CAA49812.1 46 TRYPIVLVHGLFGDKF---ANVDYFYGCIQSDIQSHGAKVYVAMLSSEFSSDDGPNRCGE
AAA50466.1 51 TRYPIILVHGLSGDKY---AGVLEYFYGCIQEDLQONGATVYVAMLSSEFSSDDGPNRCGE
AAC05510.1 47 TRYPIILVHGLTGDYK---AGVLEYFYGCIQEDLQOHGATVYVAMLSSEFSSDDGPKGRDE
CAA32193.1 7 TRYPIILVHGLFGFDRI---GSHHYFHCIKQALNECCGASVFWPIISAAND---NEERCGE
CAA56780.1 39 TRYPIVLVHGLFGFNKI---GTEAFGLDYFYGCIPODLARNGANVWVTRQSTANT---SEERCGE
BAA09135.1 32 TRYPIVLVHGLFGFDNI---LGVDFYFYGCIQSDIQSHGAKVYVAMLSSEFSSDDGPNRCGE
ACA49549.1 32 TRYPIVLVHGLFGFDNI---LGVDFYFYGCIQSDIQSHGAKVYVAMLSSEFSSDDGPNRCGE
WP_046352138.1 24 TRYPIVLVHGLFGFDQY---LGVDFYFYGCIQSDIQSHGAKVYVAMLSSEFSSDDGPNRCGE
ABK37008.1 54 TRYPIVLVHGLFGFDKI---LGVDFYFYGCIQSDIQSHGAKVYVAMLSSEFSSDDGPNRCGE
AAQ04476.1 22 TRYPIVLVHGLFGFDKI---LGVDFYFYGCIQSDIQSHGAKVYVAMLSSEFSSDDGPNRCGE
WP_032474951.1 34 TRYPIVLVHGLFGFDKI---LGVDFYFYGCIQSDIQSHGAKVYVAMLSSEFSSDDGPNRCGE
WP_019658438.1 29 TRYPIVLVHGLFGFDKI---LGVDFYFYGCIQSDIQSHGAKVYVAMLSSEFSSDDGPNRCGE
LipJ4 97 TRYPIVLVHGLFGFDKI---LGVDFYFYGCIQSDIQSHGAKVYVAMLSSEFSSDDGPNRCGE
WP_036772416.1 40 TRYPIVLVHGLFGFDKI---LGVDFYFYGCIQSDIQSHGAKVYVAMLSSEFSSDDGPNRCGE

CAA49812.1 103 OLLAQQVKTFLAATGAKVNLGHSHGCEPTIRYVAVVAPDLVASVTTIGTEHHRGSEFADSEV
AAA50466.1 108 OLLAQQVKTFLAATGAKVNLGHSHGCEPTIRYVAVVAPDLVASVTTIGTEHHRGSEFADSEV
AAC05510.1 104 OLLAQQVKTFLAATGAKVNLGHSHGCEPTIRYVAVVAPDLVASVTTIGTEHHRGSEFADSEV
CAA32193.1 60 OLLAQQVKTFLAATGAKVNLGHSHGCEPTIRYVAVVAPDLVASVTTIGTEHHRGSEFADSEV
CAA56780.1 96 OLLAQQVKTFLAATGAKVNLGHSHGCEPTIRYVAVVAPDLVASVTTIGTEHHRGSEFADSEV
BAA09135.1 85 OLLAQQVKTFLAATGAKVNLGHSHGCEPTIRYVAVVAPDLVASVTTIGTEHHRGSEFADSEV
ACA49549.1 85 OLLAQQVKTFLAATGAKVNLGHSHGCEPTIRYVAVVAPDLVASVTTIGTEHHRGSEFADSEV
WP_046352138.1 77 OLLAQQVKTFLAATGAKVNLGHSHGCEPTIRYVAVVAPDLVASVTTIGTEHHRGSEFADSEV
ABK37008.1 107 OLLAQQVKTFLAATGAKVNLGHSHGCEPTIRYVAVVAPDLVASVTTIGTEHHRGSEFADSEV
AAQ04476.1 75 OLLAQQVKTFLAATGAKVNLGHSHGCEPTIRYVAVVAPDLVASVTTIGTEHHRGSEFADSEV
WP_032474951.1 87 OLLAQQVKTFLAATGAKVNLGHSHGCEPTIRYVAVVAPDLVASVTTIGTEHHRGSEFADSEV
WP_019658438.1 82 OLLAQQVKTFLAATGAKVNLGHSHGCEPTIRYVAVVAPDLVASVTTIGTEHHRGSEFADSEV
LipJ4 150 OLLAQQVKTFLAATGAKVNLGHSHGCEPTIRYVAVVAPDLVASVTTIGTEHHRGSEFADSEV
WP_036772416.1 93 OLLAQQVKTFLAATGAKVNLGHSHGCEPTIRYVAVVAPDLVASVTTIGTEHHRGSEFADSEV

CAA49812.1 163 QDVVAYDPTGLSSSVIAEFVNVF---GILVSSSHNTNQDALAALQILITAPAAATYNNY
AAA50466.1 168 QDVVAYDPTGLSSSVIAEFVNVF---GILVSSSHNTNQDALAALQILITAPAAATYNNY
AAC05510.1 164 QGVVAYDPTGLSSSVIAEFVNVF---GILVSSSHNTNQDALAALQILITAPAAATYNNY
CAA32193.1 120 RLAEVFER---LGEVVAALTTTSF---SEFVSAISCHPRLPQNAIINLITDCYVAEFNROY
CAA56780.1 156 YKTLAGTP---LEAFDATTIFNVANFITIGQFDDPKQYEMNSVGAARYSLSTEGACKFNATF
BAA09135.1 145 RQVPEPGS---AGEPALSCLVNSL---CALLSELSSCESTGTONSLSELESINSEGAARFNAY
ACA49549.1 145 RQVPEPGS---AGEPALSCLVNSL---CALLSELSSCESTGTONSLSELESINSEGAARFNAY
WP_046352138.1 137 RKATPEGS---INPATEMLIAEGL---AKLIGLVSKDGLPQSANAAALDSLITAGSAKFNAY
ABK37008.1 167 RANVAPGS---VAKVAVVAASAL---SGVLSLLSGESQLPQDFLAALDALTAGACRFNORY
AAQ04476.1 135 RGHVSEGS---LIEELAVKLAEGE---SGLIGLSSGSGLEQDFLAALDALTAGACRFNORY
WP_032474951.1 147 RGVVPEGS---VSEQVAVLTOGL---VALILLLSGEKHPQDFLAALDALTAGACRFNORY
WP_019658438.1 212 GNTVPEGS---LSRFVWSAVMAF---SSLIGLSCN---NTPQSGLEALESLITAGSAKFNAY
LipJ4 140 RGVVPEGS---VSEVAVVAASAL---VGLINLITSGEGLPQDFLAALDALTAGACRFNORY
WP_036772416.1 153 RGTVPEGS---LIEVWVNAAKAF---VALINLITSGEGLPQDFLAALDALTAGACRFNORY

```

```

CAA49812.1      219 PSAGLGAPGSCQTCAATETVGGSQHLLYSWGGTAIQPTSTVLGVTGATDTSTGT-LDVAE
AAA50466.1      224 PSAGLGAPGSCQTCAPTETVGGNTHLLYSWAGTAIQPTLSVFGVTGATDTSTLPLVDPAN
AAC05510.1      220 PSAGLGRPGSCQTCAPTETVGGNTHLLYSWAGTAIQPTLSVFGVTGATDTSTIPLIDPAN
CAA32193.1      177 PGGLE--DRWGGMCPA----QVNVVHYYSWSGIIKGS-----RLAESIA
CAA56780.1      214 PGGVE--ITACCGES----SVNGVRYYSWSGASE-----LITN
BAA09135.1      201 PGGVE--TSACCGEAY----KVNQVSYYSWSGSSE-----LITN
ACA49549.1      201 PGGVE--TSACCGEAY----KVNQVSYYSWSGSSE-----LITN
WP_046352138.1  194 PEGLE--LGCNEGAY----QVNGVRYYSWSGASE-----VITN
ABK37008.1      224 PEGLE--NQYCGCEPMQ---AANGVYYYSWSGRGT-----MTN
AAQ04476.1      192 PEGLE--QTECGCEML---AGNGVYYYSWTSST-----YITN
WP_032474951.1  204 PEGVE--TSACCGEAY----QVNGVRYYSWSGAAT-----VITN
WP_019658438.1  198 PDGVE--ITACNGAE---LVNGVRYYSWSGTQE-----LITN
LipJ4           267 PGGVE--TSCCGCAE---LVNGVRYYSWTGILE-----LITN
WP_036772416.1  210 PQAIE--A-DCGSEPE---LVNGVRYYSWTGILE-----VITN
      □
CAA49812.1      278 VLDPSTLALALGAVMINQASGQNDGLVSRCSSELEQVISTSYHWNHLDENQILGVRGA
AAA50466.1      284 VLDPSTLALALGAVMINQASGQNDGLVSRCSSELEQVISTSYHWNHLDENQILGVRGA
AAC05510.1      280 VLDPSTLALALGAVMINQASGQNDGLVSRCSSELEQVISTSYHWNHLDENQILGVRGA
CAA32193.1      215 ILDELHNATRVFDSF-ETRETRENDGMVGRFSSHLGQVIRSDYPIIDHLDIINHARGSSAG
CAA56780.1      246 PLDPSDYELSLTSVF-S-G--KQNDGLVSRCSSELEQVIRSDYPIIDHLDENQILGFDLF
BAA09135.1      233 FLDPSDARLQASSTI-F-KNGTANDGLVGTCSSEHLGMVIRSDYPIIDHLDENQILGFDLF
ACA49549.1      233 FLDPSDARLQASSTI-F-KNGTANDGLVGTCSSEHLGMVIRSDYPIIDHLDENQILGFDLF
WP_046352138.1  226 VEDPSDAPMELTSTA-F-K--EKNDGLVSRCSSEHLGQVIRSDYPIIDHLDENQILGFDLF
ABK37008.1      257 ILDEVDALALALGTF-F-K--EANDGLVSRCSSEHLGQVIRSDYPIIDHLDENQILGFDLF
AAQ04476.1      225 VLDESDAPMAILGTA-F-A-GEANDGLVSRCSSEHLGQVIRSDYPIIDHLDENQILGFDLF
WP_032474951.1  236 ILDPSDVAMELIGLV-F-N--EANDGLVSRCSSEHLGQVIRSDYPIIDHLDENQILGFDLF
WP_019658438.1  230 VEDPSDYPTSLTSLV-H-G--EANDGLVSRCSSEHLGQVIRSDYPIIDHLDENQILGFDLF
LipJ4           299 VLDSADALITLTLSTI-F-G--EANDGLVSRCSSEHLGQVIRSDYPIIDHLDENQILGFDLF
WP_036772416.1  241 VLDVSDGPLEINSLI-F-G--QANDGLVSRCSSEHLGQVIRSDYPIIDHLDENQILGFDLF
      ○
CAA49812.1      338 NAEDEPVAVIRTHANRLKLAGV-
AAA50466.1      344 YAEDEPVAVIRTHANRLKLAGV-
AAC05510.1      340 NAEDEPVAVIRTHANRLKLAGV-
CAA32193.1      274 ASTR-----
CAA56780.1      302 LHKTIYPSLDNMPIVSEVKIYN
BAA09135.1      291 FETSPVSVYROHANRLKQAGI-
ACA49549.1      291 FETSPVSVYROHANRLKQAGI-
WP_046352138.1  282 FETSPVSVYROHANRLKQAGI-
ABK37008.1      313 FETDPVSVYROHANRLKQAGI-
AAQ04476.1      282 FETDPVSVYROHANRLKQAGI-
WP_032474951.1  292 FETDPVSVYROHANRLKQAGI-
WP_019658438.1  285 FSVSPVSVYROHANRLKQAGI-
LipJ4           354 FSTDPVSVYROHANRLKQAGI-
WP_036772416.1  296 FSADEPVTLYROHANRLKQAGI-

```

**Figura 4. 20** Alineamiento de *LipJ4* con la sub-familial.1 y 1.2 de lipasas. Los círculos negros representan la ubicación de la triada catalítica. El recuadro rojo representa la ubicación del motivo pentapéptido GX SXG, donde se ubica la serina catalítica. Los cuadros blancos representan la ubicación de las cisteínas (C) que forman parte de los enlaces disulfuro de las lipasas. Los círculos blancos representan la posición de los aspartatos (D) que se unen a los iones de  $Ca^{+2}$ .

Dentro de la secuencia de *LipJ4* se encontraron secuencias motivos TRYPIVLVHGLFGFD, RGEQLLA, NGVRYYSWTG, PVTLYRQHANRLK, características de la sub-familial.1 de lipasas verdaderas (Arpigny & Jaeger, 1999).

La secuencia motivo “PIVLVHGLFGFD” se encuentra una región hidrofóbica de 6aa que corresponde al agujero oxoanión de algunas lipasas (Bell *et al.*, 2002). También se pudo observar el motivo “DASD” donde se ubica un aspartato de unión a calcio, motivo comparable con “DPSD” presente en algunos de los miembros de la sub-familia1.1 (An *et al.*, 2003). El motivo “NDGLVS” corresponde a la ubicación del aspartato de la triada catalítica. La serina catalítica se encuentra en el motivo pentapéptido “GSHHG”. Las 2 cisteínas de *LipJ4* responsables de los enlaces disulfuro que le dan estabilidad a la proteína, se identificaron tanto en el motivo “CSSRLG”, como en la posición 275 de la secuencia. En el motivo “NHLDEVNQ” se encuentran la histidina de la triada catalítica y el aspartato de unión a calcio.

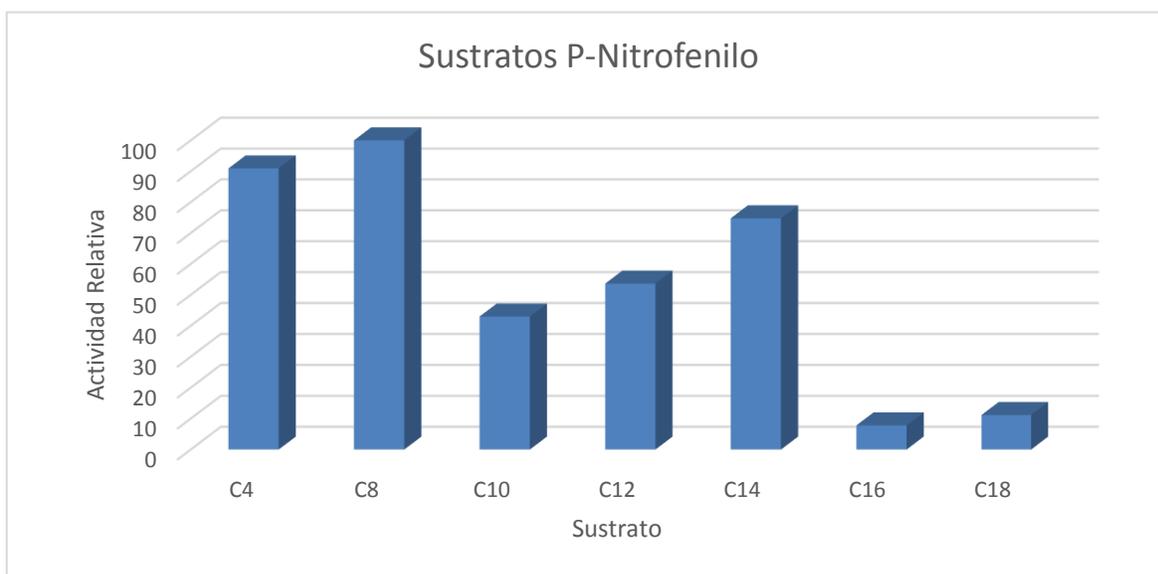
Tanto los miembros de la sub-familial.1 como la sub-familial.2 presentan 5 cadenas beta de forma paralela (Korman y Bowie, 2012). En la figura 4.20, los miembros de la sub-familia1.2 de la familia I de lipasas, se representan con los números de accesoión CAA49812.1, AAA50466.1 y AAC05510.1, y comparten con los miembros de la sub-familial.1, los motivos de unión a calcio, de cisteínas y de la triada catalítica. Una de las diferencias de la sub-familial.1, con respecto a la sub-familial.2, es la ausencia de una sección de 14 residuos de aminoácidos que forman una cadena beta anti paralela que podría ubicarse después del motivo “YYSWTGT” (Korman y Bowie, 2012). Esta secuencia podría estar ubicada en la región conservada “AIQPTLSVFGVTGATDTST” que se muestra en el alineamiento de la figura 4.20.

En las secuencias de la sub-familial.2 se pueden observar regiones conservadas en los miembros de la sub-familial.2, como “VYVANLSGFQSDDGPNGR”; secuencia que no se encuentra en la sub-familial.1.

#### **4.3.7 ANÁLISIS DE SUSTRATO DE *LipJ4-ChapJ4* CON P-NITROFENIL ESTERES**

La prueba realizada para analizar la preferencia de sustrato se determinó calculando la actividad relativa tomando como referente 100% de los valores obtenidos sobre p-nitrofenil caprilato (C8), que fue el sustrato preferente de la enzima (figura 4.21). Posteriormente la actividad decayó con p-nitrofenil decanoato (C10) y p-nitrofenil laurato (C12), para después ascender nuevamente con p-nitrofenil miristato (C14). El ensayo se realizó una sola vez por duplicado, por lo que los resultados no son confiables, debido a que le falta determinar la

temperatura y el pH óptimo. Estos resultados son preliminares y se necesita de más estudios para tener certeza del comportamiento de *LipJ4* con los sustratos p-nitrofenil ésteres.



**Figura 4. 21** Preferencia de sustratos de *LipJ4-ChapJ4*. El ensayo indica la actividad relativa y los sustratos de p-nitrofenil ésteres (C4-C18). Se usó como referencia el 100% de actividad de C8. El pH 8 del buffer Tris-HCL y una temperatura de 45°C

#### 4.4 DISCUSIÓN

La clonación de los genes de las lipasas de los pools en el presente trabajo fue un logro si se considera que se amplificaron de ADN mezclado de cepas diversas. Hay trabajos que reportan amplificaciones de ADN de fenotipos bacterianos aislados a partir de primers degenerados de regiones conservadas, con resultados satisfactorios (Parra *et al.*, 2015). A diferencia de nuestro enfoque, Bell y colaboradores en el 2002 diseñaron primers degenerados a partir de regiones conservadas (agujero oxianión y del motivo pentapéptido GX SXG) de un conjunto de secuencias de lipasas y con la implementación de la técnica “genomic walking PCR”, para buscar genes dentro del cromosoma de *B. pumilus*. El resultado fue exitoso y extendieron el análisis para buscar en la biomasa de ADN de una fuente termal de Nueva Zelanda. Sin embargo la baja homología, la presencia de aminoácidos desfavorables, como la serina dentro de las secuencias conservadas, la ausencia de aminoácidos conservados contiguos y el tamaño tan pequeño de las secuencias

motivo (6aa o menos), son factores que dificultan la elaboración de primers (Bell *et al.*, 2002). Las dificultades no solo se presentan en el diseño de primers, sino que los métodos no son ideales para la clonación directa de lipasas a partir de muestras de ADN ambiental porque poseen una gran cantidad de fenotipos (Bell *et al.*, 2002; Berlemont *et al.*, 2011). Además la cobertura de los genomas puede verse dificultada si una población de bacterias está representada en mayor cantidad que las demás (Bell *et al.*, 2002).

*LipJ4* se amplificó y clonó de manera conjunta, con su chaperona a partir del ADN del pool 61(100 CFU). El gen de *LipJ4* se encontró río arriba del gen de la chaperona, y para realizar la sub-clonación se tomaron como referencias los trabajos realizados por An y colaboradores (2003) que expresaron a “*LipA*” de *Pseudomonas* sp. SW-3 con su chaperona (An *et al.*, 2003), y el trabajo realizado por Sullivan y colaboradores (1999) con la lipasa de *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1. El resultado positivo de la sub-clonación de *LipJ4-ChapJ4* se puede sustentar con otros trabajos que han expresado lipasas activas a través de la clonación conjunta con sus respectivas chaperonas (Kim *et al.*, 2008; Martini *et al.*, 2014). Estos trabajos reportan a las chaperonas río arriba del gen responsable de la lipólisis, y en consecuencia la hidrólisis de sustratos es detectable a través de la co-expresión de ambos.

*LipJ4* se ubica dentro del clado de BAA09135.1 (*Pseudomonas aeruginosa*) y CAA56780.1 (*Acinetobacter calcoaceticus*) que pertenecen a la sub-familial.1 de lipasas verdaderas (Arpigny & Jaeger, 1999). Otros estudios también muestran que las lipasas de este grupo I.1 son termoestables y con una gran estabilidad en un amplio rango de solventes orgánicos (Yuan *et al.*, 2015).

Algunos estudios proponen que la aplicación de la enzima *Acinetobar calcoaceticus* en la industria sería exitosa en el área de los detergentes, por su compatibilidad con TritonX-100, Tween-20, Tween-80, SDS, peróxido de hidrógeno, perborato de sodio, hipoclorito de sodio, citrato de sodio, taurocolato de sodio, glicerina y NaCl (Wang *et al.*, 2012).

La secuencia de lipasa de *Aeromonas hydrophila subsp. hydrophila* ATCC 7966 (ABK37008.1), se encuentra también dentro del mismo clado de *LipJ4* y presenta identidad con *LipG9* de *Aeromonas* sp., reportada por Martini y colaboradores (2014), quienes la clasifican como un miembro de la familia 1.1, por presentar la triada catalítica y los residuos

de aspartato en los mismos motivos que se observaron en *LipJ4*. Los sitios de unión al calcio, presentes en este grupo aumentan considerablemente la actividad catalítica de estas lipasas, dan estabilidad a la estructura de la proteína y algunos autores la relacionan con la estabilidad térmica característica de la familia I de lipasas (Masomian *et al.*, 2016).

El motivo pentapéptido GSHHG es característico de algunos miembros de la familia de lipasas I.1 como la *LipA* de *Pseudomonas* sp. SW3 (An *et al.*, 2003), y las 3 lipasas reportadas de *Acinetobacter* DYL129 (*LipA1*, *LipA2* y *LipA3*) (Kim *et al.*, 2008). Los motivos identificados en el alineamiento de *LipJ4* y los miembros de la familia I de lipasas, son congruentes con los identificados en el alineamiento obtenido por Arpigny y Reetz en 1998.

En materia de biocombustibles se ha reportado a la lipasa de *Cándida rugosa* como la enzima que ha adquirido la mayor importancia comercial en la industria del biodiésel y la biorremediación por su termoestabilidad, seguida de *CALB* de *Cándida antártica* (Christopher *et al.*, 2014; Ramos-Sánchez *et al.*, 2015). *Cándida rugosa* es frecuentemente utilizada para la biotransformación, es considerada como una enzima segura para aplicaciones en alimentos y la hidrólisis de los triglicéridos de la madera en la industria del papel (Ramos-Sánchez *et al.*, 2015). Algunas empresas recurren a las enzimas de la familia I.1 de lipasas bacterianas que corresponden a *Pseudomona aeruginosa*, *P. fragi*, *P. fluorescens*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Proteus vulgaris* y *Aeromonas veroni*, para la producción de biodiésel (Christopher *et al.*, 2014). Korman y Bowie (2012) con base en sus estudios proponen a la lipasa de *Proteus mirabilis* (familia I.1 de lipasas verdaderas) como candidato para la producción de biodiésel por su capacidad para transesterificar, tolerar cantidades importantes de agua en la reacción y llevar a cabo reacciones enantioespecíficas de ésteres quirales (Korman & Bowie, 2012).

El resultado de actividad de *LipJ4* sobre diferentes ésteres es en parte comparable con lo reportado por Yuan y colaboradores en el 2015 para la lipasa (*MAS1*) de *Streptomyces* sp. W007, la cual presentó su mayor actividad con p-nitrofenil caprilato (C8); *MAS1* mostró disminución progresiva de actividad, casi lineal, sobre p-nitrofenil ésteres de C10 a C18. En el caso de *LipJ4* la actividad fue mayor sobre p-nitrofenil caprilato (C8) y luego disminuye sobre C10 y C12, pero la actividad sobre C14 es mayor que sobre C10 y C12. Es decir, el descenso no es linealmente progresivo. Este comportamiento de “sube, baja y sube” de la actividad conforme crece la cadena de los ácidos grasos se ha observado también en otras

lipasas. Syal y Gupta (2015) reportaron que la lipasa *YLip9* de *Yarrowia lipolytica* MSR80 presenta preferencia sobre ésteres C10; la actividad de esta enzima sobre ésteres C3 y C4 es menor que sobre ésteres C2 (entre C2 y C4 se observa disminución gradual), pero la actividad es mayor sobre ésteres C6 y C8 que sobre C2, C3 y C4. Después de C10, sí muestra una disminución gradual sobre ésteres C12, C14, C16 y decae abruptamente sobre C18. En otro reporte, Farrokh y colaboradores (2014) describieron a la lipasa *ELBn12* de *Enterobacter* sp. Bn12, la cual es un miembro de la sub-familial.1; esta enzima mostró actividad a 60°C y preferencia de sustrato sobre p-nitrofenil caprilato (C8), pero su actividad sube y baja entre ésteres C4 a C18, sin seguir un patrón constante. Ninguno de los autores discuten el porqué de ese comportamiento, pero esos trabajos muestran que no es excepcional que *LipJ4* muestre el comportamiento que presentó sobre los diferentes sustratos evaluados. Cabe mencionar sin embargo, que el ensayo se realizó una sola vez (por duplicado), por lo que se requiere repetir para confirmar el comportamiento de *LipJ4* frente a los diferentes p-nitrofenil ésteres.

Brault y colaboradores (2012) reportaron una esterasa de *Streptomyces coelicolor* (organismo mesofílico) nombrada como *EtsC* que presenta preferencia de sustrato por cadenas de p-nitrofenil ésteres de C5 y C8 en un rango de 35-40°C, lo que la hace interesante para la industria alimentaria por su facilidad para sintetizar ésteres volátiles de cadena corta, presentes naturalmente en los alimentos. *LipJ4* presentó buena actividad sobre ésteres C4 y C8, por lo que también para *LipJ4* la industria alimentaria es un nicho probable de aplicación.

La lipasa A (*CALA*) de *Cándida antártica*, es considerada como una de las enzimas más importantes de la industria y su máxima preferencia de sustrato está dada con p-nitrofenil caprilato (C8). Su aplicación en la industria alimentaria está enfocada a reacciones de interesterificación y síntesis, que permiten modificar el contenido de grasas trans, la reducción de calorías, y el cambio de sabor a los alimentos (Sharma *et al.*, 2001; Houd *et al.*, 2004). Estos trabajo podrían dirigir la investigación de *LipJ4* para la industria alimentaria por su actividad con C8, pero también hacia la industria de los cosméticos, ya que tuvo un 70% de actividad con p-nitrofenil miristato (C14) (Sharma *et al.*, 2001).

Es importante mencionar que los resultados sobre preferencia de sustratos de *LipJ4* resultaron una sorpresa, ya que esta enzima dio un resultado positivo en el escrutinio

funcional, es decir, se observó actividad lipolítica sobre medio sólido conteniendo aceite de olivo; el aceite de oliva contiene ácido estéarico (C18), oleico (C18), linoleico (18) y ácido palmítico (C16) (Sánchez-Casas, 2003), por lo que se esperaría que la actividad de *LipJ4* sobre los sustratos de p-nitrofenil palmitato (C16) y p-nitrofenil esterato (C18) fuera mayor de la que se cuantificó. La preferencia de sustrato de *LipJ4* sobre sustratos de cadena larga (>12C) necesita ser corroborada, debido a que no se utilizó goma arábica para la emulsificación de los sustratos como lo reportan algunos autores (Martini *et al.*, 2014).

Tian y colaboradores en el 2015, dan a conocer una lipasa con preferencia por ácidos grasos de cadena corta, que también actúa sobre cadenas >12C hidrolizando los p-nitrofenil ésteres en presencia de metanol: característica de candidatos para la producción de biodiésel. La preferencia de sustrato de *LipJ4* necesita ser corroborada, debido a que no se utilizó goma arábica para la emulsificación de los sustratos de cadena larga >12C como lo reportan algunos autores como Martini y colaboradores (2014).

Hay estudios que reportan la expresión y secreción de lipasas en sistemas recombinantes con resultado positivos tamizando las colonias de forma directa sobre medios de aceite de olivo, Rodamina B e induciendo con IPTG (Song *et al.*, 2006). Sin embargo los resultados de este estudio fueron negativos con esta estrategia y por tanto se optó por la lisis celular.

Aunque la prospección de genes de lipasa se haya visto facilitada por la construcción de la biblioteca metagenómica, no se escatima la complejidad que implica el proceso de clonación y expresión de lipasas (Yuan *et al.*, 2015). Los problemas más difíciles de la expresión se deben a que dentro del sistema huésped puede iniciarse un proceso de degradación proteolítica en defensa de la integridad de la célula, o bien que las proteínas no tengan un buen plegamiento, formando conglomerados que después son eliminados por los sistemas de digestión celular (Abdel-Fattah & Gaballa, 2008). Una de las razones por las que las proteínas resultan ser tóxicas es debido a que los genes están muy poco representados o ausentes en el ADN de la biblioteca metagenómica mientras que en el sistema heterólogo se sobre-expresan. Otra dificultad es que estos genes necesitan del acompañamiento de marcos de lectura abiertos que codifican para chaperonas (Bell *et al.*, 2002). Adicionalmente, la secreción de las proteínas de interés se puede ver afectada por la maquinaria del organismo huésped, como lo argumentan Bell y colaboradores (2002) y Kanmani y colaboradores (2015). Los genes de las lipasas de algunos microorganismos,

por ejemplo *Bacillus* mesofílicos y termofílicos, resultan tóxicos para *E. coli* (Bell *et al.*, 2002; Kanmani *et al.*, 2015). También la incompatibilidad de la maquinaria de traducción y transducción entre el organismo productor de la lipasa y el huésped puede ser tan diferido que la misma expresión se ve afectada en la célula (Bell *et al.*, 2002).

Proteínas pequeñas y con péptidos señal son difíciles de expresar establemente en un huésped heterólogo como *E. coli* debido a que su plegamiento no es el correcto y se encuentran sujetos a una degradación proteolítica (Simon & Daniel, 2011). Además se ha reportado la formación de cuerpos de inclusión como uno de los obstáculos más comunes en la sobre-expresión de enzimas activas en sistemas heterólogos (Martini *et al.*, 2014; Kranen *et al.*, 2014). No se puede descartar que en este trabajo se hayan generado cuerpos de inclusión ya que no se analizaron las proteínas en geles de poliacrilamida.

En algunos casos el correcto plegamiento de las lipasas requieren de chaperonas para poder tener una forma activa como lo es el caso para las familias de *pseudomonadaceae* y *burkholderiaceae* que son Gram negativas (Martini *et al.*, 2014).

Hay trabajos en los que se han clonado las lipasas con sus respectivas chaperonas en un mismo inserto (*in vivo*) o por separado en donde el extracto crudo de la chaperona se agrega a la lipasa y esta reacciona con una buena actividad (Martini *et al.*, 2014).

De acuerdo a los ensayos de bioprospección realizados entre el año 2000 y 2009 de 76 lipasas y esterasas solo se pudieron sobreexpresar 11 de estas (Marioto-García *et al.*, 2015). El procedimiento total para la clonación y expresión de una enzima puede ser arduo y el esfuerzo es grande antes de poderles asignar una aplicación biotecnológica en la industria (Marioto-García *et al.*, 2015).

En cuanto a la utilización del sistema aLICator™ LIC, hay pocos estudios al respecto, sin embargo en un estudio realizado por Šiekšteľ y colaboradores en el 2015 emplearon este sistema aLICator pLATE para la sobre-expresión de una nueva lipasa de *Serratia* sp., utilizando el vector pLATE 11. Aunque proponen al sistema LIC como una estrategia que agiliza la sobre-expresión de lipasas, no pudieron expresar la proteína en BL21 (DE3) por la presunta incompatibilidad de su gen con la maquinaria de *E. coli.*, y optaron por cambiar de vector al de la levadura *Kluyveromyces lactis*. Su resultado se vio favorecido al obtener

actividad lipasa (Šiekštelė *et al.*, 2015). Empetenani y colaboradores (2013) obtuvieron resultados positivos de expresión de lipasa al utilizar el vector pET-28+ que permite la sobre-expresión y la purificación de proteínas a través de la etiqueta 6xHis en el N-terminal y C-terminal con la cepa de *E. coli* BL21 (DE3). También otro estudio más reciente reportó el sistema de sub-clonación y sobre-expresión en el sistema de pET28a (Novagen, Gibbstown, NJ, USA) para la producción de enzimas lipolíticas (Marioto-Garcia *et al.*, 2015).

Cabe mencionar que al igual que pLATE el vector pET-28+ posee el promotor T7 que le permite al inserto mantenerse y expresarse en *E. coli.*, puesto que ambos vectores tienen un gen con resistencia a ampicilina para el tamizado de las cepas transformadas. La gran ventaja que presenta el vector pLATE frente a pET-28+ es que permite la clonación dependiente de recombinación homóloga e independiente de enzimas de restricción y ligasas, lo que hace la clonación más fácil (Emtenani *et al.*, 2013).

## CAPITULO V

### CONCLUSIONES Y PERSPECTIVA

#### 5.1 CONCLUSIONES

Con el análisis funcional de Rodamina B con aceite de olivo al 1% fue posible identificar una colonia con halo fluorescente naranja a 564nm, indicativo de actividad lipolítica. Aunque se detectaron 3 colonias más (6,10 y 14) que no tuvieron halo fluorescente naranja pero que mostraron un color similar bajo luz UV, los resultados sugieren que podrían tratarse de falsos positivos que están reaccionando de alguna manera con el fluoróforo.

Las purificaciones de ADN (fósmidos) obtenidas con el kit fosmidMAX™ de Epicentre fueron de alta calidad para la secuenciación. Mediante el uso de herramientas bioinformáticas fue posible encontrar 4 ORFs de presuntas lipasas y una chaperona de lipasa en los contigs 40 y 99. Además de encontrar 2 marcos de lectura de hidrolasas en el contig 7. Los resultados obtenidos del análisis por homología de secuencia en BLAST-X, a través de la plataforma de Genious 5.4.7 fueron confirmados con los modelos ocultos de Markov en las plataformas de Pfam y Superfamily, en donde se obtuvieron 2 ORFs con dominio de lipasa (abyhidrolasa).

No se encontraron genes homólogos a lipasas en el contig proveniente de la secuenciación del fósrido de la clona 7 mediante los análisis bioinformáticos por Genious 5.4.7, Pfam 27, Superfamily, ORFinder, BLAST-X, pfectBLAST. Al momento se desconoce si esta clona contiene una lipasa divergente, no canónica, o si el gen de la lipasa no se encuentra en la región ensamblada como ha ocurrido en otros trabajos metagenómicos. Otra opción es que se trate de un falso negativo producido por la interferencia de otras proteínas con la Rodamina B.

Los resultados negativos de la inducción de las cepas nos llevaron a la realización de una lisis celular y una prueba de función sobre medios de Rodamina B y aceite de olivo. La actividad lipolítica se observó en 24 horas en el extracto soluble de la cepa correspondiente a la sub-clona *LipJ4-ChapJ4*.

Se logró la expresión de *LipJ4* cuando se co-expresión con la chaperona *ChapJ4*. El resultado negativo cuando se expresan de manera separada, aun cuando se mezclan *in vitro* ambos extractos, sugiere dependencia por *ChapJ4* para el correcto plegamiento *in vivo*.

La ausencia de actividad de lipasa extracelular en la clona que coexpresa *LipJ4* y *ChapJ4* apoya el resultado predicho bioinformáticamente de la ausencia de péptido señal de la secreción en *LipJ4*.

Los análisis filogenéticos, de comparación de motivos en los alineamientos y la predicción 3D, apoyan que *LipJ4* pertenece a la sub-familial.1 de la familia I de lipasas verdaderas.

*LipJ4* mostró preferencia por el éster p-nitrofenil caprilato (C8) en un 100% de actividad relativa y con el éster p-nitrofenil miristato (C14), mientras que su actividad bajó con los sustratos de p-nitrofenil palmitato (C16) y p-nitrofenil esterato (C18), a menos del 15%.

## 5.2 PERSPECTIVA

Las pruebas negativas de actividad de lipasa para los marcos de lectura de *LipJ1*, *LipJ2*, *LipJ3* abren la posibilidad de trabajar con estas secuencias aplicando técnicas de evolución dirigida para tratar de modificar la secuencia en las partes que se predicen como dominios o motivos responsables de la actividad catalítica (Kourist *et al.*, 2010). Una opción evidente es la de pegarle un péptido señal que permita que estas proteínas sean secretadas.

Como alternativa económica y de bajo consumo tanto de reactivos como de energía se puede recurrir a la estrategia empleada por Šiekšte y colaboradores en el 2015 en donde se empleó una purificación de una lipasa de *Serratia* sp., mediante la adsorción y desorción de la enzima a través de una matriz macroporosa de polipropileno (Šiekštelė *et al.*, 2015).

Evaluar el uso de la chaperona de *ChapJ4* sobre las lipasas que no presentaron función lipolítica para evitar, si ese fue el caso, que formaron cuerpos de inclusión.

Desde el punto de vista básico, la expresión independiente de *LipJ4* y *ChapJ4* en comparación con el análisis de co-expresión permitiría realizar el estudio del mecanismo

que permite a la lipasa plegarse y realizar la hidrólisis de triglicéridos. La investigación podría concluir con la cristalización de la proteína.

Para definir nicho de aplicación de la enzima *LipJ4* se requiere profundizar la caracterización bioquímica. Enfocar la investigación hacia un área específica de la industria, por ejemplo la producción de los biocombustibles, pruebas de transesterificación y estabilidad en solventes orgánicos. Realizar una prueba de enantioselectividad para determinar si habría potencial dentro de la industria farmacéutica.

### 5.3 ANEXOS

#### 5.3.1 ANÁLISIS DE LOS CONTIGS 6,10 Y 14 CON EL PROGRAMA GENEIOUS PROT

#### 5.4.7

Estos contigs no presentaron ningún ORF con identidad de lipasa y por tal motivo se descartaron de los análisis, puesto que tampoco se obtuvieron resultados positivos de sus clonas en medios de Rodamina B y aceite de olivo. Su representación está en las figuras 5.1-5.3 con algunas proteínas hipotéticas, algunas hidrolasas y marcos de lectura sin similitud.

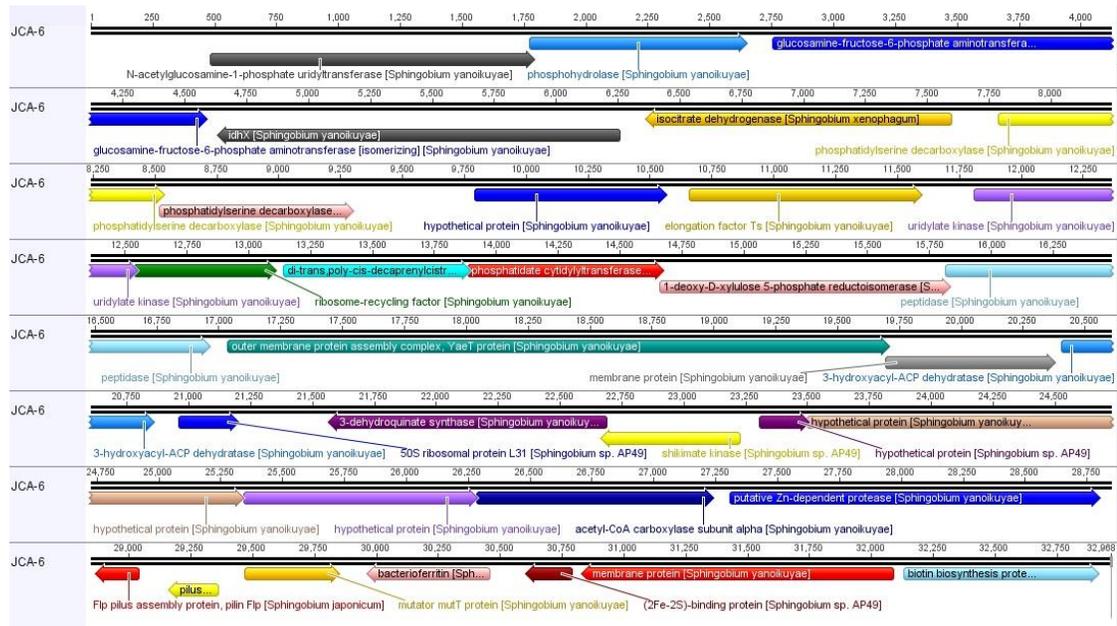


Figura 5.1 Genes presentes en el contig de la clona 6 en el programa Geneious 5.4.7.

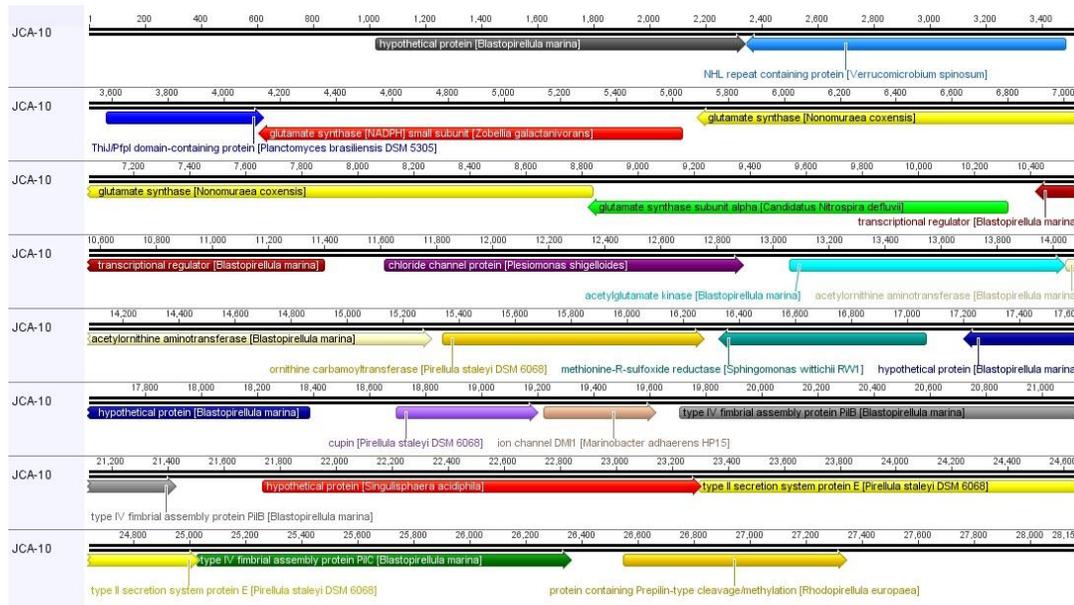


Figura 5.2 Genes presentes en el contig de la clona 10 en el programa Geneious 5.4.7.

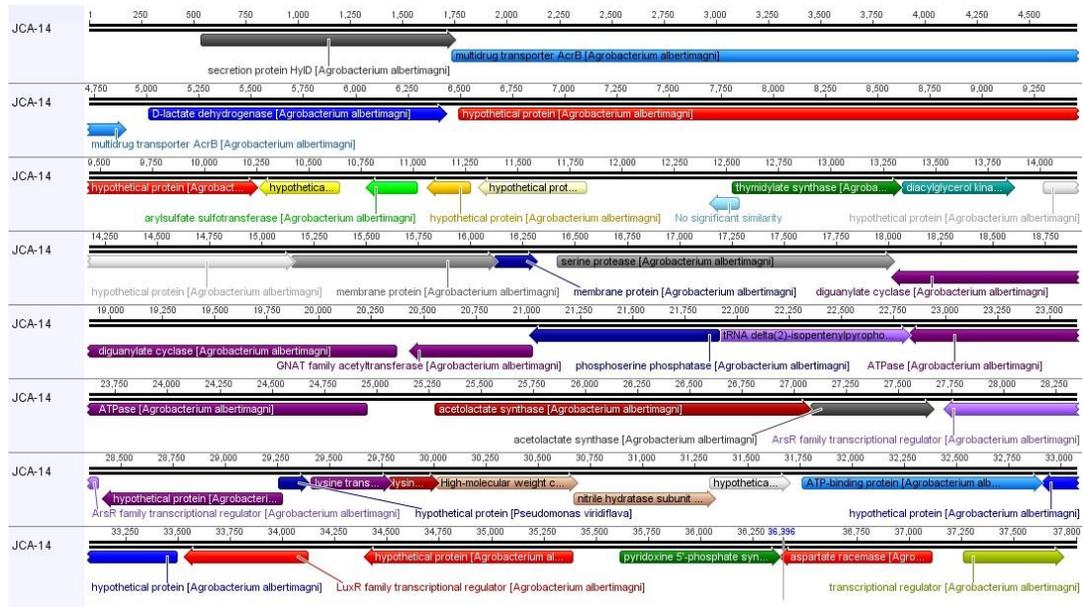
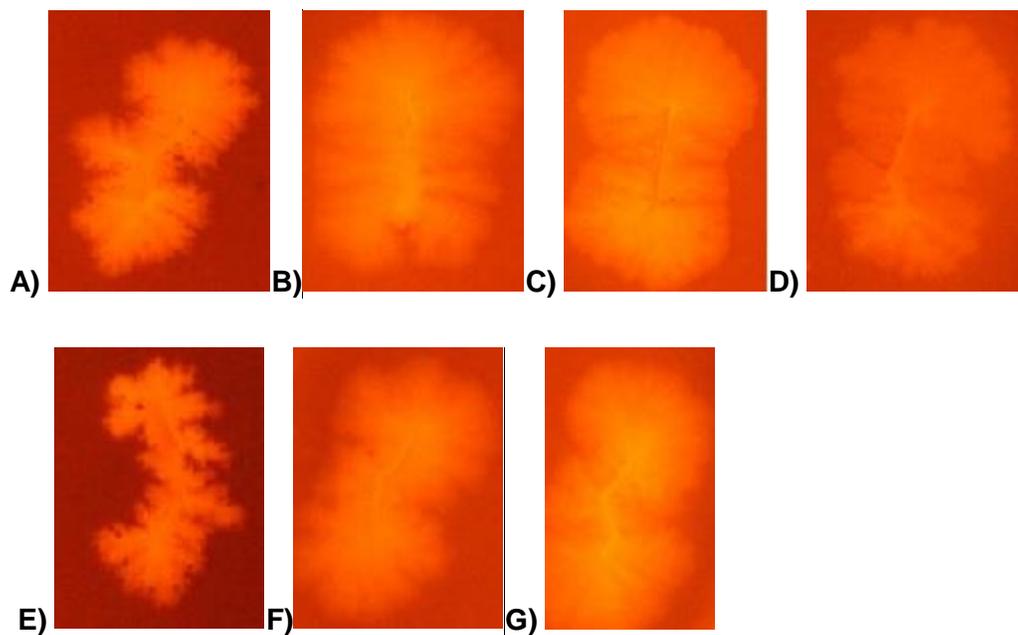


Figura 5.3 Genes presentes en el contig de la clona 14 con el programa Geneious 5.4.7.

### 5.3.2 CLONAS DE BL21 INDUCIDAS CON IPTG

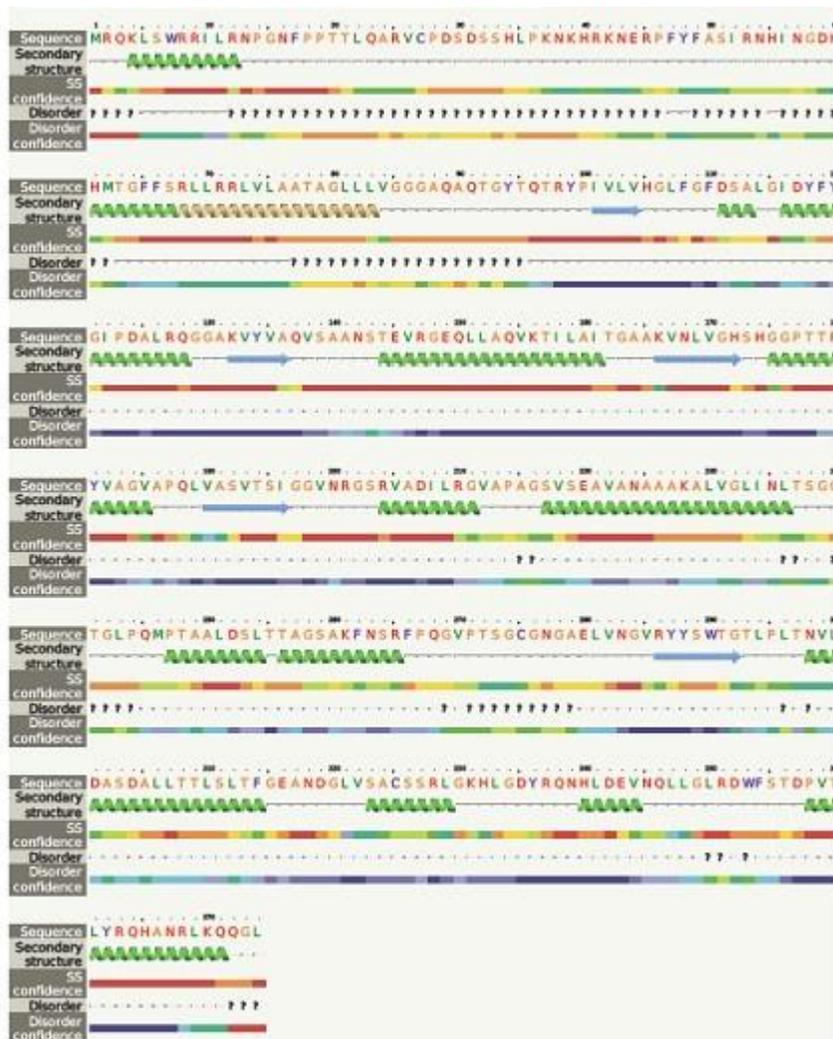
Las clonas se indujeron con IPTG 0.1mM distribuyendo el agente inductor sobre las placas de Rodamina B con aceite de olivo y se incubaron por 12 horas a 37°C. Al término se observó a 564nm en un fotodocumentador.



**Figura 5.4** Clonas BL21 inducidas con IPTG sobre medios de Rodamina B y aceite de olivo. A) Cepa *E. coli* BL21 (DE3). B), C) y D) representan a las clonas conteniendo los ORFs *LipJ1*, *LipJ2* y *LipJ3* respectivamente. E) representa la clona de la chaperona (*ChapJ4*) y F) es *LipJ4*. G) muestra la cepa B21 co-expresando *LipJ4* y *ChapJ4*.

### 5.3.3 ESTRUCTURA SECUNDARIA DE *LipJ4*

Se ingresó la secuencia de *LipJ4* en la plataforma de Phyre2 para determinar la estructura secundaria  $\alpha/\beta$  hidrolasa. En la secuencia se detectaron 12 estructuras alfas y 5 cadenas beta.

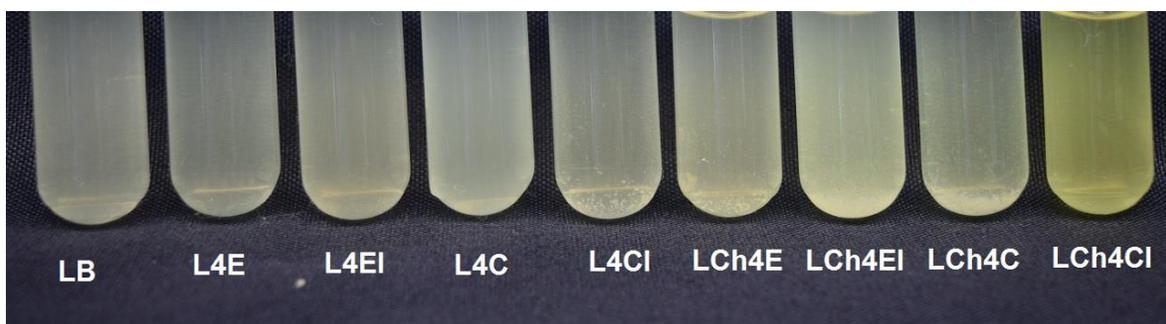


**Figura 5.5** Estructura  $\alpha/\beta$  hidrolasa de *LipJ4* predichas con Phyre2. Las cadenas de color verde representan las estructuras  $\alpha$  y las cadenas azules representan las estructuras  $\beta$ .

### 5.3.4 PRUEBA COLORIMETRICA DE P-NITROFENIL PALMITATO *LipJ4* Y *LipJ4-ChapJ4*

Se realizó la prueba colorimétrica en tubo empleando p-nitrofenil palmitato para comparar el resultado con las pruebas funcionales sobre placas de agar de aceite de olivo y Rodamina B. La prueba se realizó adaptando la metodología de Boonmahome y Mongkolthanaruk (2013). El p-NPP (30 mg) fue agregado en 10mL de 2-propanol y se mezcló con 90mL de amortiguador fosfato 5mM a pH 8. La reacción se realizó al agregar 100 $\mu$ L del extracto enzimático en 2mL de reacción y posteriormente se incubó a 45°C durante 20min en baño

María. Posteriormente la reacción se detuvo con 2.9mL de carbonato de calcio (2M). Las pruebas se realizaron con los extractos extracelulares y citosólicos de *LipJ4* y del complejo *LipJ4-ChapJ4*. Se observa la liberación del grupo p-nitrofenil del sustrato (coloración amarilla) en la reacción con extracto citosólico de *LipJ4-ChapJ4* bajo condiciones de inducción (Fig.5.6).



**Figura 5.6** Prueba colorimétrica con p-nitrofenil palmitato con *LipJ4* y *LipJ4-ChapJ4*. LB hace referencia a un control negativo libre de enzima. L4E y L4EI corresponden a los extractos extracelulares de *LipJ4* sin inducir e inducido respectivamente. L4C Y L4CI corresponden a los extractos citosólicos de *LipJ4* sin inducir e inducido. De igual forma se realizó la prueba con los extractos extracelular y citosólico de la co-expresión de *LipJ4* con su chaperona (*LipJ4-ChapJ4*), sin inducir (LCh4E y LCh4C) e inducido (LCh4EI y LCh4CI) con IPTG.

### 5.3.5 DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS DE LOS ANÁLISIS *in silico*

El cuadro 5.1 muestra las secuencias utilizadas para los análisis *in silico*. Todas las secuencias corresponden a las lipasas bacterianas de la familia I y la familia III. También se representa una lipasa de levadura.

**Cuadro 5.1** Secuencias de lipasas bacterianas, utilizadas para los análisis *in silico* de *LipJ4*.

NO. ACCESIÓN	FUENTE	ORGANISMO	CLASIFICACIÓN
WP_043216370.1	NCBI Reference Sequence	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	Familia III

KJH80919.1	Genbank	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Familia III
WP_021018894.1	NCBI Reference Sequence	<i>Vibrio gazogenes</i>	Familia III
WP_004581014.1	NCBI Reference Sequence	<i>Marinobacter nanhaiticus</i>	Familia III
ACC95208.1	Genbank	<i>uncultured bacterium</i>	Familia III
GAF62011.1	Genbank	<i>Psychrobacter</i> sp. JCM 18903	Familia III
CAA37220.1	Genbank	<i>Moraxella</i> sp.	Familia III
WP_009155382.1	NCBI Reference Sequence	<i>Saccharomonospora marina</i>	Familia III
AGZ44111.1	Genbank	<i>Actinoplanes friuliensis</i> DSM 7358	Familia III
AAD09315.1	Genbank	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	Familia III
CAA02196.1	Genbank	<i>Bacillus pumilus</i>	Sub-familial.4
CAT00692	Genbank	<i>Bacillus pumilus</i>	Sub-familial.4
AAA22574.1	Genbank	<i>Bacillus subtilis</i>	Sub-familial.4
Q8RJP5	UniProtKB/Swiss-Prot	<i>Bacillus megaterium</i>	Sub-familial.4
CAA67627.1	Genbank	<i>Propionibacterium acnes</i>	Sub-familial.6

AEM45127.1	Genbank	<i>uncultured organism</i>	Sub-familial.6
WP_026550465.1	NCBI Reference Sequence	<i>Arthrobacter</i> sp. Br18	Sub-familial.6
AAB71210.1	Genbank	<i>Streptomyces cinnamoneus</i>	Sub-familial.6
AAC12257.1	Genbank	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	Sub-familial.5
JQ360624.1	Genbank	<i>Geobacillus</i> sp. GHH01	Sub-familial.5
CAA64621.1	Genbank	<i>Geobacillus thermocatenulatus</i>	Sub-familial.5
CCF15795.1	Genbank	<i>Brevibacillus laterosporus</i> GI-9	Sub-familial.5
WP_057900039.1	NCBI Reference Sequence	<i>Aneurinibacillus</i> sp. XH2	Sub-familial.5
AAC05510.1	Genbank	<i>Pseudomonas luteola</i>	Sub-familial.2
AAA50466.1	Genbank	<i>Burkholderia cepacia</i>	Sub-familial.2
EQA86312.1	Genbank	<i>Burkholderia pseudomallei</i> MSHR338	Sub-familial.2
CAA49812.1	Genbank	<i>Burkholderia glumae</i>	Sub-familial.2
ABS57471.1	Genbank	<i>Burkholderia</i> sp. HY-10	Sub-familial.2

AAC60402.1	Genbank	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Sub-familial.3
BAA02012.1	Genbank	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Sub-familial.3
Q9ZG91	Genbank	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Sub-familial.3
BAA02519.1	Genbank	<i>Serratia marcescens</i>	Sub-familial.3
ABP04234.1	Genbank	<i>Serratia liquefaciens</i>	Sub-familial.3
AAG09700.1	Genbank	<i>Pseudomonas</i> sp. UB48	Sub-familial.3
AAP76489.1	Genbank	<i>uncultured bacterium</i>	Sub-familial.3
AAD22743.1	Genbank	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	Sub-familial.3
AEK97793.1	Genbank	<i>uncultured bacterium</i>	Sub-familial.1
CAA32193.1	Genbank	<i>Pseudomonas fragi</i>	Sub-familial.1
CAA56780.1	Genbank	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Sub-familial.1
ACA49549.1	Genbank	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Sub-familial.1
BAA09135.1	Genbank	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Sub-familial.1
WP_043297117.1	NCBI Reference Sequence	<i>Pseudomonas</i> sp. HMP271	Sub-familial.1

WP_019658438.1	NCBI Reference Sequence	<i>Variovorax paradoxus</i>	Sub-familial.1
WP_036772416.1	NCBI Reference Sequence	<i>Polaromonas glacialis</i>	Sub-familial.1
WP_043125596.1	NCBI Reference Sequence	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Sub-familial.1
ABK37008.1	Genbank	<i>Aeromonas hydrophila</i> <i>sub sp. hydrophila</i> ATCC 7966	Sub-familial.1
WP_032474951.1	NCBI Reference Sequence	<i>Vibrio cholerae</i>	Sub-familial.1
AAQ04476.1	Genbank	<i>Vibrio vulnificus</i>	Sub-familial.1
AGS59531.1	Genbank	<i>Proteus mirabilis</i> BB2000	Sub-familial.1
<i>LipJ4</i>	-----	-----	Sub-familial.1



**BIBLIOGRAFÍA**

- Abdel-Fattah, Y. R., & Gaballa, A. A. (2008). Identification and over-expression of a thermostable lipase from *Geobacillus thermoleovorans Toshki* in *Escherichia coli*. *Microbiological Research*, 163(1), 13-20. doi:10.1016/j.micres.2006.02.004.
- Aceves-Diez, A. E., & Castañeda-Sandoval, A. L. M. (2012). Producción biotecnológica de lipasas microbianas, una alternativa sostenible para la utilización de residuos agroindustriales. *Vitae*, 19(3).
- Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Peter Walter, A. P. (2006). *Introducción a la Biología Celular* (2ad ed.). Madrid, España: Ed. Médica Panamericana.pp. 864.
- Altan, A. (2004). Isolation and Molecular Characterization of Extracellular Lipase and Pectinase Producing Bacteria from Olive Oil Mills. (M.Sc.), İzmir Institute of Technology, İzmir, Turkey.
- Amann, R. I., Ludwig, W., & Schleifer, K. H. (1995). Phylogenetic Identification and *In Situ* Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation. *Microbiological Reviews*, 59(1), 143-169.
- Apolinar-Hernández M. M., Peña-Ramírez, Y. J., Pérez-Rueda E., Canto-Canché, B. B., De los Santos-Briones, C., O'Connor-Sánchez, A.(2016) Identification and *in silico* characterization of two novel genes encoding peptidases S8 found by functional screening in a metagenomic library of Yucatán underground water. *Gene* 593: 154-161. Doi: 10.1016/j.gene.2016.08.009.
- Arpigny, J. L., & Jaeger, K. E. (1999). Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochemical Journal*, 343(1), 177-183.
- Artimo, P., Jonnalagedda, M., Arnold, K., Baratin, D., Csardi, G., de Castro, E., Duvaud, S., Flegel, V., Fortier, A., Gasteiger, E., Grosdidier, A., Hernández, C., Ioannidis, V., Kuznetsov, D., Liechti, R., Moretti, S., Mostaguir, K., Redaschi, N., Rossier, Z.,

- Xenarios, I., & Stockinger, A. H. (2012). ExPASy: SIB Bioinformatics Resource Portal. 40(W1):W597-W603.
- Bartasun, P., Cieśliński, H., Bujacz, A., Wierzbicka-Woś, A., & Kur, A. J. (2013). A Study on the Interaction of Rhodamine B with Methylthioadenosine Phosphorylase Protein Sourced from an Antarctic Soil Metagenomic Library. PLOS ONE, 8(1), e55697. doi:10.1371/journal.pone.0055697
- Baxevanis, A. D., & Ouellette, A. B. F. F. (2004). Bioinformatics: a practical guide to the analysis of genes and proteins (Vol. 43): John Wiley & Sons.
- Berlemont, R., Pipers, D., Delsaute, M., Angiono, F., Feller, G., Gallene, M., & Power P. (2011). Exploring the Antarctic soil metagenome as a source of novel cold-adapted enzymes and genetic mobile elements. Revista Argentina de Microbiología. 43. ISSN 0325-754.
- Biver, S., & Vandebol, A. M. (2013). Characterization of three new carboxylic ester hydrolases isolated by functional screening of a forest soil metagenomic library. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 40(2), 191-200.
- Buchholz, K., Kasche, V., & Bornscheuer, A. U. T. (2012). Biocatalysts and Enzyme Technology: John Wiley & Sons.
- Carissimi, M., Ottonelli-Stopiglia, C. D., FourtadodeSouza, T., Corbellini, V., & Scroferneker, A. M. L. (2007). Comparison of lipolytic activity of *Sporothrix schenckii* strains utilizing olive oil-rhodamine B and tween 80. Tecno-Lógica, 11, 33-36.
- Casas-Godoy, L., Duquesne, S., Bordes, F., Sandoval, G., & Marty, A. A. (2012). Lipases: an Overview Lipases and Phospholipases (pp. 3-30): Springer.
- Cetina-Medina, D. M. (2010). Estudio de la glicerólisis de trioleína para la producción de monoglicéridos vía enzimática con lipasas de *Candida Rugosa* y de *Mucor Miehei*. Universidad Nacional de Colombia-Sede Manizales.
- Chow, J., Kovacic, F., Dall-Antonia, Y., Krauss, U., Fersini, F., Schmeisser, C., Lauinger, B., Bongen, P., Pietruszka, J., Schmidt, M., Menyés, I., Bornscheuer, U. T., Eckstein, M.,

- Thum, O., Liese, A., Mueller-Dieckmann, J., Jaeger, K. E., & Wolfgang R. Streit. Streit, A. W. R. (2012). The Metagenome-Derived Enzymes LipS and LipT Increase the Diversity of Known Lipases. PLOS ONE, 7(10), e47665. doi:10.1371/journal.pone.0047665.
- Christopher, L. P., Kumar, H., & Zambare, V. P. (2014). Enzymatic biodiésel: challenges and opportunities. Applied Energy, 119, 497-520.
- Couto, G. H., Glogauer, A., Faoro, H., Chubatsu, L. S., Souza, E. M., & Pedrosa, A. F. O. (2010). Isolation of a novel lipase from a metagenomic library derived from mangrove sediment from the south Brazilian coast. Genetics and Molecular Research : GMR, 9(1), 514-523. doi:10.4238/vol9-1gmr738.
- De-Sancho, D., & Muñoz, V. (2011). Integrated prediction of protein folding and unfolding rates from only size and structural class. Physical Chemistry Chemical Physics.13,17030-17043.DOI:10.1039/c1cp20402e.
- Epicentre, C. (2012a). CopyControl™HTP Fosmid Library Production Kit with pCC2FOS™ Vector. In Illumina (Ed.).
- Epicentre, C. (2012b). FosmidMAX™ DNA Purification Kit. In Illumina (Ed.).
- Faoro, H., Glogauer, A., Souza, E. M., Rigo, I. U., Cruz, L. M., Monteiro, R. A., & Pedrosa, A. F.-O. (2011). Identification of a new lipase family in the Brazilian Atlantic Forest soil metagenome. Environmental Microbiology Reports, 3(6), 750-755.
- Fersini, F., Dall'Antonia, Y., Chow, J., Streit, W. R., & Mueller-Dieckmann, A. J. (2012). Cloning, expression, purification and preliminary X-ray analysis of a putative metagenome-derived lipase. Acta Crystallographica Section F, 68(8), 923-926. doi:10.1107/S1744309112025651.
- Finn, R. D., Coggill, P., Eberhardt, R. Y., Eddy, S. P., Mistry, J., Mitchell, A. L., Potter, S. C., Punta, M., Qureshi, M., Sangrador-Vegas, A., Salazar, G.-A., Tate, J., & Bateman, A. (2015). The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. Nucleic acids research, gkv1344.

- Fu, J., Leiros, H. K. S., de-Pascale, D., Johnson, K. A., Blencke, H. M., & Landfald, A. B. (2013). Functional and structural studies of a novel cold-adapted esterase from an Arctic intertidal metagenomic library. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(9), 3965-3978.
- García-Román, M. (2005). Hidrólisis enzimática de triglicéridos en emulsiones O/W. Aplicación a formulaciones detergentes. (Ph.D.), Universidad de Granada.
- Glogauer, A., Martini, V. P., Faoro, H., Couto, G. H., Müller-Santos, M., Monteiro, R. A., Mitchell, D. A., de Souza, E., Pedrosa, F., & Krieger, A. N. (2011). Identification and characterization of a new true lipase isolated through metagenomic approach. *Microbial Cell Factories*, 10, 54.
- González-Martínez, D., Rodríguez-Mata, M., Méndez-Sánchez, D., Gotor, V., & Gotor-Fernández, A. V. (2015). Lactonization reactions through hydrolase-catalyzed peracid formation. Use of lipases for chemoenzymatic Baeyer–Villiger oxidations of cyclobutanones. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 114, 31-36.
- González-Herrera, R., Rodríguez-Castillo, R., & Coronado-Peraza, V. (2007). Atenuación natural en el Acuífero de Yucatán. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. vol. 23 no.1.
- Gough, J., Karplus, K., Hughey, R., & Chothia, C. (2001). Assignment of homology to genome sequences using a library of hidden Markov models that represent all proteins of known structure. *Journal of Molecular Biology*, 313(4), 903-919.
- Gupta, R., Gupta, N., & Rathi, A. P. (2004). Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64(6), 763-781.
- Handelsman, J. (2004). Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(4), 669-685.
- Hasan, F., Shah, A. A., & Hameed, A. (2006). Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(2), 235-251. doi:10.1016/j.enzmictec.2005.10.016.

- Heiman, M. (1997). Webcutter2.0. copyright. Disponible en: <http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/>  
[Acceso 20 abril 2014].
- Invitrogen. 2014. Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity. Protocol Pub. No. MAN0000948 Rev. A.0.
- Jaeger, K. E., & Reetz, A. M. T. (1998). Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends in Biotechnology*, 16(9), 396-403. doi:10.1016/S0167-7799(98)01195-0.
- Jiménez, D. J., Montaña, J. S., Alvarez, D., & And Sandra Baena. (2012). A novel cold active esterase derived from Colombian high Andean forest soil metagenome. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(1), 361-370.
- Johnson, M., Zaretskaya, I., Raytselis, Y., Merezhuk, Y., McGinnis, S., & Madden, T. L. (2008). NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic Acids Research*, 36 (suppl 2), W5-W9.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12), 1647-1649.
- Khan, M., & Jithesh, A. K. (2012). Expression and purification of organic solvent stable lipase from soil metagenomic library. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(6), 2417-2424.
- Kim, E. Y., Oh, K. H., Lee, M. H., Kang, C. H., Oh, T. K., & Yoon, A. J. H. (2009). Novel Cold-Adapted Alkaline Lipase from an Intertidal Flat Metagenome and Proposal for a New Family of Bacterial Lipases. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(1), 257-260. doi:10.1128/AEM.01400-08.
- Kim, S. H., Park, I. H., Lee, S. C., Lee, Y. S., Kim, C. M., Ahn, S. C., & Choi, Y. L. (2008). Discovery of three novel lipase (lipA 1, lipA 2, and lipA 3) and lipase-specific chaperone (lipB) genes present in *Acinetobacter* sp. DYL129. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77(5), 1041-1051.

- Korman, T. P., & Bowie, J. U. (2012). Crystal structure of *Proteus mirabilis* lipase, a novel lipase from the *Proteus*/psychrophilic subfamily of lipase family I. 1. PLOS ONE, 7(12), e52890.
- Kouker, G., & Jaeger, A. K. E. (1987). Specific and sensitive pLATE assay for bacterial lipases. Applied and Environmental Microbiology, 53(1), 211-213.
- Kourist, R., Jochens, H., Bartsch, S., Kuipers, R., Padhi, S. K., Gall, M., Böttcher, D., Joosten, H. J., & Bornscheuer, U. T. (2010). The  $\alpha/\beta$ -hydrolase fold 3DM database (ABHDB) as a tool for protein engineering. ChemBioChem, 11(12), 1635-1643.
- Kranen, E., Detzel, C., Weber, T., & Jose, A. J. (2014). Autodisplay for the co-expression of lipase and chaperone on the surface of *E. coli*: washing with designer bugs. Microbial Cell Factories, 13(1), 19.
- Kumar, D., Kumar, L., Nagar, S., Raina, C., Parshad, R., & And Vijay Kumar-Gupta. (2012). Screening, isolation and production of lipase/esterase producing *Bacillus* sp. strain DVL2 and its potential evaluation in esterification and resolution reactions. Archives of Applied Science Research, 4(4), 1763-1770.
- Kunin, V., Copeland, A., Lapidus, A., Mavromatis, K., & Hugenholtz, A. P. (2008). A bioinformatician's guide to metagenomics. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 72(4), 557-578.
- López-López, O., Cerdán, M. E., & González-Siso, A. M. I. (2014). New extremophilic lipases and esterases from metagenomics. Current Protein & Peptide Science, 15(5), 445.
- Ma, J., Ma, Y., Wei, W., & Wei, A. D. Z. (2015). In vivo functional expression of an extracellular  $\text{Ca}^{+2}$ -independent *Bacillus pumilus* lipase in *Bacillus subtilis* WB800N. Annals of Microbiology, 11. doi:10.1007/s13213-015-1035-z
- Mark Levisson. (2009). Biochemical and structural analysis of thermostable esterases. (Ph.D.), Wageningen Universiteit (Wageningen University), Netherlands.
- Markets, & Markets, a. (2015). Industrial Enzymes Market by Type (Carbohydrases, Proteases, Non-starch Polysaccharides and others ), Application (Food and

- Beverage, Cleaning Agents, Animal Feed and Others) Brands and by Region-Global Trends and Forecasts to 2020. Disponible en: <http://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/industrial-enzymes-market-237327836.html>. [Acceso 08 noviembre 2015].
- Martini, V. P., Glogauer, A., Muller-Santos, M., Iulek, J., Souza, E. M. d., Mitchell, D. A., Oliveira-Pedrosa, F., & Krieger, A. N. (2014). First co-expression of a lipase and its specific chaperone obtained by metagenomics. *Microbial Cell Factories*, 13(1), 171-171. doi:10.1186/s12934-014-0171-7.
- McGinnis, S., & Madden, T. L. (2004). BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. *Nucleic acids research*, 32(suppl 2), W20-W25.
- Nagarajan, S. (2012). New tools for exploring “old friends—microbial lipases”. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 168(5), 1163-1196.
- Okano, H., Hong, X., Kanaya, E., Angkawidjaja, C., & Kanaya, A. S. (2015). Structural and biochemical characterization of a metagenome-derived esterase with a long N-terminal extension. *Protein Science*, 24(1), 93-104.
- Owczarzy, R., Tataurov AV, Wu Y, Manthey JA, McQuisten KA, Almabrazi HG, Pedersen KF, Lin Y, Garretson J, McEntaggart NO, Sailor CA, Dawson RB, Peek AS. (2008). IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers. *Nucleic Acids Research*, 36 (suppl 2), W163-W169.
- Parra, L. P., Espina, G., Devia, J., Salazar, A., Andrews, B., Asenjo, J. A. (2015). Identification of lipase encoding genes from Antarctic seawater bacteria using degenerate primers: Expression of a cold-active lipase with high specific activity. *Enzyme and Microbial Technology* 68. 56–61.
- Petersen, T. N., Brunak, S., von-Heijne, G., & Nielsen, H. (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature methods*, 8(10), 785-786.
- Pleiss, J., Fischer, J., Peiker, M., Thiele, C., & Schmid, R. D.(2000). The Lipase Engineering Database. Diponible en:<http://www.led.uni-stuttgart.de/>

- Promega Corporation. GoTaq® DNA Polymerase. Part# 9PIM300. 2800 Woods Hollow Road·Madison, WI 53711-5399 U.S.A. Revised 8/14.
- Promega Corporation. Wizard® Genomic DNA Purification Kit.2800 Woods Hollow Road. Madison, WI 53711-5399 USA. Toll Free in USA 800-356-9526. 608-274-4330. TM050.Revised 12/14.No.Cat A9282.USA.
- Rajan, A., D. R.Soban-Kumar, & A. Jayakumaran-Nair. (2011). Isolation of a novel alkaline lipase producing fungus *Aspergillus fumigatus* MTCC 9657 from aged and crude rice bran oil and quantification by HPTLC. International Journal of Biological Chemistry. 5(2), 116-126.
- Ramos-Jimenez, Sergio. 2013. Escrutinio de lipasas microbianas. Tesis de Licenciatura. Centro de Investigación Científica de Yucatán. pp. 27.
- Rojas-Herrera, R., Zamudio-Maya, M., Arena-Ortiz, L., Pless, R. C., & O'Connor-Sanchez, A. (2011). Microbial diversity, metagenomics and the Yucatan aquifer. Phyton-International Journal of Experimental Botany, 80, 231-240.
- Sabree, Z. L., Rondon, M. R., & Handelsman, A. J. (2009). Metagenomics. Encyclopedia of Microbiology, 622-632.
- Sambrook, J., & Russell, A. D. W. (2001). Molecular Cloning: A laboratory manual.C. S. H. L. Press Ed. Third ed. Vol. 3.
- Sánchez-Casas, J. J., Osorio-Bueno, E., Montaña-García, A. M., & Martínez-Cano, M. (2003). Estudio del contenido en ácidos grasos de aceites monovarietales elaborados a partir de aceitunas producidas en la región extremeña. Grasas y aceites, 54(4), 371-377.
- Sangeetha, R., Arulpandi, I., & Geetha, A. A. (2011). Bacterial lipases as potential industrial biocatalysts: An overview. Research Journal of Microbiology, 6(1), 1.
- Santiago-Sotelo, P., & Ramirez-Prado, J. H. (2012). Competing interests. Biotechniques, 53(5), 299-300.

- Sarrouh, B., Santos, T. M., Miyoshi, A., Dias, R., & Azevedo, A. V. (2012). Up-to-date insight on industrial enzymes applications and global market. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques S*, 4, 002.
- Saxena, S. (2015). *Applied Microbiology* (Springer India Ed. ilustrada ed.), pp.190.
- Shu, Z., Lin, R., Jiang, H., Zhang, Y., Wang, M., & Huang, A. J. (2009). A rapid and efficient method for directed screening of lipase-producing *Burkholderia cepacia* complex strains with organic solvent tolerance from rhizosphere. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 107(6), 658-661.
- Simon, C., & Daniel, R. (2011). Metagenomic Analyses: Past and Future Trends. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(4), 1153-1161. doi:10.1128/AEM.02345-10
- Solari, A. J. (2004). *Genética humana: fundamentos y aplicaciones en medicina* (3a ed.): Ed. Médica Panamericana. pp.586.
- Thermo Fisher Scientific Inc. aLICator LIC Cloning & Expression System. Cat. No. K1291.USA.
- Ugur, A., Sarac, N., Boran, R., Ayaz, B., Ceylan, O., & Okmen, G. (2014). New Lipase for Biodiésel Production: Partial Purification and Characterization of LipSB 25-4. *ISRN Biochemistry*, 2014.
- Urban, M., & Adamczak, A. M. (2008). Exploration of metagenomes for new enzymes useful in food biotechnology-a review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 58(1).
- Valenzuela, A., Sanhueza, J., & Nieto, A. S. (2002). Structured lipids in nutrition: A technology for the development of novelty products. *Revista Chilena de Nutrición*, 29(2), 106-115.
- Wang, Q., Wu, H., Wang, A., Du, P., Pei, X., Li, H., Yin, X., Huang, L., & Xiong, A. X. (2010). Prospecting metagenomic enzyme subfamily genes for DNA family shuffling by a novel PCR-based approach. *Journal of Biological Chemistry*, 285(53), 41509-41516.

- Yeh, W. K., Yang, H. C., & McCarthy, A. J. R. (2011). Enzyme technologies: metagenomics, evolution, biocatalysis and biosynthesis (Vol. 3): John Wiley & Sons.
- Zheng, J., Liu, C., Liu, L., & Jin, Q. (2013). Characterisation of a thermo-alkali-stable lipase from oil-contaminated soil using a metagenomic approach. *Systematic and Applied Microbiology*, 36(3), 197-204.
- Šiekštelė, R., Veteikytė, A., Tvaska, B., & Matijošytė, I. (2015). Yeast *Kluyveromyces lactis* as host for expression of the bacterial lipase: cloning and adaptation of the new lipase gene from *Serratia* sp. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 42(10), 1309-1317.

---